

**T.C.
UŐAK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

**DİŞBUDAK AĞACI (FRAXINUS EXCELSIOR) VE
ENGİNAR (CYNARA SCOLYMUS) YAPRAKLARINDAN KLOROJENİK
ASİT EKSTRAKSİYONUN OPTİMİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

YAKUP ATICI

UŐAK 2015

ÖZET

Bitkisel kaynaklı besinler az ya da çok miktarda fenolik madde içermektedir. Özellikle meyve ve sebzelerin rengi, lezzeti ve dayanıklılığı üzerine etkili olan fenolik maddeler, antioksidan özelliklerine bağlı olarak antikanserojen, antimutajen ve antimikrobiyal aktivite göstermeleri bakımından da insan sağlığı ile yakından ilişkilidir. Dişbudak yaprağı (*Fraxinus Excelsior*) ve enginar yaprağı (*Cynara Scolymus*) ekstraktları geleneksel tıpta yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu bitkilerin içeriğinde çeşitli bileşikler bulunur. Bu bileşiklerden biri de klorojenik asittir. Klorojenik asit antioksidan antibakteriyel ve antiviral özelliklere sahip bir bileşiktir. Klorojenik asit içecek, kozmetik, çay ürünleri ve besinlerde katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Ayrıca kan şekerini düşürmedeki etkisi ve kansere karşı korunmada etkili olması gibi bazı aktivitelerinden dolayı klorojenik asitin geleneksel tıpta faydalı bir bileşik olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışmada, toplanan dişbudak ağacı (*Fraxinus Excelsior*) yaprakları ve enginar (*Cynara Scolymus*) yaprakları güneş almaksızın kurutulup sap kısmı ayrılıp öğütüldü. Toz haline getirilen kısımlar, çevre dostu su ile ekstrakte edildi. Ekstraktlar HPLC kromatografik sistemde optimize edilen gradiyent elüsyon yöntemi ile analiz edilerek, sonuçlar ppm düzeyinde ifade edildi. Box-Behnken tasarımına dayalı Yüzey Yanıt Yönteminin (RSM) kullanıldığı ultrasonik destekli ekstraksiyon ile *Fraxinus Excelsior* ve *Cynara Scolymus* yapraklarından klorojenik asit ekstraksiyonunun optimum koşulları belirlendi. Bunun için ekstraksiyon verimi üzerine etkin deneysel koşullar; ekstraksiyon süresi (15-45 dakika), sıcaklık (30-70⁰ C), ultrason gücü (25-75 %) olarak seçilmiştir. Bu parametrelerin en iyi muhtemel kombinasyonları Yüzey Yanıt Yöntemi ile elde edildi. İkinci dereceden polinom modelleri (kuadratik model) deneysel verilerin en iyi tanımlanmasını verdi. *Fraxinus Excelsior* yaprakları için optimum koşulların; ultrason gücünün % 39.12, ekstraksiyon süresinin 15.18 dakika, ekstraksiyon sıcaklığının 69.98 ⁰C olduğu belirlendi. Bu koşullarda maksimum klorojenik asit verimi 11.70 ppm olarak belirlendi. *Cynara Scolymus* yaprakları için ise optimum koşullar; ultrason gücünün % 47.65, ekstraksiyon süresinin 35.18 dakika, ekstraksiyon sıcaklığının 53.40 ⁰C olarak belirlendi. Bu koşullarda maksimum klorojenik asit verimi 10.05 ppm olarak belirlendi.

Ayrıca antioksidan aktivitelerini görmek amacıyla UV spektrometre ile dişbudak ağacı ve enginar yapraklarındaki toplam fenolik içerikleri ölçüldü. Kurutulmuş ve öğütülmüş yapraklar etanol ile ekstrakte edildi. Ölçüm için kör, standart ve numune olmak üzere 3 tüp hazırlandı. Her bir numune kabından örnekler alınarak UV spektrometrede 765 nm’de absorbans değerleri ölçüldü. Box-Behnken tasarımına dayalı Yüzey Yanıt Yönteminin (RSM) kullanıldığı ultrasonik destekli ekstraksiyon ile Fraxinus Excelsior ve Cynara Scolymus yapraklarından toplam fenolik içeriğinin ölçülmesi için optimum koşulları belirlendi. Dişbudak yaprağı için optimum koşullar; ultrason gücü % 47.76, süre 29.69 dakika, etanol konsantrasyonu % 54.40 olarak belirlendi. Optimum koşullarda dişbudak yaprağındaki toplam fenolik içeriği 40.74 ppm olarak belirlendi. Enginar yaprağı için optimum koşullar; ultrason gücü % 47.29, süre 29.67 dakika, etanol konsantrasyonu % 55.33 olarak belirlendi. Optimum koşullarda enginar yaprağındaki toplam fenolik içeriği 70.24 ppm olarak belirlendi. Buna göre elde edilen bu sonuçlar klorojenik asit etken bileşeninin ekstraksiyonu için Ultrasonik Destekli Ekstraksiyonun (UAE) etkili bir metod olabileceğini göstermiştir.

Bu çalışma Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi tarafından desteklenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Klorojenik Asit, Dişbudak Ağacı Yaprakları (Fraxinus Excelsior), Enginar Yaprağı (Cynara Scolymus), Ekstraksiyon, Optimizasyon,

ABSTRACT

Plant nutrients, contain more or less the amount of phenolic compound. In particular, the color of the fruit and vegetables, phenolic substances which affect the taste and durability, depending on the antioxidant properties of anticancer, antimutagenic and in terms of showing antimicrobial activity is also closely related to human health. Leaf ash (*Fraxinus Excelsior*) and artichoke leaf (*Cynara scolymus*) extracts widely used in traditional medicine. The content of these plants has various compounds. One of these compounds is chlorogenic acid. Chlorogenic acids have antibacterial and antiviral properties is an antioxidant compound. Chlorogenic acid beverages, cosmetics are used as ingredients in tea products and food. Also due to effective protection against the effects of lowering blood sugar and cancer chlorogenic acid is thought to be a useful compound in traditional medicine.

In this study, the collected ash (*Fraxinus Excelsior*) leaves and artichoke (*Cynara scolymus*) leaves were milled, dried without leaving part of the stem sun. Powdered portions were extracted with environment-friendly water. The extracts were analyzed by HPLC chromatographic system optimized gradient elution method, the results were expressed in ppm. Box-Behnken design based on Response Surface Method (RSM) optimum conditions of extracting chlorogenic acid from *Fraxinus Excelsior* used with the ultrasonic assisted extraction and *Cynara scolymus* leaves were determined. Effective on the experimental conditions for this extraction efficiency; extraction time (15-45 minutes), temperature (30-70⁰ C), ultrasound power (25-75%) are chosen. The best possible combination of these parameters were obtained by response surface method. The second order polynomial models (quadratic model) gave the best identification of experimental data. The optimum conditions for *Fraxinus Excelsior* leaves; 39.12% of the ultrasound power, 15.18 minutes of the extraction time, the extraction temperature was determined to 69.98⁰ C. The maximum yield of chlorogenic acid in these conditions was determined to be 11.70 ppm. *Cynara scolymus* leaves for the optimum conditions; 47.65% of the ultrasound power, 35.18 minutes of the extraction time, the extraction temperature was set at 53.40⁰ C. The maximum yield of chlorogenic acid in these conditions was determined to be 10.05 ppm.

In addition, the total phenolic content in ash and artichoke leaf by UV spectrometry in order to see their antioxidant activity was measured. Dried and ground leaves were extracted with ethanol. Blind for measurement, standards and samples were prepared, including 3 tube. Samples from each sample container based UV spectrometer at 765 nm absorbance values were measured. Box-Behnken response surface design based method (RSM) optimum conditions for measuring the total phenolic content from *Fraxinus Excelsior* used with the ultrasonic assisted extraction and *Cynara scolymus* leaves was determined.

Optimum conditions for the ash leaf; ultrasound power 47.76%, 29.69 min period, ethanol concentration was determined as 54.40%. The total phenolic content in ash leaves in optimum condition was determined as 40.74 ppm. Optimum conditions for the artichoke leaves; ultrasound power 47.29%, 29.67 min period, ethanol concentration was determined as 55.33%. Artichoke leaf total phenolic content in the optimum conditions were determined as 70.24 ppm. Accordingly, the results obtained according to the extraction of chlorogenic acid active ingredient ultrasonic assisted extraction (UAE) showed can be an effective method.

This study Scientific Research Projects (BAP) was supported by the unit.

Keywords: Chlorogenic Acid, Ash Tree Leaves (*Fraxinus Excelsior*), Artichoke leaf (*Cynara scolymus*), Extraction, Optimization,

TEŞEKKÜR

Öncelikle tez konumu seçmemde bana yardımcı olan, tezimin her aşamasında bilgi ve yardımlarını benden esirgemeyen tez danışmanım değerli hocam Yrd. Doç. Dr. İbrahim BULDUK'a teşekkür ederim.

Ayrıca tez çalışmalarım boyunca bana gösterdikleri sabır, hoşgörü ve destekleri için aileme çok teşekkür ederim.

Yakup ATICI
Kimya Mühendisi

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER LİSTESİ	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	x
RESİM LİSTESİ	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Dişbudak Ağacı.....	2
1.1.1. Dişbudak Ağacının Genel Özellikleri	2
1.1.2. Bitkisel Özellikleri ve Yetiştirme Şartları	3
1.1.3. Yayılışı	3
1.1.4. Ekolojisi	3
1.1.5. Botanik ve Anatomik Özellikleri	4
1.2. Enginar.....	4
1.2.1. Enginarın Genel Özellikleri	4
1.2.2. Bitkisel Özellikleri ve Yetiştirme Şartları	5
1.2.3. Yayılışı	6
1.2.4. Ekolojisi	6
1.2.5. Botanik ve Anatomik Özellikleri	7
1.3. Klorojenik Asit	9
1.3.1. Klorojenik Asitin Kullanımı ve Önemi	10
1.3.2. Kimyasal, Fiziksel ve Biyolojik Özellikleri	13
1.4. Literatür Değerlendirmesi.....	14
2.EKSTRAKSİYON	18
2.1. Soxhlet Ekstraksiyonu	18
2.1.1. Soxhlet Ekstraksiyonunun Uygulamaları.....	20

2.2. Basınçlı Sıvı Ekstraksiyonu (PLE)	21
2.2.1. PLE Uygulamaları.....	24
2.3. Mikrodalga Destekli Solvent Ekstraksiyonu (MAE).....	25
2.3.1. MAE Uygulamaları	28
2.4. Ses dalgaları-destekli sıvı ekstraksiyonu	30
2.4.1. SAE Uygulamaları	32
2.5. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu (SFE).....	33
3. HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi).....	36
3.1. HPLC Cihazı.....	37
3.2. HPLC de Kolon Seçimi	38
3.3. İzokratik ve Gradient Ayırma	41
3.4. Kromatografide Temel Parametreler	42
3.4.1. Alıkonma Zamanı ve Kapasite Faktörü	43
3.4.2. Seçicilik.....	44
3.4.3. Teorik Tabaka Sayısı.....	44
3.4.4. Ayırma Gücü	44
3.4.5. Kuyruklanma Faktörü	46
3.5. Mobil Faz Optimizasyonu	47
3.6. Mobil Faz pH Standardizasyonu.....	47
3.7. Alıkonmaya Etki Eden Faktörler	48
3.8. Validasyon Parametreleri.....	51
3.8.1. Doğruluk.....	51
3.8.2. Kesinlik	52
3.8.3. Seçicilik.....	54
3.8.4. Teşhis Sınırı (LOD).....	54
3.8.5. Tayin Alt Sınırı.....	55
3.8.6. Doğrusallık	55
4. MATERYAL VE METOT	58
4.1. Kullanılan Materyal	58
4.2. Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon	58
4.3. Kromatografik Koşullar (HPLC Metodu).....	61
4.3.1. HPLC Analiz Metodunun Validasyon Çalışmaları	62

5. UV – VİS SPEKTROMETRE	65
5.1.Çalışma İlkesi	65
5.2.Ultraviyole (morötesi) / Visible (Görünür Bölge) Moleküler Absorpsiyon Ölçümü	65
5.3. UV Spektrometre Cihazının Kısımları	66
5.3.1. Işın Kaynağı	66
5.3.2. Monokromatör.....	66
5.3.3. Numune	67
5.3.4. Dedektör	67
5.3.5. Veri Kaydetme	68
5.4. UV-Vis Spektrometrede Analiz Metodu	68
5.4.1. Ekstraksiyon	69
5.4.2. Numunelerin UV Spektrometre için Hazırlanması	70
5.5. Toplam Fenolik Sonuçları	71
6. SONUÇLAR	72
6.1. Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon Performansı Üzerine Proses Değişkenlerinin Etkisi	72
6.2. Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon Performansı Üzerine Ekstraksiyon Zamanının Etkisi	73
6.3. Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon Performansı Üzerine Ekstraksiyon Sıcaklığının Etkisi	75
6.4. Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon Performansı Üzerine Ultrason Gücünün Etkisi ..	76
6.5. Yüzey Yanıt Metoduyla Ultrasonik Destekli Ekstraksiyonun Optimizasyonu	81
6.6.Model Uygunluğu	84
7. TARTIŞMA VE SONUÇ	88
8. KAYNAKLAR	91

ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge 1. Klorojenik asitin kimyasal özellikleri	13
Çizelge 2. Kullanılan klorojenik asit standardının özellikleri	58
Çizelge 3. Bağımsız değişkenlerin değerleri ve sembolleri	60
Çizelge 4. Deney koşulları.....	61
Çizelge 5. HPLC metodu.....	62
Çizelge 6. Analitik metodun validasyonu süresince farklı parametrelerin testinden elde edilen sonuçlar	62
Çizelge 7. Kalibrasyon tablosu.....	63
Çizelge 8. UV analizi için ekstraksiyon deney koşulları.....	69
Çizelge 9. Dişbudak yaprağında toplam fenolik içerik sonuçları.....	71
Çizelge 10. Enginar yaprağında toplam fenolik içerik sonuçları	71
Çizelge 11. Dişbudak yaprağı ekstraksiyon verimi için deneysel sonuçlar	72
Çizelge 12. Enginar yaprağı ekstraksiyon verimi için deneysel sonuçlar	73
Çizelge 13. Dişbudak yaprağı ANOVA tablosu.....	85
Çizelge 14. Enginar yaprağı ANOVA tablosu	86

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Klorojenik asitin kimyasal yapısı	13
Şekil 2. Soxhlet ekstraktör cihazı	19
Şekil 3. MAE'de kapalı ve açık sistem	27
Şekil 4. Isıtma modelleri.....	28
Şekil 5. Dinamik ses dalgaları-destekli ekstraksiyonun şematik gösterimi A) Açık	31
sistem B) Kapalı sistem	31
Şekil 6. Dinamik ses dalgaları-destekli sıvı ekstraksiyonun analiz sistemine bağlanmasının şematik gösterimi.....	32
Şekil 7. Küçük kolonlarda ses dalgaları-destekli ekstraksiyonun şematik gösterimi.....	32
Şekil 8. SFE Sistemi	34
Şekil 9. Hidrofobik karakterli analitin apolar yüzeyle etkileşimi; A: çok polar analit.....	37
B: az polar analit.....	37
Şekil 10. Sıvı kromatografi cihazının şematik görünüşü.....	38
Şekil 11. Standart kolon donanımı	39
Şekil 12. Durgun Faz: Silika SiO ₂	39
Şekil 13. Uzun zincirli hidrokarbon grupları ile alkilenmiş silika	40
Şekil 14. Karbon Yükleme.....	41
Şekil 15. Kolonda analit bileşenlerinin ayrılması ve kromatogram	42
Şekil 16. Aynı pik çifti için üç farklı ayırma gücü	46
Şekil 17. Kuyruklanma faktörünün kromatogram üzerinde gösterilişi	46
(Tf=W _{0,05} /2f)	46
Şekil 18. Asit, baz ve nötral bileşikler için alıkonma faktörüne karşı pH grafiği	50
Şekil 19. Hidrofobik yüzeyde protonlanmış bazın alıkonmasında kaotropik madde.....	50
etkisi	50
Şekil 20. Standartların doğrusallığı	63
Şekil 21. Kalibrasyon doğrusallığı	64
Şekil 22. Dişbudak ağacı yaprağında klorojenik asit veriminin ekstraksiyon zamanıyla değişimi	74

Şekil 23. Enginar yaprağında klorojenik asit veriminin ekstraksiyon zamanıyla değişimi	74
Şekil 24. Dişbudak ağacı yaprağından klorojenik asit ekstraksiyon veriminin sıcaklıkla değişimi	75
Şekil 25. Enginar yaprağından klorojenik asit ekstraksiyon veriminin sıcaklıkla değişimi	76
Şekil 26. Dişbudak ağacı yapraklarından klorojenik asit ekstraksiyon veriminin sıcaklıkla değişimi	76
Şekil 27. Enginar yaprağından klorojenik asit ekstraksiyon veriminin sıcaklıkla değişimi	77
Şekil 28. Dişbudak ağacın yaprağından klorojenik asit ekstraksiyon veriminin tüm değişkenler ile değişimi grafiği (A: Ultrason gücüB: Zaman, C: Sıcaklık)	77
Şekil 29. Enginar yaprağından klorojenik asit ekstraksiyon veriminin tüm değişkenler ile değişimi grafiği (A: Ultrason gücü, B: Zaman, C: Sıcaklık).....	78
Şekil 30. Ekstraksiyon sıcaklığına zaman oranının bir fonksiyonu olarak dişbudak ağacı yapraklarından klorojenik asit verimi için yüzey yanıt grafiği	78
Şekil 31. Ekstraksiyon sıcaklığına zaman oranının bir fonksiyonu olarak enginar yapraklarından klorojenik asit verimi için yüzey yanıt grafiği	79
Şekil 32. Ekstraksiyon zamanına ultrason gücü oranının bir fonksiyonu olarak dişbudak ağacı yapraklarından klorojenik asit verimi için yüzey yanıt grafiği	79
Şekil 33. Ekstraksiyon zamanına ultrason gücü oranının bir fonksiyonu olarak enginar yapraklarından klorojenik asit verimi için yüzey yanıt grafiği	80
Şekil 34. Ekstraksiyon sıcaklığına ultrason gücü oranının bir fonksiyonu olarak dişbudak ağacı yapraklarından klorojenik asit verimi için yüzey yanıt grafiği	80
Şekil 35. Ekstraksiyon sıcaklığına ultrason gücü oranının bir fonksiyonu olarak enginar yapraklarından klorojenik asit verimi için yüzey yanıt grafiği	81
Şekil 36. Dişbudak yaprağı için denklemden elde edilen değerler ile deneysel verilerin karşılaştırılması.....	82
Şekil 37. Enginar yaprağı için denklemden elde edilen değerler ile deneysel verilerin karşılaştırılması.....	83
Şekil 38. Klorojenik asit standardının kromatogramı.....	87
Şekil 39. Dişbudak yaprağı ekstraktının kromatogramı	87
Şekil 40. Enginar yaprağı ekstraktının kromatogramı.....	87

RESİM LİSTESİ

Resim 1. Dişbudak ağacı ve yaprakları	2
Resim 2. Enginar ve yaprakları	5
Resim 3. Enginar kökleri	8
Resim 4. Yeşil kahveden elde edilen klorojenik asit.....	14
Resim 5. Ultrasonik banyoya konmaya hazır numune	59
Resim 6.Ultrasonik banyo sonrası ilk filtrasyon işlemi.....	59
Resim 7. 0,45 mikronluk membran ile vialle filtrasyon işlemi (sağda).....	60
Resim 8. UV spektrometrenin uygulama fotoğrafları	65
Resim 9. Analizde kullanılan UV spektrometre	68
Resim 10. UV spektrometreye yerleştirilen kuvvetler	70

1. GİRİŞ

Klorojenik asit bitkinin tohumlarında, köklerinde ve yapraklarında doğal olarak bulunan bir bileşiktir. Klorojenik asitin en yaygın bilinen kaynakları kahve, enginar yaprağı, dişbudak yaprağı, kayısı yaprağı, patlıcan, erik, kivi, ısırgan otu gibi kaynaklardır. Büyük miktarda ve yüksek saflıkta klorojenik asit üretmek için araştırmalar her geçen gün artarak devam etmektedir. İlaç endüstrisi özellikle etkin maliyetli ve çevre dostu üretim yöntemleriyle ilgilenmektedir. Klorojenik asit ülkemizde üretilmemekte olup hem ilaç formunda hem de ilaç etken maddesi olarak ithal edilmektedir. Adı geçen bitkilerin yapraklarından klorojenik asit izole edilmesi ve saflaştırılması için kolay uygulanabilir bir metodun geliştirilmesi ile ülkemiz ilaç ve kimya sanayii için önemli bir gelişme olacağı düşünülmektedir. Bitkilerden doğal klorojenik asit geleneksel olarak solvent ekstraksiyonu yöntemiyle üretilir. Geleneksel üretim yöntemlerinde çevre ve insan sağlığını olumsuz etkileyecek toksik kimyasallar kullanılmaktadır. Geleneksel yöntemlerde üretim süreleri uzun ve maliyet yüksektir. Kısa ekstraksiyon zamanı, minimum organik solvent tüketimi ve çevre dostu yeni ekstraksiyon tekniklerine artan bir talep vardır. Ultrasonik destekli ekstraksiyon ucuz, basit ve geleneksel ekstraksiyon tekniklerine alternatiftir. Ancak dişbudak yaprağı ve enginar yaprağı ile ilgili olarak yaygın bir ekstraksiyon prosedürü mevcut değildir. Ekstraksiyon metodu tasarlanmalı ve optimize edilmelidir. Ekstraksiyon için solvent tipi, solvent konsantrasyonu, katı/solvent oranı, ekstraksiyon sıcaklığı, ekstraksiyon süresi ve ultrason gücü endüstriyel prosesi etkileyen işletme parametreleridir. Prosesi optimize etmek için diğer işletme parametreleri arasında muhtemel etkileşimler düşünülmelidir. Response surface methodology (RSM) işletme parametreleri arasındaki muhtemel etkileşimleri göz önünde bulundurur. RSM prosesin optimizasyonu, iyileştirilmesi ve geliştirilmesi için kullanılan istatistiksel ve matematiksel tekniklerin birleşimidir.

Bu çalışmada ekstraksiyon koşulları sağlandıktan sonra uygun HPLC metoduyla dişbudak ağacı yaprağı ve enginar yaprağında klorojenik asit miktarları belirlenmiştir. Ayrıca UV spektrometre ile numunelerdeki toplam fenolik içeriği belirlenmiştir.

1.1. Dişbudak Ağacı

1.1.1. Dişbudak Ağacının Genel Özellikleri

Dişbudak, zeytingiller (Oleaceae) familyasının Fraxinus cinsini oluşturan türüne göre maksimum boyu 10-35 m arasında değişebilen dolgun ve düzgün gövdeli yuvarlak tepeli ağaç türlerinin ortak adıdır. Kuzey yarıkürede yetişen 70'e yakın türü bulunan dişbudak cinsi üyelerinin bazılarında, Kuzey Afrika, Güney Asya, Cava gibi uzak güney bölgelerinde de rastlanır. Aşağı yukarı tümü, yapraklanmadan önce salkım biçiminde çiçek açar; odunları sert ve değerlidir. Yaprak döken veya bazen herdem yeşil ağaç veya çalı formunda olabilirler. Olgun odunlu ağaçlar gurubundandır. Dış odunu geniştir. Sert ağır, sıkı yapılı bir ağaçtır. Kolay işlenir ve zor yarılr. Kuru ortamda dayanıklıdır. Havanın değişen etkilerinden çabuk bozulur. Böcekler ve mikroorganizmalar tarafından kolay yıkılamaz [1].



Resim 1. Dişbudak ağacı ve yaprakları

1.1.2. Bitkisel Özellikleri ve Yetiştirme Şartları

Cinsin örnek türü dişbudak ya da Avrupa dişbudağının (*Fraxinus excelsior*) yüksekliği 35 m'yi, çevresi 3 m'yi bulabilir. Genellikle sulak ya da derin toprağa sahip yerlerde bulunurlar. Dişbudak ağacının büyüme potansiyeli yetiştiği toprağın fiziksel özellikleriyle yakından ilişkilidir. Bu bitki verimli topraklarda yetişir ve bu topraklar genelde pH değeri 5.5' ten büyük topraklardır. Kireç yönünden zengin topraklar üzerinde yetişen bu ağaçlar büyük bir ormanlık alan oluşturabilir. Nemli toprak koşulları gerektirdiğinden kuraklığa eğilimli alanlarda yaygın değildir. Kökleri aşırı uzadığından ekilebilir alanlara yakın yerlerde yetiştirilmemelidir [2].

1.1.3. Yayılışı

Genelde Avrupadan Kırım ve Kafkasyaya kadar, Avrupanın ve Batı asyanın en çok rastlanan ağaçlarından. Bu ağaçlar özellikle Britanya' da daha geniş yaygınlık gösterir [3]. Türkiye'de de kıymetli bir orman ağacımızdır. Trakya, Kocaeli ve Karadeniz bölgesi, (İzmit, Çankırı, Kastamonu, Samsun, Ladik, Amasya, Gökçedağ, Maraş(Ahır dağı), Mersin(Toros dağları) havalisindeki ormanlar, Kuzey Anadolu dağları) gibi alanlarda yaygındırlar.

1.1.4. Ekolojisi

Dişbudak ağacı nemli, yarı nemli yerlerden hoşlanır, durgun sulardan hoşlanmaz, Sulak yerlere dikim yapılırken özellikle nehir kenarları ve vadiler tercih edilmelidir. Rutubetli toprakları sever. Humusça fakir, kireçli topraklardan hoşlanır. İlk 15-20 yıl çok hızlı büyür sonraki yıllarda 75-100 yaşlarında büyüme yavaşlar. Genelde Avrupa ve Asya' da yaygın olan dişbudak ağaçlarının birçok çeşidi vardır. Dişbudak ağaçları Türkiye'de ise genelde Marmara Bölgesi ve Karadeniz Bölgesi'nde yaygındır [4].

1.1.5. Botanik ve Anatomik Özellikleri

Dişbudak ağacı boyu genelde 30-40 metreye kadar uzayabilen yaprak dökken bir ağaçtır. Yeşilimsi-gri dallara sahiptir. Ayrıca sert ve çıkıntılı bir gövdeye sahiptir. Dişbudak ağacının yaprakları ise 20-35 cm aralığında değiştiği gözlemlenmiştir. Gövde dik, karşılıklı dallı, üzerinde esmer lekeler bulunan gri renkli kabukludur. Olgun ve düzgün gövdeli bir ağaçtır. Gövde yaşlandıkça boz bir renk alır ve derin çatlaklar oluşur. Dallar karşılıklıdır. Tomurcuklar piramit şekilli, siyah renklidir. Üzerleri tüsüzdür. Çiçekler yapraklanmadan önce açar. Çiçekler önce dik durur, sonra aşağı sarkarlar. Panikul durumlar yaratır. Hermafrodit, erkek veya dişidir. Çiçek örtüsü olmadığı için bitkiye çiçeksiz denir. Çanak yaprakları yoktur. Erkek çiçekler, filamentleri kısa, çiçek tozu korbaları kırmızı renkte, 2-3 etaminden meydana gelir. Dişi çiçeğin ise stıgması iki parçalı olan ovaryumu, iki tane de kürek biçiminde steril etamini vardır. Budamaya çok az gereksinim duyar. Sadece kurumuş, kırılmış, şekli bozulmuş dallar kesilerek çıkarılır [5].

1.2. Enginar

1.2.1. Enginarın Genel Özellikleri

Enginar (*Cynara scolymus*), papatyagiller familyasından mavi-mor renkli çiçekler açan, 50–150 cm boyunda çok senelik otsu bir bitkidir. Güney Avrupa ve Akdeniz çevresinde yetişir. Gövdeleri dik, kuvvetli, sert ve boyuna olukludur. Yaprakları sapsız, büyük, uzun-oval ve parçalıdır. Çiçekler üst yaprakların koltuğundan çıkan, uzun sapların ucunda büyük başçıklar halinde toplanmıştır. Çiçek tablası etlidir. Hepsi tüp şeklinde olan çiçekleri ve bunların aralarında bulunan tüyleri taşır. Killi, kumlu ve rutubetli topraklarda yetiştirilir. Gövde dik, kuvvetli, sert ve boyuna oluklu. Yapraklar sapsız, stipulasız ve alternan dizilişli. Lamina büyük, uzun, oval ve parçalıdır. Akdeniz'e kıyısı bulunan ülkelerde doğal olarak yetişen enginar genellikle yemeklerde kullanılır. Ancak tadının yanı sıra kurutulmuş yaprakları farklı sağlık sorunlarının tedavisinde kullanılmaktadır. Ayrıca düşük kalori oranıyla pek çok diyet listesinde kendine yer bulan enginar papatya familyasındandır. Enginarın en çok kullanıldığı rahatsızlıklar arasında sindirim sistemi sorunları ilk sırada gelmektedir.



Resim 2. Enginar ve yaprakları

1.2.2. Bitkisel Özellikleri ve Yetiştirme Şartları

Enginar genel olarak Türkiye'de ve birçok ülkede vegetatif yolla üretilmektedir. Fransa, İtalya ve İspanya'da doğrudan tohumla üretilen çeşitler geliştirilmiştir. Enginarda vegetatif yolla üretim dip sürgünleri veya üzerinde gözlerin bulunduğu kök parçaları ile yapılabildiği gibi sadece gözlerin ana gövdeden çıkarılıp değişik ortamlarda köklendirilerek de yapılabilir. En yaygın üretim şekli sürgünlerle yapılan üretilimdir. Yeni kurulacak Enginar plantasyonlarında dikiminden önce toprak derin sürülmeli ve gübrenmelidir. Derin sürümden sonra diskaro ve tırmık çekilerek toprak dikime hazır duruma getirilmelidir. Dikim genellikle Akdeniz ve Ege bölgesinde Ekim–Kasım aylarında, Marmara bölgesinde ise Mart–Nisan aylarında yapılır. En uygun dikim masuraları üzerine sıra arası ve üzeri 1x1 m mesafe ile yapılır. Özellikle Bursa Doğan köyü ve keramet köyünde meşhurdur. *Cynara scolymus*'un ülkemizde, Kuzey ve Batı Anadolu da kültürü yapılır. Bu yerler başlıca İstanbul, Trabzon ve İzmir çevresidir. Enginarın vatanı kesin olarak bilinmemektedir. Esasen kültür bitkilerinin vatanını tespit etmek çok güçtür, çünkü kültüre alındıktan sonra birçok yere yayılmışlardır. *Cynara L.* türleri Akdeniz bitkisidir. Genellikle İtalya, Sicilya, Güney Fransa, başta Romanya olmak üzere Balkan ülkeleri, Mısır ve Suriye, A.B.D., Kaliforniya ve Kanarya Adalarında yetiştirilmektedir [6].

1.2.3.Yayılışı

Bileşik çiçekliler familyası sebze olan enginarın anavatanı Akdeniz havzası ve Kıbrıs adası olarak belirtilmektedir. Günümüzde Batı ve Doğu Akdeniz ülkeleri ile Kuzey Afrika ve Güney Avrupa ülkelerinde hem yabani formları hem de kültür formlarına bol miktarda rastlanılmaktadır. Enginar eski Yunanlılar ve Romalılar dönemlerinden beri bilinen ve bu dönemlerde kral sofralarının en geçerli yemeği olarak tüketilen bir sebzedir. Ayrıca günümüz tarihi kalıntılarında enginar başının sütun ve sütun başlıklarında bir motif olarak kullanılması enginarın 15. yüzyıldan beri sebze olarak değerlendirildiğini ve enginara verilen önemi göstermektedir. Avrupa'dan 16. yüzyılda Fransa, Almanya ve İngiltere'ye yayılan enginar 17. yüzyılda Amerika'ya girmiştir. Ülkemizde Ege, Marmara ve Akdeniz bölgelerinde yapılan üretimin % 55'i Ege, % 45'i ise Marmara bölgesinde gerçekleştirilmektedir. Akdeniz bölgesindeki üretim şimdilik önemli boyutlarda değildir. Toplam enginar üretimimiz 24.500 ton civarındadır. Enginar çok yıllık bir sebzedir. Bulunduğu yerde 8-10 yıl kalabilir ve ürün vermeye devam eder. Ancak ekonomik bir üretim için 5-6 yılda bir plantasyonun yenilenmesi gerekir [7].

1.2.4. Ekolojisi

Enginar, ılık iklimlerde yetişen kışlık bir sebzedir. Çok soğuk ve sıcaktan hoşlanmaz. Kış aylarında sıcaklık 0°C altına düşerse yaprak ve başlarda önemli zararlar oluşur. 20°C üzeri sıcaklıkta gelişme yavaşlar, 25°C üzerinde ise gelişme durur. Sıcak ve kurak koşullarda baş sertleşerek kalite düşer. Enginar üretilen bölgelerdeki ilk donlar da önemli zararlar verir. Erkenci özellik gösteren çeşitlerde, erkenci ve turfanda ürünün oluşumu engellenir. İlkbahar döneminde oluşan kurak ve sıcak havalar ise özellikle geç konservelik çeşitlerde başların küçük kalmasına, gevrekliğinin azalmasına, acılaşmasına ve liflenmeye neden olur. Artan sıcaklık ile başlar hemen çiçeklenmeye geçer ve verim düşer. Ege, Marmara ve Akdeniz Bölgelerinde hüküm süren ılık ve nemli iklim şartları enginar üretimi için son derece elverişlidir. Optimum gelişme sıcaklığı 15–18°C'dir.

Bunun yanında iyi bir hava nemi ve sulama koşulları sağlanmalıdır. Enginarın kışları donsuz, yazları serin ve bulutlu hatta sisli geçen serin iklimlerde en iyi gelişme gösterir.

Enginar; çok yıllık bitki olduğundan derin bünyeli, humusça zengin ve iyi drene edilmiş topraklardan hoşlanır. Çok hafif karakterli kumluveya çok ağır karakterli toprakları sevmez. Hafif kumlu topraklarda daha erken verim alınması ve erkencilik sağlaması yanında başların küçük kalması ve verimin azalması en önemli dezavantajdır. Bu tip topraklarda çok iyi sulama yapılmalıdır. Ağır karakterli topraklarda ise çok yıllık olan kökler havasız kalarak çürür. Enginar için toprak pH'ı 6,0-6,5 olmalıdır. Topraktaki organik madde miktarının ise % 2 civarında olması gerekir. Güneye meyilli yamaç arazilerinin erken ısınması nedeniyle erkenci enginar üretiminde başarılı olarak kullanılabilir [8].

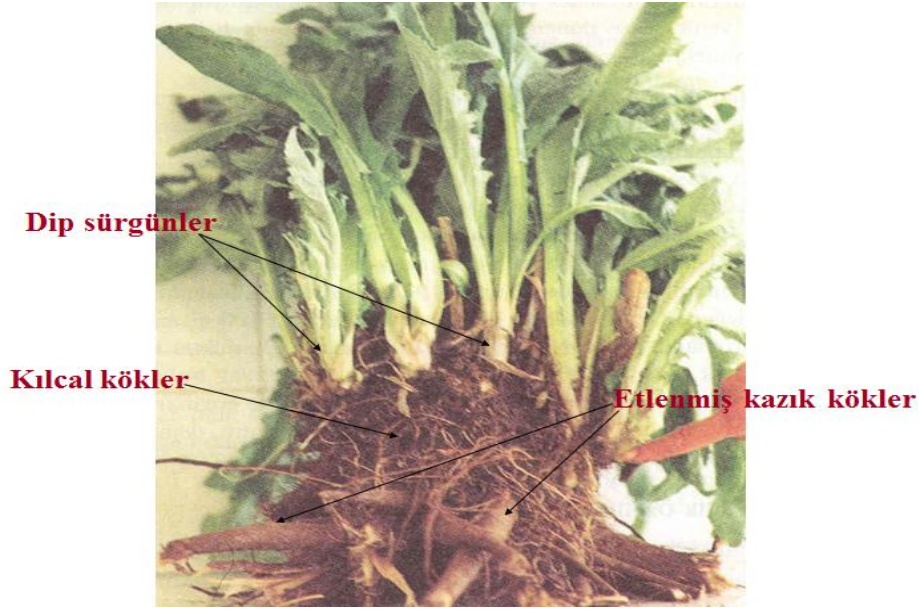
1.2.5. Botanik ve Anatomik Özellikleri

Enginar toprak üstü tek yıllık, toprak altı çok yıllık olan bir türdür. Enginar tohumla ya da dip sürgünleri ile çoğaltılmaktadır. Enginar 8-10 yıl kalabilir, 5-6 yılda plantasyon yenilenmelidir.

Dip sürgünleri toprak yüzeyine çıkarken yanlara doğru ipliksi kökler oluşturur. Bu kökler dikimden sonra ölürler. Dikimden sonra dip kısımdan 10-15 adet kalın ve güçlü kökler gelişmeye başlar. Sürgünün altına rastlayan birkaç kök depo maddelerini biriktirerek kalınlaşır. Bu kökler üzerinde fazla dallanma yoktur. Etli kök alttan dallanır. Etli köklerin üzerinde dip sürgünlerini oluşturacak meme denilen uyur gözler oluşur. Yanlarda kalanların üzerinde ise yan kılcal kökler vardır. Hasat döneminde 70 cm derine ve 90 cm genişliğe ulaşmış bir kök sistemi oluşur. İyi toprak koşullarında kökler 120 cm kadar inebilir.

Enginarda toprak üstü ve toprak altı olmak üzere iki gövde vardır. Toprak altı gövde çok yıllık, toprak üstü ise tek yıllıktır. Toprak üstünde belli yaprak sayısından sonra yaprakların ortasından uzar ve çiçek sapını oluşturur. Toprak altında ise gövde 3 kısımdan oluşur. En alt kısım derindedir ve buradan etli kökler oluşur. Üzerinde 8-15 aksiller tomurcuklar vardır. Orta gövde üzerinde ipliksi kökler ve 15-20 aksiller tomurcuk bulunur. Gövdenin en üst kısmı toprağın üzerindedir ve 15-20 adet yaprak taşır. Bu yapraklar baş oluşumuna kadar görev yapar.

Dinlenme döneminde ve ilk gelişme döneminde büyüme noktası aktif değildir. Sıcaklığın uygun hale gelmesi ile büyüme noktası çiçek taslağı haline dönüşür ve çiçek sapını oluşturmak üzere uzamaya başlar. Gövde dallanır ve yan başlar da oluşabilir. Yazlık gövde üzerinde yukarıya doğru küçülen yapraklar bulunur. Üzeri tüylü, boyuna oluklu ve içi boştur. Yazlık gövde 1-2 m kadar uzayabilir. Çeşide bağlı olarak antosiyanin oluşabilir.



Resim 3. Enginar kökleri

Yapraklar çok büyüktür. Yaprak boyu 1,2 m kadar olabilmektedir. Yaprak şekli uzun ve ovaldir. Yaprak ayası bütün, hafif parçalı veya parçalı olabilmektedir. Bazen aynı bitki üzerinde bütün ve parçalı yaprak aynı anda bulunabilmektedir. Yaprakların üzeri düz, gri ve yeşil alt yüzeyleri ise beyaz ince tüylerle kaplıdır. Çok güçlü yeşil aksam oluşturmaktadır (2,5-4,5 ton /da). Enginarın tüketilen kısmı olan çiçek tablası ve braktelerden oluşan yapıya baş denilmektedir. Her bitkide 1 ana 2-3 yan baş oluşur.

Büyüme ucu farklılaşır ve uzamaya başlar ve ucunda çiçek tablası ile son bulur. Büyüklük ve şekil çeşitlere ve bakım şartlarına göre değişir. Başlar; Uzun, Uzun oval, Omuzlu oval ve yuvarlak olabilir. Başların çapı 3-15 cm, baş yüksekliği 3-6 cm ve baş ağırlığı 200-700 g arasında değişmektedir. Başı oluşturan braktelerin sayısı, şekli ve büyüklüğü de çeşide göre değişmektedir. Braktelerin ucu sivridir. Bazılarında ise diken halini almıştır. Braktelerin dizilişi de sıkı ya da gevşek olabilmektedir.

Dıştaki brakteler koyu yeşil içte kalanlar ise açık yeşil olmaktadır. Bazı çeşitlerde brakteler menekşe-mor renkli de olabilmektedir.

Enginar toplu çiçekli sebze türlerindedir. Bir çiçek durumunda 600-1200 adet çiçek bulunabilir. Çiçekler erselik yapıdadır. Çiçekler mor-erguvani renktedir. Çiçeklenme dışarıdan başlar içe doğru ilerler. Enginarda protoandy vardır. Yabancı tozlanma görülür ve böceklerle tozlanır. Çiçeklenme 4-5 günde tamamlanır. Braktelerin içinde en dışta 1-2 iki sıra mor-erguvani renkte taç yapraklar bulur. Orta da ise çiçekler bulunur. Çiçekler tüylerle çevrilidir ve tüylerin ucunda tohumlar bulunur. Döllenmeden 30-40 gün sonra tohumlar olgunlaşır.

1.3. Klorojenik Asit

Bitkisel kaynaklı besinler çeşitli fenolik bileşikler içermektedirler. Özellikle meyve ve sebzelerin rengi, lezzeti ve dayanıklılığı üzerine etkili olan fenolik maddeler, antioksidan özelliklerine bağlı olarak gösterdikleri bazı aktiviteler bakımından insan sağlığı ile yakından ilişkilidir. Klorojenik asit antioksidan bir madde olarak bilinir. Kandaki şeker salımını yavaşlatır. Klorojenik asit bitkinin tohumlarında, köklerinde ve yapraklarında doğal olarak bulunan bir bileşiktir.

Klorojenik asitin en yaygın bilinen kaynakları kahve, enginar yaprağı, dişbudak yaprağı, kayısı yaprağı, patlıcan, erik, kivi, ısırgan otu gibi kaynaklardır. Büyük miktarda ve yüksek saflıkta klorojenik asit üretmek için araştırmalar her geçen gün artarak devam etmektedir. İlaç endüstrisi özellikle etkin maliyetli ve çevre dostu üretim yöntemleriyle ilgilenmektedir. Klorojenik asit ülkemizde üretilmemekte olup hem ilaç formunda hem de ilaç etken maddesi olarak ithal edilmektedir.

Adı geçen bitkilerin yapraklarından klorojenik asit izole edilmesi ve saflaştırılması için kolay uygulanabilir bir metodun geliştirilmesi ile ülkemiz ilaç ve kimya sanayii için önemli bir gelişme olacağı düşünülmektedir [9-10].

1.3.1. Klorojenik Asitin Kullanımı ve Önemi

Klorojenik asit tıpta ve sanayide kullanılan oldukça değerli bir polifenol bileşiktir. Bu kaynaklar sınırlı ve pahalıdır. Klorojenik asit içecek, kozmetik, çay ürünleri ve besinlerde katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Klorojenik asit antibakteriyel ve antiviral özelliklere sahiptir. Ayrıca bir doğal antioksidan ve anti-kanser maddedir. Büyük miktarda ve yüksek saflıkta klorojenik asit üretmek için araştırmalar her geçen gün artarak devam etmektedir. İlaç endüstrisi özellikle etkin maliyetli ve evre dostu üretim yöntemleriyle ilgilenebilmektedir. Klorojenik asit ülkemizde üretilmemekte olup hem ilaç formunda hem de ilaç etken maddesi olarak ithal edilmektedir. Adı geçen bitkilerin yapraklarından klorojenik asit izole edilmesi ve saflaştırılması için kolay uygulanabilir bir metodun geliştirilmesi ile ülkemiz ilaç ve kimya sanayii için önemli bir gelişme olacaktır.

Klorojenik asitin birçok faydası olduğu gözlemlenmiştir. Hayvanlar üzerinde yapılan yine başka bir araştırma da klorojenik asitin karaciğer iltihaplanmaları ile mide ülseri konusunda olumlu etkilerinin olduğunu gösteriyor. Fareler üzerinde yapılan araştırma, kahvede büyük oranda bulunan klorojenik asit adlı maddenin görme yeteneğindeki azalmayı önlediğini ortaya koymuştur. Araştırma, saf kahvede yüzde 7-9 oranında bulunan antioksidan özelliğine sahip bu maddenin ayrıca, glokoma, yaşlanma ve diyabet sonucu retinada meydana gelen bozulmaya bağlı oluşan krlklere de mani olabileceğini göstermiştir. Araştırmada farelerin gözlerine oksidatif stres ve retinada bozulmaya yol açan serbest radikallerin oluşmasına neden olan nitrik oksit maddesi uygulayan bilim adamları, bu durumun retinada bozulmaya neden olduğunu gözlemlemiştir [11]. Ancak, bu işlemden önce gözlerine klorojenik asit uygulanan farelerin retinalarındaysa hasar meydana gelmediği belirlenmiştir. Klorojenik asit ve buna bağlı ara ürünlerin insan sindirim sisteminde zmsendiğinin bilindiğini belirten araştırmacılar, kahve içmenin, bu maddenin kan retina bariyeri adlı tabakaya geçmesini kolaylaştırdığının kanıtlanması yönünde çalışmalarını sürdürdüklerini belirtmiştir. Araştırmacılar, kahve içmenin klorojenik asitin doğrudan retinayı iletilmesinde etkili olduğunun kanıtlanması halinde doktorların retinadaki hasarı önlemek için hastalarına uygun şekilde kahve hazırlamalarını tavsiye edebileceklerine dikkati çekmiştir.

Profesör Chang Y. Lee başkanlığında yapılan araştırma, Journal of Agricultural and Food Chemistry adlı bilimsel dergi ve Cornell Üniversitesi'nin internet sayfasında bilim dünyasına tanıtılmıştır. Göz küresinin iç yüzeyini kaplayan, ince, yarı saydam bir zar olan retina, içinde ışığa duyarlı milyonlarca hücre ve görsel bilgiyi alma ve düzenleme işlevi gören diğer sinir hücrelerini barındıran gözdeki hayati öneme sahip bir tabakadır. Retinanın, metabolik olarak son derece faal dokulara sahip olması nedeniyle yüksek seviyelerde oksijene ihtiyaç duyması, bu zardaki serbest radikaller ve antioksidan savunma hatları arasındaki dengenin bozulması olarak tanımlanan oksidatif strese yol açıyor. Retinanın oksijensiz kalması ve serbest radikallerin üretilmesi doku hasarı ve görme kaybının başlıca nedenlerini oluşturuyor. Vücuttaki hücreleri parçalayarak hücresel düzeyde büyük değişimlere ve zararlara yol açan saldırgan moleküler yapılara, serbest radikaller adı veriliyor. Antioksidanlarsa vücutta, yıpranmaya bağlı olarak ortaya çıkan yaşlanma, saçların ağarması, kemiklerin sararması, derinin buruşması, kalp rahatsızlıklarının ortaya çıkması gibi zarar verici etkileri olan serbest radikallere karşı vücuttaki ilk savunma hattını oluşturması nedeniyle sağlık açısından büyük önem taşıyor [11].

Ayrıca yemeklerden yarım saat önce alınan klorojenik asit; bağırsakta şekerin emilimini sağlayan sodyum ve potasyum mineralleriyle etkileşime geçerek, fazla şekerin kana geçmesini engeller. Böylelikle yemeklerden sonra kana karışan şeker miktarında yüzde 29-40 oranında azalma olur. Kana karışan şeker miktarında ki bu azalma özellikle diyabet hastalığına karşı korunmada son derece etkili olmaktadır [12].

Klorojenik asit pankreasta bulunan ve kan şekerinin düşmesini sağlayan insülin hormonunu etkileyerek engellerken, (Diyabet Hastalığının nedeni zaten insülin hormonunun yetersiz salınımıdır.) glukagon hormonunun salınımını arttırmaktadır. Glukagon hormonu insülinin tersine hücrelerden kana şekeri çekmekte ve böylelikle hücrelerde şeker birikimini engellemektedir. (Glukagon aynı zamanda açlık hissi vererek, iştahı da artırır.) Hücrelerde fazla şeker konsantrasyonu kanser hücrelerini besleyerek kanseri tetikleyebilmekte ve de fazla şeker hücrelerde yağa dönüşerek hücre ve doku yağlanması sonucu fazla kilo ve obeziteye sebep olabilmektedir. Diğer taraftan hücrelerden çekilen şeker kana karışacağı için kan şekerini arttırarak şekerin damarlarda zararlı hale gelmesine neden olur [12].

Kandaki şekerin fazlasının yağa dönüşmesi aynı zamanda damarların kireçlenmesine (tıkanmasına) neden olabilir ki bu durumda kalp yetmezliği ve kalp krizini tetikler. Zaten kalp damar hastalıklarının kökeninde de kan damarlarındaki şeker ve yağ fazlasından kaynaklanan bu kireçlenme yani damar daralması yatmaktadır. Damar tıkanıklığını engellemek için alınması gereken klorojenik asit miktarı için içilmesi gereken kahve içeriğindeki kafein oranı zaten kafein zehirlenmesi yapacağından damarlarda fizyolojik bir büzülme/daralma ve su kaybı, kalp çarpıntısı yapacaktır. Fazla şeker-yağ kanda ve hücrede solunan havadaki oksijenle tepkimeye girerek toksik radikal adı verilen zararlı maddeler açığa çıkarır. Bu zararlı maddeler damar çeperlerinde birikerek damar tıkanıklığı ve takibinde kalp ve damar hastalıklarına, mide yüzeyini tahrip ederek gastrit ve ülser, eklemlerde birikerek eklem iltihaplanmasına (artrit), beyin damarlarında birikip bu damarları daraltarak Alzheimer ve Parkinson gibi nörolojik hastalıklara neden olabilmektedir. Bu toksik radikallerin zararlarını önlemek için günlük 7 su bardağı yeşil kahve içmek yerine içeriğinde bol miktarda antioksidan barındıran makul miktarda meyveler yemek daha uygun olur. Klorojenik asitin vücuttaki şekeri düşürüp düşürmediğini araştırmak amacı ile 56 sağlıklı erkeğe şeker yüklem testi yapılmış ve ardından deneklere 100 ile 400 mg arasında değişen klorojenik asit tabletleri verilmiştir. Deneklerden belirli sürelerde alınan kan örneklerinde yapılan analizler, klorojenik asit miktarı arttıkça kandaki şeker miktarının doğru orantılı olarak hızla düştüğünü göstermiştir [12].

Klorojenik asit konsantrasyonu arttıkça kandaki şeker miktarı hızla düşmüştür.

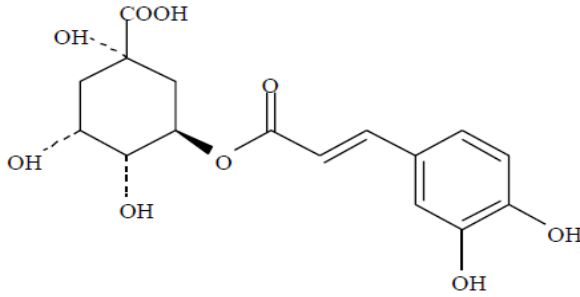
- **30 dakika sonra:** 400 mg lik klorojenik asit tableti verilen deneklerin kanındaki glukoz miktarı % 24 oranında düşmüştür (klorojenik asit verilmemişlere göre).
- **2 saat sonra:** yapılan kan testinde 400 mg lik klorojenik asit tableti verilen deneklerin kanındaki glukoz miktarı % 31 oranında düşmüştür.

Bu test sağlıklı insanlar yapılmış olup bir sonraki araştırmanın diyabet 2 hastaları ile yapılması planlanıyor [12].

Klorojenik asit bunların yanısıra zayıflamaya da katkıda bulunur. Klorojenik asidin ortalama olarak günlük 600-1000 mg miktarlar arasında vücuda alınması kansere karşı korunma ve kilo vermek açısından gereklidir. Bu noktada karşılaşılan asıl sorun, 600-1000 mg arasındaki kilo vermeye ve kansere karşı korunmaya yetecek klorojenik asit miktarlarını ancak 7 su bardağı ve üzerindeki kahve tüketimleri ile gerçekleştirebilmemiz ki bu kadar fazla kahve tüketimi ise vücuda günlük 600 mg ve üzerinde kafein alımı sağlamakta ve neticesinde bu derece fazla kafein alımının getirdiği ciddi hayati sağlık sorunlarına neden olmaktadır.

1.3.2. Kimyasal, Fiziksel ve Biyolojik Özellikleri

Klorojenik Asit



Şekil 1. Klorojenik asitin kimyasal yapısı

Klorojenik asit kafeik ve quinik asitin bir esteri olup, doğal bir kimyasal bileşiktir. Lignin biyosentezinde önemli bir ara üründür [13].

Çizelge 1. Klorojenik asitin kimyasal özellikleri

Kimyasal Özellikleri	
Molekül formülü	$C_{16}H_{18}O_9$
Molar kütle	$354.31 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$
Yoğunluk	1.28 g/cm^3
Erime noktası	$207 \text{ }^\circ\text{C}$ ($405 \text{ }^\circ\text{F}$; 480 K)

Önceden yapılan çalışmaların raporlarında klorojenik asitin kan basıncını düşürdüğü gözlemlenmiştir [14-15]. Yine başka bir çalışmada, klorojenik asitin müshil etkisi yaptığı ortaya konulmuştur [16]. Klorojenik asit insanlardaki bazı bitkilere karşı allerjik durumlarında bir duyarlaştırıcı olduğu öne sürülmektedir [17]. Ayrıca fareler üzerinde yapılan çalışmalarda klorojenik asitin, psikostimülan (Merkezî sinir sistemindeki nöronları doğrudan veya disinhibisyon suretiyle uyaran ilaçların bir grubu) etkilere sahip olabileceği gözlemlenmiştir [18]. Bunların yanısıra klorojenik asitin, nöroenflamatuvar koşullarda dopaminerjik nöronlar üzerinde yapılan çalışmalarda koruyucu etkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir [19].



Resim 4. Yeşil kahveden elde edilen klorojenik asit

1.4. Literatür Değerlendirmesi

Bitkisel kaynaklı besinler içeriğinde birçok yararlı bileşiği barındırır. Bu nedenle bitkiler geçmişten günümüze çeşitli alanlarda araştırma materyali olarak kullanılmıştır. Bütün bitkiler metabolizmaların da kendilerini zararlılara karşı korumak için çok sayıda fenolik madde oluşturmaktadırlar. Fenolik bileşikler meyve ve sebzelerin kendilerine özgü buruk veya acı tadını verirler. Fenolik bileşiklerin bir diğer özelliği ise antioksidan özelliğidir. Bitkisel kaynakların antioksidan özelliklerinden dolayı içeriğindeki fenolik bileşiklerle ilgili birçok araştırma yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda bitkilerden klorojenik asit, kafeik asit, arbutin, sinarin gibi bir çok bileşiğin yanında toplam fenolik madde içerikleri de araştırılmıştır.

Bu araştırmalar yapılırken önceki yapılan çalışmaların avantaj ve dezavantajları göz önüne alınarak uygulanabilir metod yöntemlerinin geliştirilmesi de amaçlanmıştır.

Çalıştığım tezin ilk aşamasında dişbudak ağacı yaprağı ve enginar yaprağından klorojenik asit ekstraksiyonun HPLC ile optimizasyonu yapıldı. İkinci aşamasında ise bu bitkilerdeki antioksidan kapasitelerini ölçmek amacıyla toplam fenolik içerikleri belirlendi. Bu çalışmalar geleneksel ekstraksiyon tekniklerine göre daha avantajlı alternatif ekstraksiyon tekniğinin ultrasonik destekli ekstraksiyon yöntemin olduğunu göstermek amacıyla yapıldı. Literatür araştırmalara göre dişbudak ağacı yaprağı ve enginar yaprağında klorojenik asit ekstraksiyonunun optimizasyonu ile ilgili herhangi bir çalışma yoktur. Bunun yanı sıra bu iki bitki yaprağında toplam fenolik madde tayini ile ilgili de bir çalışma mevcut değildir. Ancak farklı bitkilerin klorojenik asit içeriği ve toplam fenolik madde içerikleri ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalardan bazıları aşağıda verilmiştir.

Jan Fritsche, Christaan M. Beindorff, Markus Dachtler, Hui Zhang ve Jan G. Lammers adlı araştırmacılar 2002 yılında, HPLC-MS ile enginar yaprağında bulunan bileşiklerin izole edilmesi, belirlenmesi ve karakterizasyonu adlı çalışmayı gerçekleştirmişlerdir. Çalışma sonucunda HPLC-MS tekniğinin başarılı bir yöntem olabileceği ortaya konulmuştur. Bu çalışmanın ilk aşaması olan numune hazırlanmasında çevre ve insan sağlığına zararlı organik çözücüler kullanılmıştır.

Alaa A. Gaafar, Zeinab A. Salama adlı araştırmacılar 2013 yılında enginardaki fenolik bileşiklerle yan ürünlerin antimikrobiyal etkileri adlı çalışmayı yapmışlardır. Çalışma sonucunda enginarda çeşitli fenolikler, flavonoidler ve diğer metabolitler olduğu ortaya konulmuştur. Bunların geleneksel tıpta kullanılabileceği ileri sürülmüştür. Ancak bu çalışmada da organik çözücüler kullanıldığı için insan sağlığı için tehlikelidir.

María Rosario Alonso, María del Carmen Garcia, Claudia García Bonelli, Graciela Ferrero ve Modesto Rubio adlı araştırmacılar, 2006 yılında biyolojik örneklerinde sinarin adlı bileşiği belirlenmesi için HPLC metod optimizasyonu adlı çalışmayı yapmışlardır. Sinarin adlı bileşin izole edilmesi için HPLC ve ekstraksiyon yönteminin uygulanabilir bir metod olduğunu ortaya koymuşlardır.

Alvin Ibarraa, Naisheng Baia, Kan Hea, Antoine Bily, Julien Cases, Marc Roller, Shengmin Sang adlı araştırmacılar 2011 yılında dişbudak ağacı tohumlarının ekstresinin yüksek yağlı diyete bağlı obez farelerde ağırlık artışı ve hiperglisemiye sınırlaması adlı çalışmayı gerçekleştirmişlerdir. Bitkisel kaynaklı besinlerin insanlar için bazı sağlık sorunlarında yararlı olabileceği sonucuna varılmıştır.

John Flanagan, Marjolaine Meyer, María Angeles Pasamar, Alvin Ibarra, Marc Roller, Nuria Alvarez Genoyer, Sandra Leiva, Francisco Gomez-García, Miguel Alcaraz, Alberto Martínez-Carrasco, Vicente Vicente adlı araştırmacılar 2013 yılında Dişbudak ağacı tohumlarının ekstresinin besinsel değeri ve güvenlik değerlendirmesi adlı çalışmayı gerçekleştirmişlerdir. Yaptıkları çalışmalar sonucu güvenilir sonuçlar elde etmişlerdir.

M. Maghrani, N.-A. Zeggwagh, A. Lemhadri, M. El Amraoui, J.B. Michel, M. Eddouks adlı araştırmacılar 2004 yılında dişbudak ağacındaki bileşiklerin tip 1 diyabete karşı aktivitesini araştırmışlardır ve olumlu sonuçlar elde etmişlerdir.

Yuru Chen, Qiming Jimmy, Yu Xuemei Li, Yaojun Luo, Hui Liu adlı araştırmacılar 2005 yılında klorojenik asitin ekstraksiyonu ve HPLC analizini gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada etanol ile ekstraksiyon metodu, solvent ekstraksiyonu ve mikrodalga ekstraksiyon yöntemine göre daha etkili bulunmuştur. Ayrıca HPLC ile ekstraksiyon çözeltilisindeki bileşikler belirlenmiştir.

Abebe Ayelign ve Kebba Sabally adlı araştırmacılar 2013 yılında kahve tohumlarında HPLC klorojenik asit içeriğinin belirlenmesi adlı çalışmayı gerçekleştirmişlerdir. Su ile yapılan basit ekstraksiyon yönteminin kahve tohumlarında klorojenik asitin belirlenmesi için uygun bir yöntem olabileceği sonucuna varmışlardır.

Adriana F. , Tomas De P., Luiz C. Trugo ve Peter R. Martin adlı araştırmacılar 2005 yılında kavurma etkisinin kahvede bulunan klorojenik asit üzerine etkisi üzerinde çalışmışlardır. HPLC ile yapılan analiz sonucu, uzun süre kavurma etkisinin klorojenik asit miktarını azalttığı gözlemlenmiştir.

Banugöl Barut Uyar, Makbule Gezmen-Karadag, Nevin Sanlier, Serkan Günyel adlı araştırmacılar 2013 yılında maydanoz, tere, roka, kuzukula, dereotu, nane, semizotu ve radika gibi bazı bitkilerin toplam fenolik miktarlarını UV-Vis Spektrometreyle belirlemişlerdir. Analiz sonucunda toplam fenolik içeriğinin en çok nane, en az ise radika bitkisinde olduğu tespit edilmiştir.

Charanjit Kaur ve Harish C. Kapoor adlı araştırmacılar 2002 yılında nane, havuç zencefil, aonla, brokoli, zerdeçal, kavun gibi bazı Asya sebzelerinin toplam fenolik içerikleri ve antioksidan aktivitelerini araştırmışlardır. En yüksek fenolik içerik zerdaalda tespit edilmiş ve sebzelerdeki fenolik bileşiklerin antioksidan olmaları bakımından insan sağlığına yararlı bileşikler olduğu sonucuna varılmıştır.

Khaled Tawaha, Feras Q Alali, Mohammad Gharaibeh, Mohammad Mohammad, Tamam El-Elimat adlı araştırmacılar 2007 yılında Ürdün'deki bazı bitki türlerin fenolik madde içerikleri ve antioksidan etkileri üzerinde çalışmışlardır. Bitkilerin fenolik içerikleriyle antioksidan kapasiteleri arasında pozitif bir ilişki olduğu sonucuna varılmıştır.

Literatürdeki çalışmalarda organik solventler ve geleneksel solvent ekstraksiyonu yaygın olarak kullanılmıştır. Ancak organik solventler insan ve evre sağlığı açısından zararlıdır. Ayrıca retim maliyeti de fazladır. Bu nedenle bu araştırmaları daha ileri götürecek evre dostu tekniklere ihtiyaç vardır. Tez çalışmamı gerekleştime amacım, bu evre dostu ve maliyet açısından daha avantajlı tekniğin ultrasonik destekli ekstraksiyon tekniğin olabileceğini göstermektir.

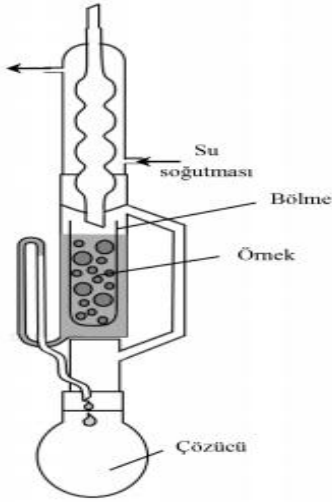
Ayrıca tüm literatürde dişbudak ağacı yaprağı ve enginar yaprağında klorojenik asit ekstraksiyonu ultrasonik ekstraksiyon ile yapılmış bir çalışma olmadığından bu çalışma zgn bir çalışma olmuştur. Bunun yanı sıra dişbudak ağacı yaprağının ve enginar yaprağının fenolik içeriklerinin ultrasonik ekstraksiyon tekniği kullanılarak UV spektrometre ile belirlenmesi çalışması da literatürde yoktur.

2.EKSTRAKSİYON

2.1. Soxhlet Ekstraksiyonu

Soxhlet ekstraksiyonu özel bir cihazda gerçekleştirilir. Katı veya yarı-katı numuneler için uygundur. Soxhlet ekstraktörü, en eski ekstraksiyon sistemlerinden biridir ve hala geniş ölçüde kullanılmaktadır. Soxhlet ekstraktörü, bir solvent şişesi, orta çemberde bir sıvı akış borusu (sifon), soğutulmuş bir kondansör (yoğuşturucu) ve ısıtma sisteminden meydana gelmiştir. Katı örnek, orta çemberin içindeki ekstraksiyon bölmesinin içine yerleştirilir. Solvent bunun altındaki solvent şişesinin içine konur. Solvent kaynama sıcaklığının üzerinde ısıtılır ve kaynayan solventten gelen buharlar yoğunlaşmanın olduğu kondansatöre hareket eder; yoğunlaşır, örneğe doğru damlar. Solvent örneği ıslatır ve daha sonra solvent seviyesi sifonun tepesine ulaşır ulaşmaz, solvent tüm örnek bölmesini boşaltarak, solvent şişesine geri damlamaya başlar. Böylece sıcak solvent birkaç kere örnek içerisinde sirküle olur. Ekstrakte olan analitler solvent şişesinin içinde kalırken, yalnızca temiz solvent buharlaştığından, her dolaşımında taze solvent kullanılır. Cevrim sayısını ve ekstraksiyon zamanını rapor etmek daha iyi bir karşılaştırma için önemlidir. Tipik ekstraksiyon zamanları 6 saatten 24 saate kadardır ve oldukça büyük solvent hacimleri (100-500 mL) gereklidir.

Ekstraksiyon solventleri genellikle saf organik solventler veya bunların karışımlarıdır. Soxhlet ekstraksiyonu, esas olarak organik bileşiklerin katı örneklerden ekstraksiyonunda kullanılır. Bileşikler, solventin kaynama sıcaklığında termal olarak kararlı olmalıdır. Eşzamanlı ekstraksiyona izin veren Soxhlet cihazı çok düşük maliyetle temin edilebilir. Yöntemin kullanılması esnasında karşılaşılan problemler örnek bölmesinin temizliğinden kaynaklı olabilir. Kullanmadan önce, temiz bir solventle ekstrakte ederek temizlemek en iyisidir [20].



Şekil 2. Soxhlet ekstraktör cihazı

Geleneksel Soxhlet ekstraksiyonu bazı cazip avantajlara sahiptir. Örnek, sürekli olarak taze solvent ile temas halindedir. Böylece matriksten analitin uzaklaştırılması artar. Distilasyon balonuna uygulanan ısıyla, ekstraksiyon kavitesine ulaşıldığından, sistemin sıcaklığı oda sıcaklığından daha yüksek olur. Sistem bu yüksek sıcaklıkta değişmeden kalır. Ayrıca, özütlemeye sonra filtrasyona gerek kalmaz ve örnekten üretilen madde miktarı, birkaç eşzamanlı ekstraksiyon paralel olarak gerçekleştirilerek artırılabilir. Düşük maliyetli basit donanım kullanılması buna olanak sağlar. Dahası, Soxhlet ekstraksiyonu az uğraş gerektiren çok basit bir metodolojidir. En son kullanılan alternatiflerinin çoğundan (mikrodalga destekli ekstraksiyon, superkritik sıvı ekstraksiyonu gibi) daha fazla miktarda örnek kütlesi ekstrakte edilebilir [21-22].

Soxhlet ekstraksiyonunun diğer katı örnek hazırlama teknikleriyle karşılaştırıldığında en önemli dezavantajları, uzun zaman gerektirmesi ve büyük miktarda organik solvent kullanılmasıdır. Çok miktarda solventin zararsız hale getirilmesi yalnızca pahalı değil, aynı zamanda çevresel problemlere yol açar. Örnekler genellikle solventin kaynama noktasında uzun süre ekstrakte edilir. Bu da termal olarak kararsız olan hedef türlerin bozunmasına yol açabilir. Geleneksel Soxhlet cihazı, sürecin hızlanmasına yardımcı olan çalkalama sağlamaz. Büyük miktarlarda solvent kullanıldığından, ekstraksiyon sonrası buharlaştırma/deriştirme basamağı zorunludur. Soxhlet tekniği solvent seçiciliği ile sınırlıdır ve otomasyonu zordur [22,23].

Aynı temel prensibe dayanan Soxhlet ekstraktörlerinin modern versiyonları geliştirilmiştir. Bunlar, basınçlı Soxhlet ekstraksiyonu, otomatikleştirilmiş Soxhlet ekstraksiyonu, ses dalgaları destekli Soxhlet ekstraksiyonu ve mikrodalga destekli Soxhlet ekstraksiyonudur.

Soxhlet ekstraksiyonu yüzyıldan fazla zamandır avantajlarını kanıtlamıştır. Bu avantajlar çoğu eksikliklerin üstesinden gelmiştir. Bunları şöyle sıralayabiliriz:

1. Basınçlı Soxhlet ekstraksiyonunda, örnek kartuşuna uygulanan basıncın artmasıyla, solventin katı örneğe nüfuz etmesi kolaylaşmıştır. Bunun sonucu ekstraksiyon zamanı kısalmış ve solvent hacmi de azalmıştır. Bununla beraber yüksek basınçta çalışmak, deneysel kurulumu zorlaştırmaktadır.
2. Otomatikleştirilmiş Soxhlet ekstraksiyonunda kullanılan farklı özellikteki birkaç ticari ekstraktörün ortak paydası: ekstraksiyon süresini kısaltma, ekstraktant (ekstraksiyon yapan madde) hacmini azaltma ve birkaç örneğin eş zamanlı ekstraksiyonuna olanak sağlamaktır. Bu cihazların en önemli kusuru yüksek maliyet ve çok yönlü olmamasıdır.
3. Dış enerjilerle ekstraksiyonun desteklenmesi (ultrasonik enerji ve mikrodalga kullanımı) Soxhlet ekstraksiyonunun eksiklerinin giderilmesi için en iyi alternatiftir [22].

2.1.1. Soxhlet Ekstraksiyonun Uygulamaları

Soxhlet ekstraksiyonu hem çevresel analizlerde, hem de gıda analizlerinde uygulanmıştır. Falandysz ve arkadaşları balıkta poliklorlu bifenilleri tayin etmişlerdir. Balıkların kas dokuları alınmış ve homojenize edilmiştir. Petri kaplarında dondurulmuş ve liyofilize edildikten sonra hekzan ile Soxhlet cihazının gelişmiş bir versiyonunda (Soxtec HT6) ekstrakte edilmiştir. Analiz gaz kromatografisi-elektron yakalama dedektöründe (GC-ECD) gerçekleştirilmiştir [24].

Diagne ve arkadaşları tarafından Soxhlet ekstraksiyonu yöntemiyle fasulyeden organofosforlu bir insektisit olan fenitrotiyon kalıntıları ekstrakte edilmiştir [25]. 10 gram örnek 24 saat boyunca 200 mL diklormetan ile solventin kaynama sıcaklığında muamele edilmiştir, daha sonra uçurularak zenginleştirilen örnek yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve GC-ECD ile tayin edilmiştir.

2.2. Basınçlı Sıvı Ekstraksiyonu (PLE)

Ekstraksiyon için oldukça yeni bir tekniktir. Hızlandırılmış solvent ekstraksiyonu olarak da adlandırılır. Örneği sızdırmaz bir yüksek basınç ortamında tutarak, geleneksel solventler için daha yüksek sıcaklıklar kullanılmasına izin veren bir donanım kullanır. Yükseltilmiş basınç, solventin daha yüksek sıcaklıklarda sıvı halde bulunmasını sağlar. PLE' de verim ve seciciliği etkileyen kritik faktörlerden biri ekstraksiyon sırasında uygulanan sıcaklıktır. Yüksek sıcaklıkların kullanımı, van der Waals kuvvetleri, hidrojen bağı ve dipol çekim gibi analit-örnek matriksi etkileşimlerinin bozulmasına yardımcı olarak ekstraksiyon verimini artırır [26]. Termal enerji kullanımı benzer moleküller arasındaki kohezyon ve farklı moleküller arasındaki adezyon kuvvetlerinin üstesinden gelmesine yardımcı olur. Bu durumda geri bırakma (desorpsiyon) süreci için gerekli aktivasyon enerjisi azalır. Yükseltilmiş sıcaklık solventin, çözünenin ve matriksin yüzey gerilimini düşürür. Bu yüzden örneğin ıslanması artar. Solvent yüzey geriliminde azalma, solvent kavitesinin daha kolay oluşmasını sağlar. Böylece analitlerin solventte daha hızlı çözünmesine izin verilir [27]. Artan sıcaklık sıvı solventin viskozitesini azaltır ve matriks partiküllerinin içine girmesini kolaylaştırır. Sıcaklık, güçlü analit ve matriks etkileşimlerinin bozulmasına yardım eder ve denge zamanını kısaltan difüzyon hızlarını artırır. Bu durum özellikle difüzyon kontrollü örneklerde daha hızlı ekstraksiyonlara izin verir. PLE' nin temel özelliği, gerekli solvent miktarını önemli ölçüde azaltırken, ekstraksiyon sürecinin hızını artıran yüksek difüzyon sınırları kullanmasıdır [28]. Yükseltilmiş sıcaklık nedeniyle ekstraksiyon kinetiği de daha hızlıdır. PLE' nin amacı, yüksek sıcaklık ve basınç kullanarak sıvı ekstraksiyonunu geliştirmektir. Yüksek sıcaklık ve basınç, solventin örnek matriksinin içine nüfuz etme kabiliyetini artırır.

Genellikle ekstraksiyon, solventin atmosferik kaynama noktasının üstündeki bir sıcaklıkta gerçekleştirilir. Analitlerin yayılma gücü ve çözünürlüğü, artan sıcaklıkla artmaktadır. Bu ekstraksiyonu daha hızlı ve daha etkin yapmaktadır [26,29]. Ekstraksiyon sırasında uygulanan basıncın temel avantajı, sıcaklık kaynama noktasının üzerine çıksa bile solventin sıvı durumunda kalmasıdır. Ekstraksiyon esnasında yüksek basınç, solventin analite ulaşmasını engelleyen, matrikste bulunan hava kabarcıkları ile ilgili problemleri kontrol eder. Bu koşullar analitin çözünürlüğünü ve matriksten desorpsiyon kinetiğini artırır [30].

Bu yüzden tüm süreç Soxhlet ekstraksiyonundan daha hızlıdır. Isıtma sonrasında ekstraksiyon hücresi, solventin normal kaynama sıcaklığının altına kadar soğutulur. Daha sonra hücreye yüksek basınç uygulanır. Bu basınç, solvent ve ekstrakte edilen materyali bir filtreden geçerek dışarıya çıkmaya zorlar. Ekstraksiyon kinetiğini artıran 200 °C' ye kadar yükseltilmiş sıcaklıkların kullanılmasından dolayı, solventin kaynamasını önlemek için 20 MPa kadar basınç gereklidir. Gerekli solvent miktarı, geleneksel sıvı ekstraksiyon yöntemlerinde kullanılan miktardan daha azdır. PLE ' nin sınırlaması, ısısız kararlı olmayan örnekler için uygun olmamasıdır [31].

Bununla birlikte olası en yüksek sıcaklık ve basınç, mutlaka en yüksek verimle sonuçlanmaz. Bozucu etki de yapabilir. Ayrıca ekstraksiyon verimini etkileyen birkaç değişken daha vardır. Bunlar; ekstraksiyon zamanı, solvent seçimi, solvent hacmi ve yüklenen örnek miktarıdır. Orijinal örneğin bileşimine (organik bileşim, su içeriği, partikül boyutu ve heterojenite) ek olarak, örnek on hazırlama teknikleri de (kurutma, öğütme gibi) sonucu etkileyebilir [32].

PLE statik modda, dinamik modda veya bunların kombinasyonu ile gerçekleştirilebilir. Dinamik modda, solvent örneğin içinden akar. Statik basınçlı sıvı ekstraksiyonu manüel olarak kapalı bir kaptaki gerçekleştirilebilir. Fakat ekstraksiyon daha çok otomatik bir enstrümanla gerçekleştirilir. Tipik bir PLE sistemi, bir fırın, ekstraksiyon hücresi, pompa ve basınç altında tutan sistem, birkaç vana ve toplama kaplarından oluşur [33].

Statik ekstraksiyon modu Őu basamakları içerir:

1. Ekstraksiyon hücresine örneğin yüklenmesi,
2. Hücrenin organik solvent ile doldurulması,
3. Hücrenin sıcaklık ve basıncının ayarlanması,
4. Örneğin belirli bir zaman ekstrakte edilmesi,
5. Basıncın serbest bırakılarak solventin toplama kabına transfer edilmesi. Tüm ekstraktın toplama kaplarına ulaşmasını sağlamak için hücrenin temiz solventle yıkanması,
6. Uygun bir gaz kullanarak örnekten solvent atıklarının temizlenmesi.

PLE sisteminde toplanan hacim miktarı hücre büyüklüğüne bağlıdır. 10-100 mL arasında olabilir. Bu yüzden son ekstraktı deşiştirmek için buharlaştırma basamağı gereklidir [33].

Örnek ekstraksiyon hücresine yüklenmeden önce, genellikle önişlem uygulanır. Toprak ve benzeri matrislere hava ile kurutma (24-48 saat) ya da dondurarak kurutma uygulanır [34,35]. Örneğin kurutulması önemlidir. Çünkü matristeki su ekstraksiyon verimini düşürür. Soxhlet ve süperkritik akışkan ekstraksiyonunda, yüksek miktarda suyla başa çıkmak için örneğe sodyum sülfat eklenmesi önerilmiştir [36,37]. Kurutma basamağını çoğunlukla eleme (2 mm elek)[38] veya örneğin 100-1000 µm aralığında bir boyuta öğütülmesi izler [39]. Örneğin daha küçük boyutlara öğütülmesi (<15µm), kısaltılmış difüzyon yol uzunluğundan dolayı analitin partikül yüzeyine taşınmasını kolaylaştırmada avantaj sağlayabilir [32].

Ekstraksiyon verimi, örnek matrisinin doğasına, ekstrakte edilen analite ve analitin matris içindeki yerine bağlıdır. Heterojen örneklerin ekstraksiyon sureci Pawliszyn tarafından 2003 yılında bir model çizilerek açıklanmıştır [40]. Bu model örnek partikülünün gözenekli ve bir organik katman tarafından sarıldığını varsaymıştır. Ekstraksiyon ve analitin örnek matrisinden geri kazanımı birkaç basamakta belirtilebilir.

İlk olarak analitin ekstraksiyon kabından uzaklaştırılabilmesi için, bileşik örnek matriksindeki etkin bölgelerden geri bırakılır. Daha sonra matriks sıvı ara yüzüne ulaşabilmek için, matriksin organik kısmına doğru difüze olur. Bu safhada analit, ekstraksiyon fazına dağılır. Sonra porların içinde bulunan ekstraksiyon fazı arasından difüze olur ve taşınım yoluyla ekstraksiyon fazı kısmına ulaşır. Ekstraksiyon sürecinin son aşaması ekstrakte edilen analitin toplanmasıdır [33,40].

Ekstraksiyon sürecindeki kritik bir basamak, analitin örnek matriksi içindeki pozisyonudur. Beş farklı pozisyon olduğu varsayılmıştır:

1. Matriks yüzeyine adsorbe olması
2. Bir solvent gözeneginde çözünmesi ve/veya yüzeye adsorbe olması
3. Matriksin mikro/nano gözeneginde çözünmesi/adsorplanması
4. Matrikse kimyasal olarak bağlanması
5. Ekstraksiyon solventinde çözünmesi [40].

Ekstraksiyon sürecinde hız sınırlayıcı basamak ekstrakte edilen matriksin doğasına bağlıdır. Doğal tortu (sediment), toprak ve çamur örneklerinin çalışıldığı çevresel uygulamalarda, solut-matriks etkileşimlerinin üstesinden gelmek zor olduğundan, yüzeyden bırakma basamağı genellikle hız-sınırlayıcı basamaktır. Bitki materyallerinde, hız-sınırlayıcı basamak daha yaygın olarak çözünme veya difüzyon basamaklarıdır [41,42].

2.2.1. PLE Uygulamaları

PLE, katı ve yarı-katı örneklerin ekstraksiyonu için geliştirilmiş bir tekniktir. Örnekler genellikle toprak, tortu veya gıda örnekleridir. Çoğu durumda, PLE için organik solventler kullanılır. Kritik altı (subcritical) su ekstraksiyonu veya basınçlı sıcak su ekstraksiyonu olarak adlandırılan teknikte, suyun ekstraksiyon solvent olarak kullanılması da mümkündür. Bir solvent olarak suyun özellikleri, yüksek sıcaklıkta ve basınçta önemli ölçüde değişir. Gıda endüstrisinin polifenoller açısından değerli yan ürünlerinden biri, nar kabuklarıdır.

Geleneksel olarak bitki materyallerinden organik solventler yardımıyla (özellikle metanol) ekstrakte edilir. Cam ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada polifenollerin ekstraksiyonu için basınçlı su ekstraksiyonu araştırılmıştır [43]. Ekstraksiyon sonuçlarını etkileyen en önemli faktörlerin partikül boyutu, sıcaklık ve statik zaman olduğu bulunmuştur. Sonuçlar, basınçlı su ekstraksiyonunun geleneksel metanol ekstraksiyonu kadar efektif olduğunu göstermektedir. Misel ortam gibi katkılar, sıvı ve çevresel örneklerden organik kirleticilerin ekstrakte edilmesi için alternatif olarak kullanılabilir [44]. Son zamanlarda, non-iyonik yüzey aktif çözeltiler alternatif bir solvent sistemi olarak kullanılmıştır [45].

Luthria ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada soya fasulyesinde isoflavonların ekstraksiyonu için sistematik bir çalışma gerçekleştirilmiştir [46]. Yedi farklı solvent karışımı değerlendirilmiştir: asetonitril-su; etanol-su; metanol-su; dimetilsulfoksit-etanol-su; dimetilsulfoksit-asetonitril; Genapol-su. Bu değerlendirme altı farklı ekstraksiyon tekniği kullanılarak yapılmıştır: Çalkalama, vorteksleme, sonikasyon, karıştırma, Soxhlet ve PLE. Soya fasulyesi örneklerinden optimum geri kazanım dimetilsulfoksit-etanol-su (5:70:25, h/h/h) solvent karışımının kullanıldığı PLE yöntemi ile elde edilmiştir. Zhu ve arkadaşları herbisitlerin topraktan ekstraksiyonunda, kuru topraklar için ekstraksiyon verimine basıncın az etkisi olduğunu gözlemişlerdir ve 100-150 °C sıcaklıkta verimin arttığını bulmuşlardır [47]. Bununla birlikte toprağın nemli olması durumunda 500 psi' dan 1500 psi' ya artan basınç, pestisitlerin daha iyi çözünmesinden dolayı faydalıdır [48]. Bernal ve arkadaşları, sertifikalı patates, havuç, zeytinyağı ve liyofilize edilmiş balık doku örneklerindeki organoklorin pestisitleri ve poliklorlu bifenilleri tayin etmişlerdir. Örnekleri izole etmek için basınçlı-Soxhlet ekstraksiyonunu kullanmışlardır [49]. Bu uygulamada ekstraktant olarak CO₂ kullanılmıştır. CO₂' nin yoğunlaşması için ekstraksiyon sistemi, soğutucu su (0 °C) pompalayan sıcaklık ayarlı banyo içine daldırılmıştır.

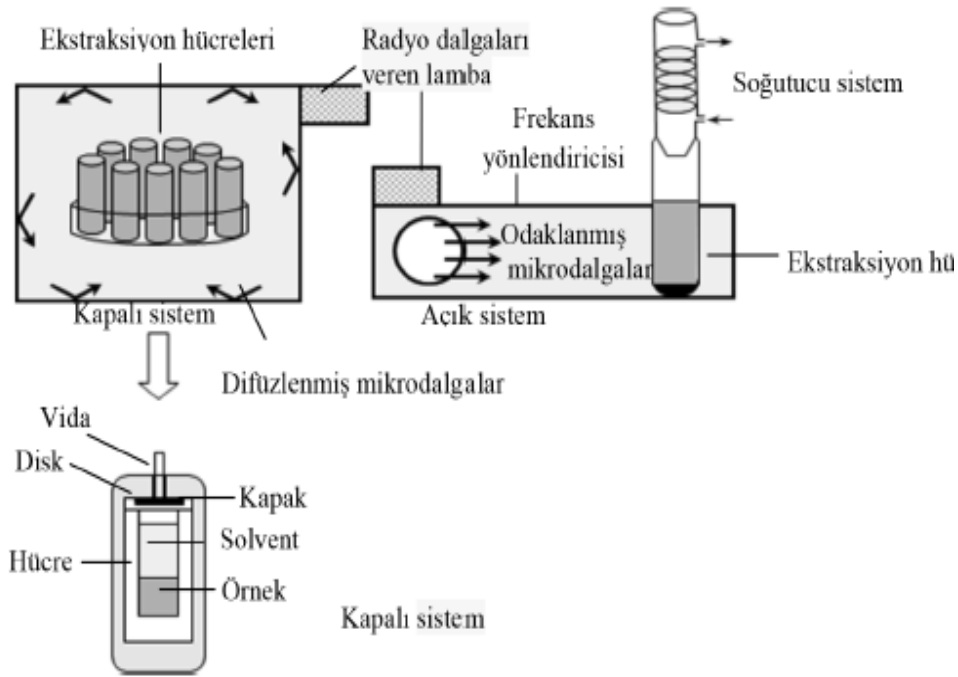
2.3. Mikrodalga Destekli Solvent Ekstraksiyonu (MAE)

Mikrodalgalar yüksek frekanslı elektromanyetik dalgalardır (300-300000 MHz). Mikrodalga enerji kullanılarak ısıtmanın prensibi, iyonların iletimi ve dipol rotasyonu (dönme) yoluyla molekül üzerine mikrodalganın direkt etkisi temeline dayanır. Çoğu uygulamalarda bu iki mekanizma eş zamanlı meydana gelir.

İyonik iletim, bir manyetik alan uygulandığında iyonların elektroforetik göçüdür. Çözeltinin bu iyon akışına direnci friksiyon (sürtünme) ile sonuçlanır ve böylece çözelti ısınır. Dipol rotasyonu, uygulanan manyetik alanla dipollerin yeniden düzenlenmesi anlamına gelir. Ticari sistemlerde kullanılan 2450 MHz' de dipoller düzenlenir ve saniyede $4,9 \times 10^9$ defa rastgele dağılır. Bu zorlanmış moleküler hareket, ısınmayla sonuçlanır [20,33]. MAE' de mikrodalga ışıması, ekstraksiyon solventini ve böylece de örneği ısıtmak için kullanılır. Başarılı bir ekstraksiyon gerçekleştirmek için uygun solvent secimi çok önemlidir. Seçilen solventlerde mikrodalga ışımasını absorplaması, solventin matriksle etkileşimi ve analitin solventteki çözünürlüğü göz önüne alınmalıdır. Daha büyük dipol momente sahip olan solvent, mikrodalga ışıması altında daha hızlı ısınacaktır. Örneğin hekzan gibi nonpolar bir solvent (dipol moment $<0,1$) ısınmayacak, oysa 2,69 dipol momente sahip aseton birkaç saniye içinde ısınacaktır [50]. Eğer ekstraksiyonda hekzan ve toluen gibi nonpolar solventler gerekliyse, solventleri su metanol ve aseton gibi yüksek bir dipol momente sahip polar solventlerle karıştırmak önerilir. Seçilen solvent çok kuvvetli ısınmaya neden olursa, bileşiklerin degradasyonundan kaçınılamaz. Bu yüzden yaygın uygulama, yalnızca biri mikrodalga ışımayı absorplayan ikili karışımların (örneğin hekzan-aseton, 1:1) kullanımınıdır [51]. Diğer önemli faktörlerden biri de, ekstraksiyon solventi ile ekstraktın analizinde kullanılan analitik metodun uyumluluğudur. Gaz kromatografik analizler için daha az polar solventler, sıvı kromatografik analiz ve immunoassay teknikler için daha polar solventler tercih edilir. MAE' nin seciciliği üzerine çok az literatür rapor edilmiştir. Örneğin içindeki tüm maddeler ekstrakte edildiğinden secici bir ekstraksiyon tekniği olduğu söylenemez ve hemen hemen her durumda ekstraksiyon sonrası temizleme basamağı gereklidir [50].

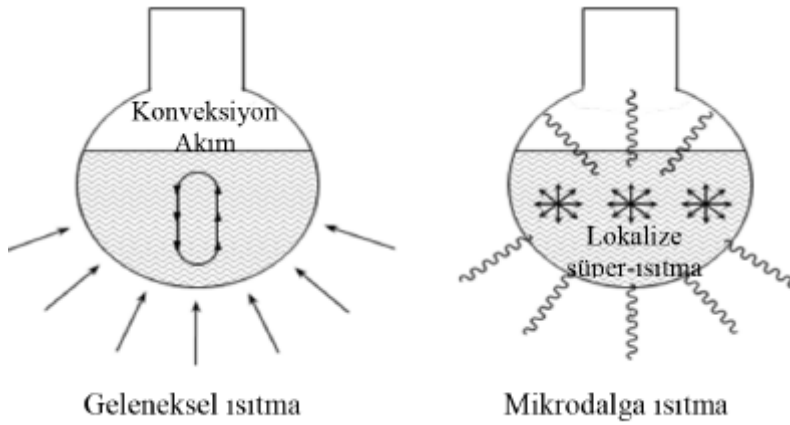
Ekstraksiyon genellikle kapalı bir kaptaki gerçekleştirilir. Bu durumda basınç artar ve solvent kaynama noktasından daha yüksek sıcaklıklara ısıtılabilir. Çoğu solvent için (aseton, aseton-hekzan, diklormetan aseton gibi) kabın içindeki sıcaklık, solventin kaynama noktasının 2-3 katıdır. Temel olarak iki tip MAE sistemi kullanılabilir: Kapalı kap sistemi (kontrollü sıcaklık ve basınç altında) ve açık kap sistemi (atmosfer sıcaklığında). Her iki sistem de şekilde gösterilmiştir [52]. Kapalı kap sisteminde hücreler eşzamanlı olarak ışınlanırken, açık sistemde kaplar sıralı olarak ışınlanır.

Açık kaplarda sıcaklık solventin atmosferik basınçta kaynama noktasıyla sınırlıyken, kapalı kaplarda sıcaklık uygulanan basınçla yükseltilebilir [53]. Kapalı kap sistemi uçucu bileşikler olması durumunda en uygun görünmektedir. Bununla birlikte, kapalı kaplarda, ekstraksiyon sonrasında kap açılmadan önce sıcaklığın düşmesini beklemek gereklidir. Bu ekstraksiyon süresini artırır (yaklaşık 20 dakika). Her iki sistem ekstraksiyon verimlerine göre karşılaştırıldığında, toprak örneğinden poliaromatik hidrokarbonların ekstraksiyonunda, benzer performans göstermişlerdir [54].



Şekil 3. MAE'de kapalı ve açık sistem

Kapalı kap teknolojisi, PLE teknolojisiyle çok benzerdir. Her iki sistemde de solvent ısıtılır ve basınç uygulanır. Temel fark, ısıtmadır. Biri mikrodalga, diğeri geleneksel fırın ısıtmasıdır [55]. PLE' de, etkili parametrelerin sayısı azalır. Bu nedenle bu tekniğin uygulanması pratikte daha basittir.



Şekil 4. Isıtma modelleri

Kullanılan ticari kapalı kap MAE sistemleri, bir manyetron tüp (çok kısa radyo dalgaları veren bir lamba), içinde döner bir tablada ekstraksiyon kaplarının bulunduğu fırın, sıcaklık ve basıncın kontrolü için izleme cihazları ve birkaç elektronik bileşenden oluşmaktadır. Ekstraksiyon süreci, ekstraksiyon hücresine örneğin yüklenmesiyle başlar. Mikrodalga ışınları uygulanır ve solventi ayarlanan değerlere ısıtmak için, on-ekstraksiyon basamağı başlatılır. Bu değerlere ulaşmak için gerekli zaman hem örnek sayısına hem de örnek türüne bağlıdır. Normal olarak ısıtma 2 dakikadan daha az bir zaman alır. Daha sonra örnek ışınlanır ve genellikle 10-30 dakika aralığında ekstrakte edilir [20].

2.3.1. MAE Uygulamaları

MAE, sıvı örnekler için de uygun olmasına rağmen, tipik olarak katı örnekler için kullanılır. MAE uygun bir solvent seçimiyle, organik bileşikler dekompoze etmek ve yükseltmek için kullanılabilir. Ekstraksiyon genellikle 20-50 mL solvent gerektirir [56].

MAE genellikle çevresel analizlerde kullanılır. Tortu ve toprak gibi matrislerden, poliaromatik hidrokarbonlar, polikloro bifeniller ve organoklorlu pestisitlerin ekstraksiyonları çalışılmıştır [57,58]. Zaman, sıcaklık, basınç ve nem içeriği gibi değişkenlerin ekstraksiyon verimine etkisi araştırılmıştır. Çoğu çalışmada matris neminin ekstraksiyon verimini artırdığı bulunmuştur [20,55].

MAE gıda analizlerine de uygulanmıştır. Bouaid ve arkadaşları portakal kabuğunda atrazin ve dört organofosforlu pestisitleri tayin etmişlerdir [59]. Ekstraksiyon hekzan/aseton (1:1) karışımında, 90 °C sıcaklıkta, 10 dakikada ve 475 watt (w) mikrodalga gücünde yapılmıştır. Ekstraktlar gaz kromatografisi-azot-fosfor detektör (GC-NPD) ile analiz edilmiştir. Papadakis ve arkadaşları, susam tohumlarında 16 organoklorin insektisitinin ekstraksiyonunu MAE ile gerçekleştirmişlerdir [60]. Solvent karışımı olarak su:asetonitrilin (5:95, v/v) kullanıldığı ekstraksiyon, 100 °C sıcaklıkta, 10 dakikada gerçekleşmiştir. Ekstraksiyon basamağını, ekstraktın Florisil ile temizlenme basamağı ve gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS) ile analizi izlemiştir. Franke ve arkadaşları serumdan ilaç ekstraksiyonunda mikrodalga ışımasını kullanmıştır ve sonuçları klasik sıvı-sıvı ekstraksiyonuyla karşılaştırmışlardır [61]. Model ilaç olarak lidokain, metadon, diazepam, nordiazepam, proksifen ve norproksifen test edilmiştir. Kantitasyon GC-NPD ile gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem birkaç adli vakaya başarıyla uygulanmıştır. Desrosiers ve arkadaşları, iskelet dokularından ilaç (pentobarbital, ketamin, diazepam) ekstraksiyonu için MAE kullanmışlardır. Doku ekstraktları enzim-bağlı immunosorbent testi (ELISA) ile analiz edilmiştir [62]. Diğer bir uygulama alanı terpenler, alkaloidler, uçucu yağlar, karotenoidler gibi doğal ürünlerin ekstraksiyonudur. Paprikada renk pigmentleri ekstrakte edilmiştir. Aseton-su (1:1, v/v) solvent karışımı kullanılarak elde edilen optimal koşullar; 120 saniye ekstraksiyon zamanı ve 50 W enerjidir. MAE koşullarında örnek sıcaklığı 60 °C' nin altında tutulmuştur. Bunun nedeni daha yüksek sıcaklıkta ısıtma karotenoid moleküllerinin yeniden düzenlenmesine ve toplam karotenoid içeriğinde azalmaya neden olabilir. Hidrofobik karotenoidlerin daha hidrofilik bileşiklere yükseltgenmesiyle termooksidasyon da gerçekleşebilir [63]. Ayçiçeği tohumlarındaki pestisit atıklarının tayini için mikrodalga destekli Soxhlet ekstraksiyonu kullanılarak diklormetan solventiyle hızlı bir analitik yöntem geliştirilmiştir. Ekstraksiyon verimini etkileyen mikrodalga gücü, ışınlama zamanı, ekstraktant hacmi ve devir sayısı optimize edilmiştir. Ekstraksiyondan sonra orijinal ekstraktın lipid fraksiyonundan pestisit atıklarını izole etmek için, sıvı-sıvı ekstraksiyonu ve Florisil makro kolon kullanımıyla temizleme basamağı uygulanmıştır. Daha sonra örnek GC-MS sistemine enjekte edilmiştir [64]. Topraktan nitratlanmış polisiklik aromatik hidrokarbonların hızlı ekstraksiyonu için mikrodalga destekli Soxhlet ekstraksiyonu önerilmiştir. Işınlama gücü, zamanı, devir sayısı ve solvent hacmi, deneysel tasarım yöntemi kullanılarak optimize edilmiştir.

Nitro-poliaromatik hidrokarbonlar, amino-poliaromatik hidrokarbonlara indirgenmiştir. İndirgenmiş analitler heptaflorobutirik anhidrit ile tur evlendirilmiş ve GC-ECD ile tayin edilmiştir [65].

2.4. Ses dalgaları-destekli sıvı ekstraksiyonu

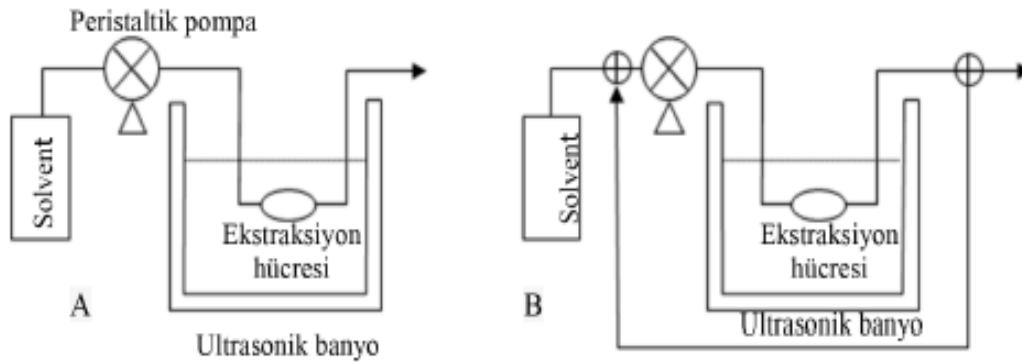
Ses dalgaları-destekli sıvı ekstraksiyonu, ultrasonik ekstraksiyon olarak da adlandırılır. Bu yöntemde örneğe 20 kHz üstündeki frekanslarla akustik titreşimler uygulanır. Bu titreşimler sıvının içinden geçtiğinde kavitasyon (boşluk oluşumu) meydana gelir. Ultrasonik enerjinin neden olduğu kavitasyon olarak bilinen bu etki sıvı ortamda çok sayıda ufacık kabarcıklar üretir ve katıların mekanik olarak sarsılmasına neden olarak partiküllerin kopmasını sağlar. Ses dalgaları genellikle analitin iyi geri kazanımıyla sonuçlanan katı ve solvent arasında etkin bir temas sağlar [66]. Ses dalgaları, hem katı hem de sıvı örnek hazırlamada kullanılır. Katı örneklerin ekstraksiyonu, digesyonu ve bulamaç oluşumu işlemini destekler. Sıvı örneklerde ise, sıvı-sıvı ekstraksiyonu, homojenizasyonu veya emülsiyon haline getirmeyi desteklemek için kullanılır [67]. Katı örneklerden analitlerin ekstraksiyonu, su banyosuna ultrasonik radyasyon uygulanmasıyla veya prob (ultrasonik aygıtların ucunda bir alıcı bulunan hareketli kısmı) gibi diğer cihazlarla gerçekleştirilir [68]. En çok kullanılan ve en ucuz ultrasonik radyasyon kaynağı ultrasonik banyodur [69]. Ayrıca örneklerin sonikasyonu için güçlü silindirik bir prob kullanan daha etkin bir sistem geliştirilmiştir [70]. Banyo ve prob arasındaki secim analizin gerekliliklerine bağlıdır. Eğer amaç toplam katı-sıvı ekstraksiyonu ise, etkili bir prob kullanımı daha iyi olabilir. Çünkü ekstraksiyon için gerekli zaman daha azdır. Bununla birlikte, çok sayıda örneğin ultrasonik banyo ile analiz edilmesi daha iyi bir seçenektir. Sonikasyon problemlerinin ultrasonik banyoya karşı kullanımı, enerji dağılımında homojeniteyi sağlar. Fakat ultrasonik uçlar daha pahalıdır, ömrü daha kısadır ve daha düşük sayıda örnek işlenmesine izin verir [67].

Ekstraksiyon verimini artırmak için solvent turu, sıcaklık ve sonikasyon genliği koşulları gibi farklı faktörleri optimize etmek gereklidir.

Ekstraksiyon verimini etkileyen diğer parametreler; sonikasyon zamanı, örnek partikül boyutu, örnek miktarı ve kullanılan cihazdır. Son zamanlarda, solvent miktarını azaltmayı sağlamak için analitik örnek hazırlama işlemlerine özel önem verilmektedir.

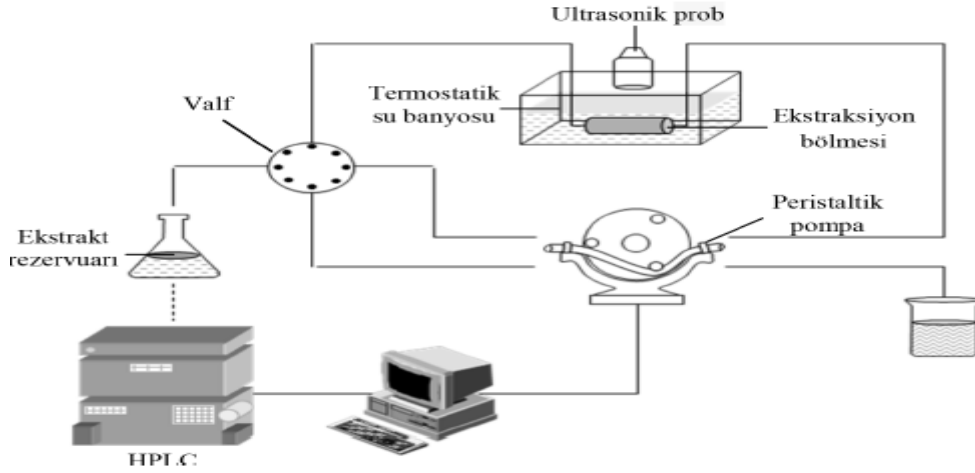
Ultrason radyasyonunun ilginç bir uygulaması dinamik ses dalgaları-destekli ekstraksiyondur. Burada numune ultrasonik su banyosuna yerleştirilmiş bir ekstraksiyon hücresi [71,72] veya ultrasonik problu bir su banyosu içine konulur. Bu sistem taze ekstraksiyon solventinin sürekli olarak örneğe pompalandığı, artan analit transferi olan açık bir sistem veya ekstraktın seyrelmesini engelleyen ekstraksiyon solventinin yeniden dolaştığı kapalı bir sistem olarak kullanılabilir [67].

MAE sistemi gibi, SAE sistemi de statik veya dinamik bir sistem olabilir. Analitler katı matriksten solvente transfer olur olmaz uzaklaştığından, dinamik ekstraksiyon kullanımı daha avantajlıdır. Diğer bir avantajı da, dinamik sistemde örneğin sürekli olarak taze solvente maruz kalmasıdır. Bu durum analitlerin örnek matriksinden solvente transferini artırır. Ekstraksiyon tipik olarak 20-200 mL solvent gerektirir ve ekstraksiyon zamanı 2 ila 20 dakika aralığındadır.



Şekil 5. Dinamik ses dalgaları-destekli ekstraksiyonun şematik gösterimi A) Açık sistem B) Kapalı sistem

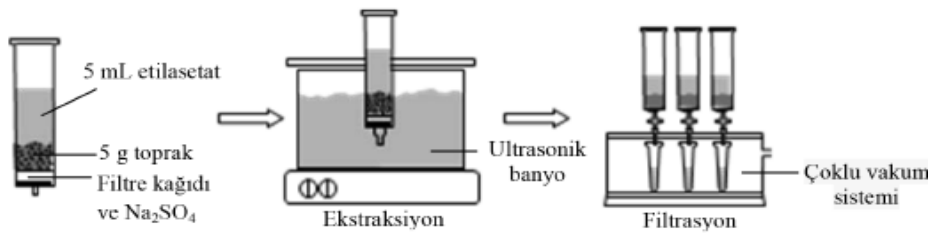
Ayrıca, dinamik ses dalgaları-destekli ekstraksiyon ile enstrümantal analiz yönteminin çevrim içi bağlanması mümkündür.



Şekil 6. Dinamik ses dalgaları-destekli sıvı ekstraksiyonun analiz sistemine bağlanmasının şematik gösterimi.

2.4.1. SAE Uygulamaları

SAE sıvı ve katı örneklerin her ikisi için veya organik ya da inorganik bileşiklerin ekstraksiyonu için kullanılabilir. Ses dalgaları organik bileşiklerin yükseltgenmesi veya ayrışmasında yardım için de kullanılabilir [31]. Sanchez-Brunete ve arkadaşları toprakta pestisitlerin tayini için küçük kolonlarda ses dalgaları destekli ekstraksiyon olarak adlandırılan minyatürize edilmiş bir teknik geliştirmişlerdi [74]. Şekilde toprak ekstraksiyonu şematik olarak gösterilmiştir. Bu teknik daha yüksek polaritedeki karbamat pestisitlerin ekstraksiyonuna uygulanmıştır. Ekstraksiyon solventi olarak, % 82 ile % 99 aralığında geri kazanım elde edilmesini sağlayan metanol seçilmiştir [75]. Son zamanlarda, farklı kimyasal sınıfta ve geniş polarite aralığında 50 pestisit eş zamanlı analizinde uygulanan bu yöntemde etil asetat ekstraksiyon solventi olarak kullanılmıştır. Yüksek tekrarlanabilirlik ve düşük gözlenebilirlik limitleri elde edilmiştir [76].



Şekil 7. Küçük kolonlarda ses dalgaları-destekli ekstraksiyonun şematik gösterimi

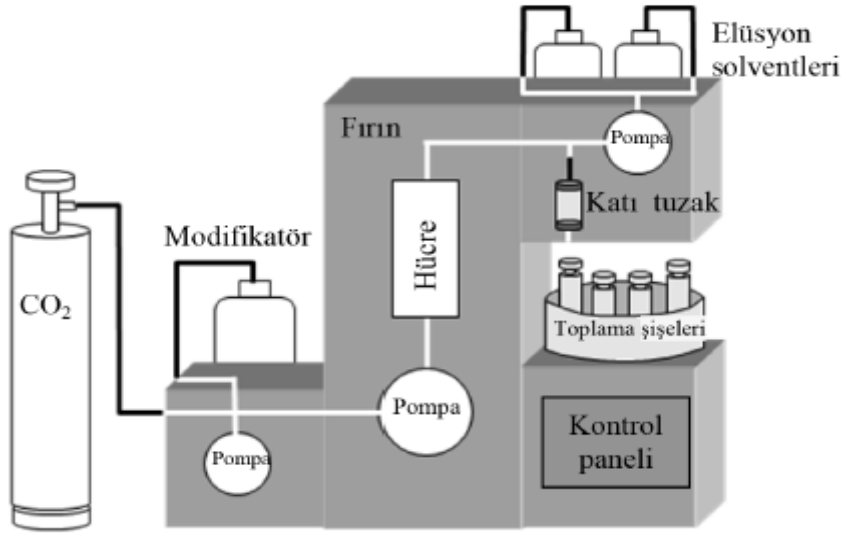
Ses dalgaları-destekli Soxhlet ekstraksiyonu ayçiçeği, kolza ve soya fasulyesi tohumlarından toplam yağ içeriğini ekstrakte etmek için kullanılmıştır. 10 g örnek, selüloz ekstraksiyon kartuşuna yerleştirilmiştir. Kartuş, Soxhlet cihazına konulduktan sonra, cihaz 75 °C sıcaklıktaki termostatlı su banyosu içine yerleştirilmiştir. Kartuşa ses dalgaları uygulanmıştır. Ekstraksiyonda 100 mL n-hekzan kullanılmıştır. Örnek kartuşuna ses dalgaları uygulanması, yağın kantitatif ekstraksiyonu için gerekli Soxhlet ekstraksiyon çevrim sayısını çok büyük ölçüde azaltmış böylece ekstraksiyon zamanı geleneksel işlemlere kıyasla yarı yarıya azalmıştır [49].

2.5. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu (SFE)

Süperkritik akışkan, kendi kritik sıcaklığı üzerinde ısıtılan ve kendi kritik basıncı üzerinde basınç uygulanan bir element, madde veya karışım olarak tanımlanır. Bir süperkritik akışkan tek bir faz halinde bulunur (ne gaz ne de sıvıdır) ve basıncın veya sıcaklığın artmasıyla sıvılaştırılmaz veya buharlaştırılmaz. Bu yüzden süperkritik akışkan, bir gaz ve bir sıvı arasındaki maddenin ara formunu gösterir. Sıvıdaki gibi yüksek yoğunluk ve çözme gücü, gazdaki gibi düşük viskozite, sıfır yüzey gerilimi ve analitler için yüksek difüzyon hızına sahiptir. Daha yüksek difüzyon katsayıları ve düşük viskoziteleri nedeniyle, süperkritik akışkanların katı gözenekli materyallere nüfuz etmesi çok uygundur. Çözme ve yayılma gücü sıvılara göre daha fazla olduğundan, hızlı reaksiyon kinetiğine sahiptirler [77,78]. Normal sıvıların tersine, süperkritik akışkanlar sıkıştırılabilir ve bu yüzden yoğunlukları geniş bir aralıkta değiştirilebilir. Yoğunluk ve diğer özellikleri, sıcaklık ve basıncın ayarlanmasıyla kolaylıkla değiştirilebilir. Bu önemlidir, çünkü süperkritik akışkanının daha yüksek yoğunluğu, onun daha iyi çözme kabiliyeti anlamına gelmektedir. Yoğunlukla süperkritik akışkanlardaki maddelerin çözünürlüğü, sıvılardaki çözünürlüğünü geçer. Süperkritik akışkan çeşitli örnek matrisleri için mükemmel bir ekstraksiyon ortamı oluşturur. Sıcaklık ve basınç değiştirilerek çözme gücüyle oynanmasıyla yüksek seçicilik de sağlanır [77]. SFE' de, akışkan sürekli olarak örnek içinden geçmeye zorlanır. Bu yüzden kantitatif veya tam bir ekstraksiyon sağlayabilir [79].

Süperkritik akışkan olarak genellikle düşük kritik sıcaklık ve basınca sahip olduğundan karbondioksit (Kritik koşulları = 30,9 °C ve 73,8 bar) kullanılır. Karbondioksit ayrıca toksik değildir, alev almaz ve oldukça ucuzdur. Nonpolar olduğundan, daha polar analitlerin ekstraksiyonunu artırmak için karbondioksite modifikatörler eklenir. Tipik modifikatörler metanol ve diklormetandır.

SFE' de süperkritik akışkan üretimi, basınç, sıcaklık ve akış hızı kontrolü sağlayan bir cihazla gerçekleştirilir [33]. Genellikle ekstraksiyon dinamik moda uygulanır. Fakat statik veya statik/dinamik birleştirilmiş ekstraksiyon da uygulanabilir. Ekstrakt ya uygun bir solvent içinde veya katı-faz tuzağında (trap) toplanır. Ekstraksiyon 10-20 mL solvent gerektirir ve ekstraksiyon süresi 20-60 dakika aralığındadır. Geleneksel yöntemlere göre belirgin avantajı kısa ekstraksiyon zamanı ve organik solventlerin az kullanımınıdır. Bazı çalışmalar 20-60 dakikalık SFE' nin, birkaç saatlik Soxhlet ekstraksiyonundan daha yüksek geri kazanımlar sağladığını göstermiştir [80,81]. Referans standart materyaller olan tortu ve kas dokusundan poliklorlu bifenillerin, SFE ve Soxhlet ekstraksiyonuyla tayini yapılarak yöntemlerin karşılaştırılması sağlanmıştır. SFE ile poliklorlu bifenillerin tayininde ekstraksiyon süresi 18-24 saatten 50 dakikaya indirilmiş ve Soxhlet ekstraksiyonu ile 250 mL olan organik solvent kullanımı 7,5 mL ye düşürülmüştür [82]. Genelde, SFE katı örneklerden organik analitlerin ekstraksiyonu için kullanılır. Isısal olarak kararsız analitler için de uygundur.



Şekil 8. SFE Sistemi

SFE, çevresel, farmasotik, polimer ve gıda analizlerinde kullanılmaktadır. Ham sebze yağları gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılır. İstenmeyen bileşiklerin uzaklaştırılması için tüketilmeden önce yağların rafine edilmesi gerekir. Saflaştırma süreci sırasında, yağdaki faydalı bileşikler de kaybolabilir. Buğday tanesi yağında[83], preslenerek elde edilen yeşil kahve yağında[84], ham palmiye yağında[85] ilgilenilen bileşiklerle zenginleştirilmiş ekstraktlar elde etmek için alternatif bir saflaştırma metodu olarak SFE önerilmiştir. Yeşil çaydan secici olarak kafein ekstraksiyonunda yardımcı solvent olarak su ile süperkritik CO₂ kullanılmış ve matriksten antioksidanların ekstraksiyonu önlenmiştir [86]. Uçucu yağlar, yağ asitleri[87] ve/veya karotenoitler gibi biyoaktif bileşikler[88] meyve ve sebzelerden süperkritik CO₂ kullanarak ekstrakte edilmiştir. Daidzein ve genistein gibi izoflavonlar 350-500 bar arasındaki yüksek basınçlarda sulu metanol ve süperkritik CO₂ kullanılarak ekstrakte edilmişlerdir [89].

SFE' nin en ilginç uygulamalarından biri, genetik olarak değiştirilmiş farklı mısır ve soya türlerinde amino asit ilişkisini belirlemede kullanılmasıdır. Amino asitleri ekstrakte etmek için %35' lik metanol ile modifiye edilmiş süperkritik CO₂, 80 °C sıcaklık ve 120 bar basınçta kullanılmıştır. Ekstraktlar GC-MS ile analiz edilmiştir [90].

SFE gıda endüstrisinde yan ürünleri değerlendirmede geniş ölçüde kullanılmaktadır. Yan ürünlerin ekstraksiyonu, yararlanılmayan fakat değerli bileşiklerin uzaklaştırılmasını sağlar. SFE uzun zamandan beri bitki materyallerinden spesifik aktivite gösteren etkin bileşiklerin ekstraksiyonu için kullanılmaktadır.

İnsan faaliyetlerinin çevreye etkisini belirlemek önemlidir ve toprak ile tortu bu etkinin önemli göstergeleridir. Miyawaki ve arkadaşları, toprak ve tortularda poliklor dibenzo-p-dioksin, poliklor dibenzofuran, poliklor bifenil ve dioksin tayini için hızlı bir strateji geliştirmişlerdir [91]. Tarımsal ve endüstriyel toprak örnekleri suyla modifiye edilmiş süperkritik CO₂ kullanarak 300 bar basınçta, 130 °C sıcaklıkta ve 50 dakika süreyle ekstrakte edilmiştir. Kirlilikler alümina ile doldurulmuş SPE kartuşu kullanılarak tuzaklanmış ve hekzan ile geri alınmıştır. Derişimler GC-MS ile belirlenmiştir. Klasik ekstraksiyon işlemleri ile 3 güne ihtiyaç duyulurken, SFE ile toplam analiz süresi 2 saate indirilmiştir.

3. HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi)

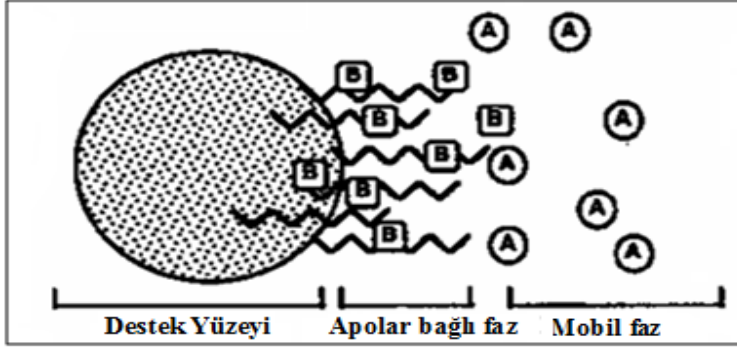
Kromatografi, karışımlardaki kimyasal bileşiklerin ayrılması, tanınması ve tayini için kullanılan bir analitik metottur. Sıvı kromatografide (LC), hareketli faz, sıvı; durgun faz, çok küçük boyutta katı parçacıklardan oluşur. Hareketli fazda bulunan bileşenler, sabit faz dolgu maddesiyle etkileşirler. Numunedeki her bileşen farklı miktarlarda tutulduğu için sabit fazı farklı zamanlarda terk ederler.

HPLC günümüzde,

1. Sıcaklıkla bozulan maddelerin ayrımlarında kullanılabilmesi
2. Etkin ayırma ve hızlı analiz sağlaması
3. HPLC kolonlarının rejenerasyon gerektirmeden tekrar kullanılabilmesi
4. Ayırmanın etkinliğine tesir eden parametrelerin kontrolü ile tekrarlanabilir sonuçların elde edilebilmesi
5. Cihazın otomasyona ve veri analizine uygun olması
6. Çok çeşitli detektörle tayin imkânı tanınması
7. Geniş skalada çalışmaya adapte edilebilmesi ve preparatif amaçlar için uygun olması
8. Doğruluk dereceleri ve kesinlikleri yüksek sonuçlar vermesi. Nedenleriyle oldukça yaygın kullanılan bir ayırma tekniği haline gelmiştir.

Sıvı kromatografi çalışmalarının % 90 kadarı ters faz sıvı kromatografi modunda gerçekleştirilir. Ters faz sıvı kromatografi (RP-HPLC), hidrofobik karakterli kimyasal bağlı durgun faz ve bundan daha polar mobil faz ile gerçekleştirilen bir dağılma/adsorpsiyon kromatografisi türüdür. Mobil faz olarak suyu metanol, asetonitril ve tetrahidrofuran gibi çözücüler ile karışımları kullanılır. Bu tip bir çalışmada, durgun faz apolardır. Dolayısı ile apolar bileşikler, bu tip durgun fazla daha etkin etkileşerek daha yavaş hareket ederler. Daha polar bileşikler, kolonu hızla terk ederler [92].

Şekil 9.' da hidrofobik karakterli analitin apolar yüzeyle etkileşimi, şema olarak verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi hidrofobik analit, apolar bağlı yüzeye daha çok etkileşime girer ve en son yüzeye tutunur.

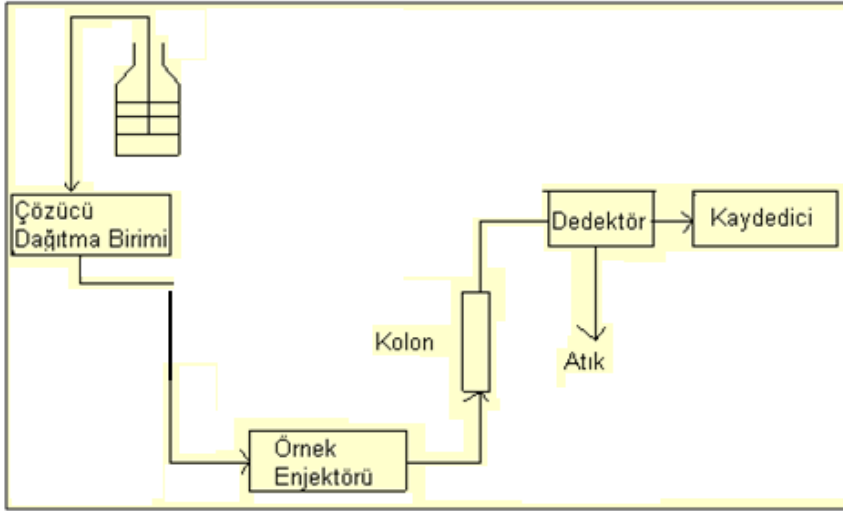


Şekil 9. Hidrofobik karakterli analitin apolar yüzeyle etkileşimi; A: çok polar analit
B: az polar analit

3.1. HPLC Cihazı

Bir sıvı kromatografi sistemi özetle aşağıdaki bileşenlere sahiptir.

- Sistem kontrol ünitesi
- Pompalama sistemi
- Numune enjeksiyon sistemi
- Kolon
- Detektör
- Mobil faz hazneleri
- Yazıcı

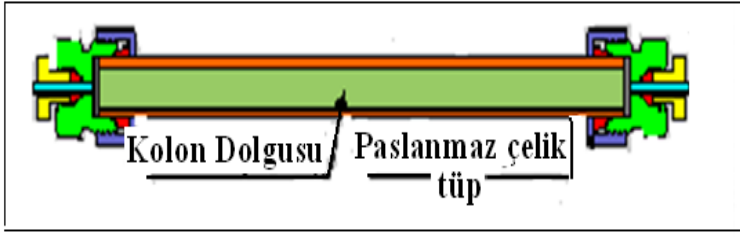


Şekil 10. Sıvı kromatografi cihazının şematik görünüşü

3.2. HPLC de Kolon Seçimi

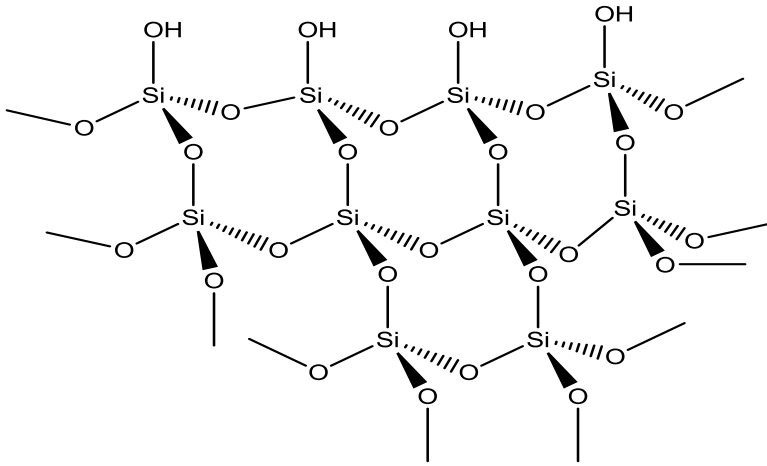
Sıvı kromatografik çalışmalarda alıkonmayı etkileyen temel faktörlerden biri, analitin kolon ile etkileşimidir. Bu nedenle bir ayırmaya başlanırken ilk öncelik, iyi bir kolon seçimidir. RP-HPLC' de dolgu maddesi olarak kullanılanların çoğu silika esaslı bağlı fazlar içerir. RP- HPLC de sıklıkla kullanılan durgun fazlar, C₈, C₁₈ düz zincirli alkil gruplu silika yapısındadır. Bu kolonlar C-8 ve C-18 diye tanımlanır. Ancak aynı tipte olsalar bile farklı özellikte olacakları ve farklı davranış gösterecekleri bilinmelidir. Farklı kolonlarda bileşiklerin elüsyon sırası ve ayrılma davranışları farklıdır.

LC çalışmalarında önce cam kolonlar kullanılmıştır. Bunların uzunlukları 50-500 cm olup çapları 1-5 cm dir. Günümüzde paslanmaz çeliklere dolgu maddesi konulmakta ve bunlar kolon olarak kullanılmaktadır. Farklı tipte ve farklı tanecik boyutunda yüzlerce tip kolon geliştirilmiştir. Gerekliğinde seri bağlanarak uzunlukları ve bir diğer deyimle etkin tabaka sayıları arttırılmaya çalışılmaktadır. Kolon dolgu maddelerinin parçacık boyutlarının küçülmesi (3-10 µm) ile kolon etkinliği arttırılmıştır.



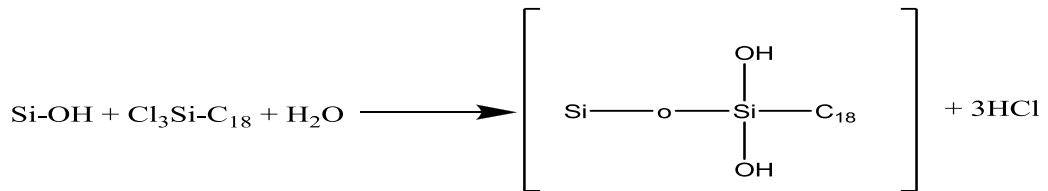
Şekil 11. Standart kolon donanımı

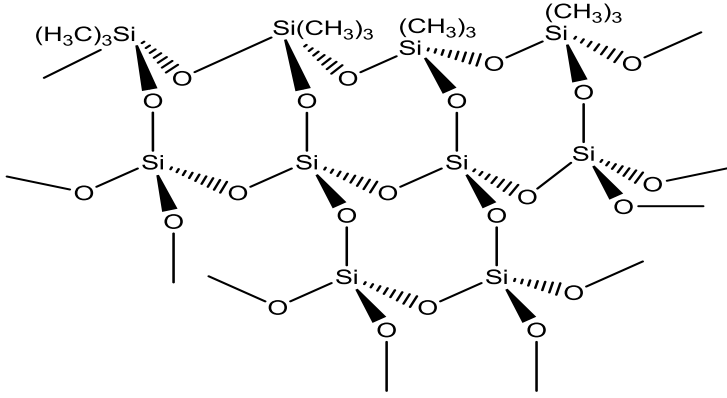
Silika destek yüzeyine durgun fazın kovalent bağlanması sonucunda, termal hidrolik ve kararlı bağlı faz oluşur. Şekil 12.' de durgun faz olan silika ve silanoller belirtilmiştir. Silikanın uzun zincirli hidrokarbon grupları ile alkillenmiş durumu Şekil 13.' de gösterilmiştir.



Şekil 12. Durgun Faz: Silika SiO2

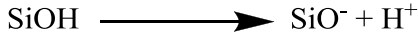
Silika dolgu maddesinden bağlı fazın sentezine ilişkin tepkime, aşağıdaki gibidir:





Şekil 13. Uzun zincirli hidrokarbon grupları ile alkilenmiş silika

Silanol grupları, yüzeyde aşağıda verilen denklem gereği iyonlaşır;



Bu denge, pK_a , SiOH iyonlaşma sabiti ile karakterize edilir ve sabitin değeri 6,5' dir. Silanol gruplarının iyonlaşması pK_a SiOH'ın üzerindeki pH değerlerinde iyonlaşmanın daha fazla olmasından dolayı durgun fazda negatif yüklenmenin artmasına sebep olur. Bu durum (-) yüklü iyonların gözenekleri terk etmelerine yol açar. Sonuçta negatif kapasite faktörleri elde edilir. İyonik dışlama, hareketli fazın iyon şiddetinin artması ile minimize edilebilir. Mobil fazın yüksek iyon şiddeti, silanolü maskeleyen etkisi nedeniyle pik şeklini iyileştirir. Ancak bu durum kolon bozunmasının artmasına sebep olabilir. Ayrıca silanol gruplarının farklı çevreleri, bunların farklı davranmalarına neden olur. Silanol grupları, çözünen moleküller ile elektrostatik olarak etkileşebilir. Bu etkileşimler uzun mesafede etkindir ve çözünen moleküller yüzeye yaklaşamayacak kadar büyük olduğunda bile büyük rol oynar. Silanol grupları, mobil fazın bileşenleri ile (su, organik modifiyer, tampon iyonları) de etkileşebilir ve bu etkileşim, durgun fazın yapısını ve bileşimini değiştirebilir. Kolonun ayırmadaki olumsuz etkileri, materyalin yapısında metal safsızlıklarının bulunmasından da kaynaklanır.

Oktadesil silika kolonlarda silanol gruplarının tamamı kapatılmamıştır. Kolonda kalıntı silanol gruplarının bozucu etkisi, silanol gruplarının yeterince kapatılmadığı durumda daha etkindir. Silika esaslı ters faz kolonlarında kalıntı silanol grupları, polar bileşikler ile etkileşir. Bu istenmeyen etkileşimleri azaltmak için endcapping (silanol gruplarını kapatma) işlemi uygulanır.

Metil grupları, kalıntı silanol gruplarının kapatılmasında tercih edilir. Polar bileşiklerle olumsuz etkileşim istenmiyorsa endcapped kolonlar tercih edilir.

Kolon dolgu malzemesinde dikkat edilmesi gereken bir diğer kavram karbon yüklemesidir (Şekil 14.). Karbon yüklemesi durgun fazdaki karbon içeriğini ifade eder. Silika esaslı kolonlarda kolon silika materyaline bağlı fazın miktarını ifade eder. Aynı durgun fazın kullanılması durumunda kolon dolgu taneciklerinin yüzey kaplamasını karakterize etmek için kullanılan bir terimdir. C₁₈ kolonların karbon yüklemesi, C₈ kolonlardan daha yüksektir: Karbon yüklemesi daha az olan kolonların hidrofobik özelliği daha düşüktür ve karbon yüklemesi daha büyük olan kolonlardan daha düşük alıkonma zamanları söz konusudur. Karbon yüklemesi arttıkça, kapasite faktörleri artar. Benzer hidrofobik özellikteki bileşikler için ayırma faktörü de büyür.



Şekil 14. Karbon Yüklemesi

Ters faz sıvı kromatografi kolonlarının ilk geliştirilenlerinde pH aralığı, 1-8 dir. Birçok kolon düşük pH' larda (pH<3) çalışmaya uygundur. Ancak düşük pH' larda çalışılması durumunda, bazı bileşiklerin kararsız olması, protonlanmış bazik bileşiklerin çok çabuk elue olması ve bu pH'larda bant genişliğinin yeterli olmaması nedeniyle pH 4-8 ve hatta pH>9 koşullarında çalışmak uygun gelebilir. Bu nedenle bazlarla çalışmada pH kararlılığı arttırılmış ve pH aralığı genişletilmiş kolonlar gerekir [93].

3.3. İzokratik ve Gradient Ayırma

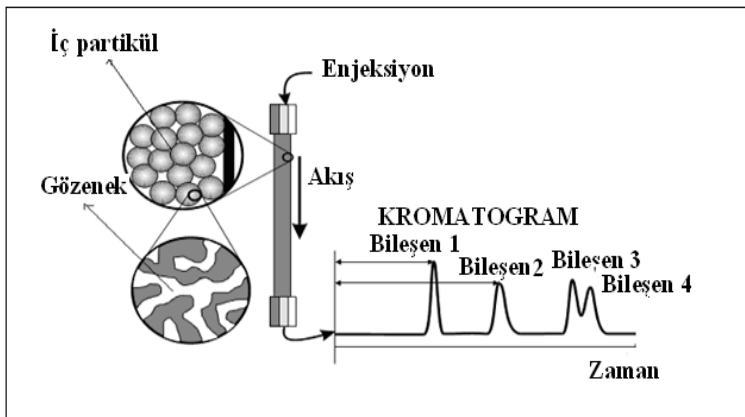
Bir kromatografik ayırmada çalışmacı kolon tipine ve kolon boyutlarına karar verdikten sonra organik modifiyer tipine ve tamponuna karar verir.

Bu noktada elüsyon modunu seçmek zorundadır. Elüsyon gücünü değiştirmeden aynı çözücü ile yapılan ayırma, izokratik ayırmadır. Polariteleri farklı iki (veya daha fazla) çözücü kullanılması durumunda gradient ayırma söz konusudur. Gradient ayırmada sıklıkla 2 çözücü kullanılır. Bunlardan ilki, su veya az miktarda organik çözücü içeren ikili karışımdır. İkinci ise organikçe zengin veya tamamen organik olan mobil fazdır. İzokratik elüsyonla ayrılamayan maddeler, gradient elüsyonla ayrılabilen; geç elüe olan maddelerin alıkonma zamanları kısaltılabilmektedir. Gradient çalışmada akış hızı kolonun dengelenmesine olanak sağlayacak şekilde seçilir. Bu nedenle akış hızı, izokratik elüsyondan daha düşüktür. Ayrıca gradient elüsyonda hayalet pikler, baseline da gürültü ve çözücü karışım ekipmanından dolayı problemler vardır. Son zamanlarda kolon gelişiminin olumlu getirileri, çok az bir dengeleme yapılmasının yeterli olabileceğini ve alıkonma zamanlarında yeterli tekrarlanabilirliğin elde edilebileceğini göstermiştir.

3.4. Kromatografide Temel Parametreler

Kromatografide veri yorumlanmasında kromatogram esas alınır. Kromatogram, tayini yapılan numunenin her bir bileşeni için belirli zamanlarda derişim değerine karşı elde edilen cevabın uygun dedektörle saptanması ile elde edilmiş pik grafiklerdir.

Kolonu terk eden maddelerin derişimleri uygun biçimde ölçülür; zamana karşı y-ekseninde işaretlenerek 'kromatogram' adı verilen grafikler elde edilir (Şekil 15.).



Şekil 15. Kolonda analit bileşenlerinin ayrılması ve kromatogram

Bir kromatogramın yorumlanmasında kullanılan başlıca parametreler aşağıda verilmiştir:

- i. Alıkonma zamanı, t_R ve kapasite faktörü, k
- ii. Seçicilik, α
- iii. Etkin tabaka sayısı, N
- iv. Ayırma gücü, R_s

3.4.1. Alıkonma Zamanı ve Kapasite Faktörü

Kromatografide bir pik, alıkonma zamanı ile (t_R) tanımlanır. Kromatografik karşılaştırmalarda alıkonma zamanı yerine sıklıkla kapasite faktöründen (k) yararlanılır. Analizi yapılan türlerin kolon içinde göç etme hızı, kapasite faktörü olarak ifade edilir.

$$k = \frac{t_r - t_0}{t_0}$$

Yukarıdaki formülde t_0 alıkonulmayan türün dedektöre kadar ulaşma zamanı (ölü zaman), t_r , analitin dedektöre ulaşma zamanıdır. Kapasite faktörü; uygulanan yöntem, her maddenin fiziksel ve kimyasal yapısına bağlı olarak farklılıklar gösteren bir değerdir.

Kromatografik parametrelerin optimizasyonunda dikkat edilmesi gereken en önemli parametrelerden biridir. Bileşenin kolonda iyi tutulması durumunda k değeri büyük olur yani bileşen kolon boyunca yavaş ilerliyor demektir. Buna mukabil k değeri küçük ise bileşen mobil faza ilgi duyuyor yani bileşen kolon boyunca hızlı ilerliyor demektir. HPLC çalışmalarında k mümkün olduğu kadar 1 ile 10 arasında tutulmalıdır. Kapasite faktörü çok küçük olursa, bileşik çözücü pikinden ayıramaz; çok büyürse ayırma işlemi çok zaman alır. k değerinin bu aralıkta olması, mobil faz ve durgun faz bileşimlerinin değiştirilmesi ile sağlanır.

3.4.2. Seçicilik

Kolonda daha uzun süre tutulan bileşene ait kapasite faktörünün, daha kısa süre tutulan bileşenin kapasite faktörüne oranı seçiciliği verir. Seçicilik faktörünün matematiksel ifadesi, aşağıdaki eşitlikte verilmiştir. α değeri, 1,15 ise iki bileşiğin %98 oranında birbirinden ayrıldığı kabul edilir.

$$\alpha = k_2/k_1 = (t_{R2} - t_{R0}) / (t_{R1} - t_{R0})$$

3.4.3. Teorik Tabaka Sayısı

Kolondan çıkan pikin sivri ve dar olması ve piklerin birbirlerinden iyi ayrılması ile ilgili olması münasebetiyle kolonun en önemli parametresidir. N' nin sayısal değeri, analizi yapılan maddenin cinsine bağlı olduğu gibi, deney koşullarına (akış hızı, sıcaklık, kolon kalitesi gibi), dolunun tek biçimliliği gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Tavsiye edilen değer $N > 2000$ dir.

Bir kromatografik ayırmada etkin tabaka sayısı, aşağıdaki bağıntıyla ifade edilir:

$$N = 5,54(t_R/W_{0,5})^2$$

Yukarıdaki bağıntıya göre;

N: Teorik tabaka sayısı

t_R : Bileşene ait alıkonma zamanı

$W_{0,5}$: Pikin yarı yüksekliğindeki pik genişliğidir.

3.4.4. Ayırma Gücü

Bir numunede bulunan bileşenlerin ne derece ayrıldıklarını gösteren kantitatif terimdir. Aşağıdaki bağıntı ile hesaplanır.

$$R_s = \frac{2\Delta Z}{W_A + W_B} = \frac{2[(t_R)_A - (t_R)_B]}{W_A + W_B}$$

Burada,

R_s : Pik çifti için ayırma gücü

W : Kromatogramdaki pikin kenarından çizilen teğetlerle taban çizgisi arasında kalan uzaklıktır.

Birbirini izleyen iki pik arasındaki ayırma gücü, R_s , için farklı hesaplama yöntemleri geliştirilmiştir. Aşağıdaki bağıntı kullanılarak da hesaplama yapılabilir:

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k_2}{1 + k_2} \right)$$

Burada;

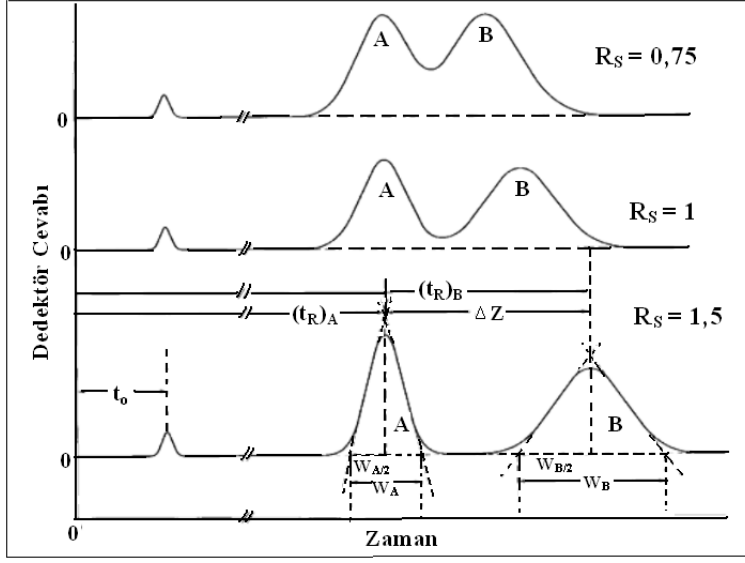
R_s : Pik çifti için ayırma gücü,

N : Etkin tabaka sayısı,

α : Seçicilik faktörü,

k_2 : İkinci pikin kapasite faktörüdür.

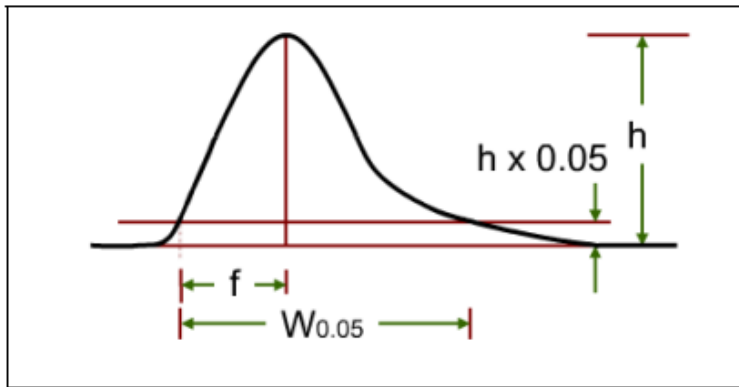
Bir kromatografik ayırmada en az ayrılan pikler, kritik pik çifti olarak adlandırılır. Sıvı kromatografide metot geliştirmede tüm pikler için ayırma gücünün $R_s \geq 1,5$ olması gerekmektedir. Şekilde üç R_s değerinde ayrılma görülmektedir [93].



Şekil 16. Aynı pik çifti için üç farklı ayırma gücü

3.4.5. Kuyruklanma Faktörü

Kromatografide bir diğer önemli faktör de kuyruklanma faktörüdür. Pik yüksekliğinin %5' inde hesaplanır. Pikin simetrik davranışını ifade eder. Simetrik bir pikte bu faktör 1'e eşittir. Rakamın 1 den farklı olması, kuyruklanmayı gösterir. Şekil 17.' de kromatogram üzerinde kuyruklanma gösterilmiştir.



Şekil 17. Kuyruklanma faktörünün kromatogram üzerinde gösterilişi

$$(Tf=W_{0,05}/2f)$$

3.5. Mobil Faz Optimizasyonu

Mobil fazın bileşimi, ters faz sıvı kromatografide bileşiklerin alıkonma davranışlarında en önemli rolü oynar [94,95]. HPLC de çözücü gücü, polaritenin bir fonksiyonu olarak ifade edilebilir. HPLC çözücülerinde ayırma gücü, polarite ile terslik gösterir. Diğer bir deyişle su gibi polar bir çözücünün tetrahidrofuran gibi apolar bir çözücünün yanında zayıf ayırma gücü gösterdiğini söyleyebiliriz. Bilindiği gibi sıvı kromatografide mobil faz olarak genellikle su organik çözücü ikili karışımları kullanılır. Mobil faz olarak kullanılan çözücü karışımlarında polarite, mobil fazın elue etme gücünün bir ölçüsüdür ve HPLC' de çözünenin alıkonmasını etkileyen temel faktördür. HPLC de alıkonma, mobil fazın organik çözücü içeriğinin artması ile azalır. Bu güç, çoğu zaman organik çözücü-su karışımlarında organik fazın yüzdesi ile ifade edilir. Sabit pH' da alıkonmanın çözücü bileşimi (ϕ) ile değişimini belirlemek üzere aşağıdaki doğrusal yaklaşım kullanılır.

$$\log k_i = \log k_0 - S_\phi$$

Bu lineer bağıntının geliştirilmesi için organik modifiyerin farklı derişimlerinde kapasite faktörleri belirlenir ve x ekseninde organik modifiyerin derişimi, y ekseninde kapasite faktörlerinin logaritması kullanılarak grafik hazırlanır. Bu tür bir lineer grafikte S, eğimdir; organik çözücünün çözücü gücü ile ilgili faktördür. Kapasite faktörü 1-10 arasında değilse $\log k'$ nın ϕ' ye göre çizimi doğrusal olmayan bir ilişki verir. İkinci dereceden denklemi kullanmamak için kapasite faktörünün 1- 10 arasında olması istenir. Bu bağıntıda k_0 , ϕ sıfır olduğunda yani mobil fazın organik modifiyer ihtiva etmemesi diğer bir deyişle saf su veya sulu tampon çözelti mobil faz olarak kullanıldığı koşuldaki kapasite faktörüdür. Bu bağıntı, HPLC de metot geliştirmede mobil fazın çözücü gücünün hesaplanmasında kullanılır. S değerleri, su için 0; metanol için 2,6; asetonitril için 3,2 ve tetrahidrofuran için 4,5 dir [95].

3.6. Mobil Faz pH Standardizasyonu

Bir kromatografik ayırmada mobil faz pH sı, tamponlarla belirlenir. Sıvı kromatografide kullanılan mobil fazların pH' sı, önceleri sulu çözeltinin pH' sı olarak alınmıştır.

Günümüzde organik modifiyer ilavesi ile pH değişimini göz önünde bulundurmak gerekir. pH' sının sudaki pH yerine mobil fazdaki değerinin kullanılması, çözünenin tutulması ile pH arasındaki ilişkiye çok daha iyi uyum göstermektedir.

HPLC mobil fazında organik modifiyer olarak genellikle asetonytril ve metanol tercih edilir. Bu ortamlarda pH standardizasyonu ile ilgili çalışmalar mevcuttur. Su ve su-organik çözücü karışımlarında referans değer pH standart çözeltisi (RVS) olarak potasyum hidrojen fitalat çözeltisi seçilmiştir ve 0,05 mol/kg fitalat temel alınmıştır.

Mobil fazın pH' sı, alıkonmanın anlaşılmasında son derece önemlidir. Mobil faz pH' sı, çözünenlerin iyonlaşma derecesini, durgun faz ve mobil faz katkılarının davranışlarını etkilediği için seçiciliğin optimizasyonunda dikkate alınmalıdır. Mobil faz pH optimizasyonu, çözücü bileşiminin optimizasyonundan çok daha karmaşıktır.

3.7. Alıkonmaya Etki Eden Faktörler

HPLC de seçicilik ve alıkonma, bileşiklerin, elüe edicinin, durgun fazın etkileşimi ile ilgilidir. Daha önce belirtildiği gibi alıkonmayı etkileyen temel faktörlerden biri, analitin kolon ile etkileşmesidir. İyonlaşabilen analitlerin aynı kolonda alıkonmasına; organik modifiyerin tipi, organik modifiyerin derişimi, sıcaklık ve mobil faz pH' sı etki etmektedir. HPLC ayırmalarında kullanılan organik modifiyer derişiminin artırılması elüsyonu hızlandırır yani alıkonmayı azaltır.

Alıkonmaya etki eden bir diğer faktör sıcaklıktır. Genel bir ifade ile Genel bir ifade ile sıcaklık artışı ile alıkonma azalır log k' ya karşı 1/T grafiği yaklaşık olarak lineerdir. Kabaca bir tahminle sıcaklıktaki 30 °C artış alıkonmayı 2 kat azaltır. Sıcaklık arttıkça kromatografik verim artar; kolon geri basıncı azalır. Buna ek olarak sıcaklığı artırmak numunenin çözünürlüğünü artırır. Kolon sıcaklığını kontrol etmenin bir diğer avantajı alıkonma zamanı kararlılığının gelişmesidir. Bununla birlikte HPLC ayırmalarındaki seçicilik üzerinde sıcaklık etkisi çok azdır. Göz önünde bulundurulması gereken bir diğer husus da sıcaklık artışının bağlı fazın bozunmasını artırıcı netice doğurmasıdır, bu sebepten kolon üreticileri çalışma sınırlarını önermektedir.

Dar sıcaklık aralığında, sıcaklığın alıkonma faktörü üzerindeki etkisi genellikle Van't Hoff eşitliği ile açıklanabilir. Bu eşitlik aşağıdaki şekilde yazılabilir:

$$\log k = -\frac{\Delta H}{2,3 RT} + \frac{\Delta S}{2,3 R} + \log \Phi$$

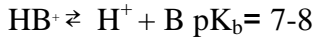
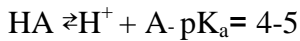
Bu bağıntıda ΔH ve ΔS , analitin durgun fazla ve mobil fazla etkileşiminin sonucunda oluşan entalpi ve entropi değişimidir. R gaz sabiti ve Φ faz oranını ifade etmektedir. Bu bağıntıya göre dar sıcaklık aralığında log k ya karşı 1/T grafiği lineerlik göstermektedir.

ΔH , ΔS ve Φ parametreleri bu aralıkta sıcaklıktan bağımsızdır. Aynı şekilde Van't Hoff eşitliği denge sabiti K_a 'nın sıcaklıkla değişimini de açıklar:

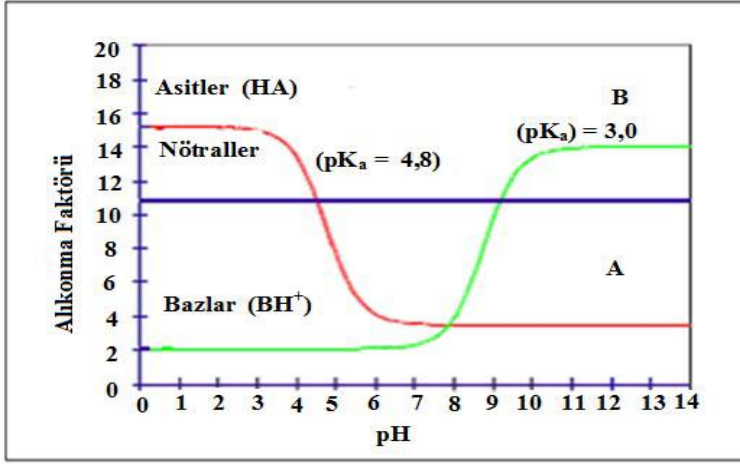
$$pK_a = \frac{\Delta H_a}{2,3 RT} - \frac{\Delta S_a}{2,3 R}$$

Kromatografik ayırmada mobil faz pH' s1, iyonlaşabilen bileşiklerin (organik asit, organik baz) ayrılmalarında önemli bir faktördür. Mobil fazın pH' s1, analitin iyonlaşması ve solvasyonu, analitlerin durgun fazla etkileşimini, durgun faz yapı ve özelliklerini, bağlı fazın kararlılığını ve silika dolgunun çözünmesini etkiler. HPLC de mobil faz pH s1, özellikle iyonlaşabilen bileşiklerle çalışmada çok etkindir.

Bilindiği gibi zayıf asit ve zayıf bazların iyonlaşmaları aşağıdaki gibidir.

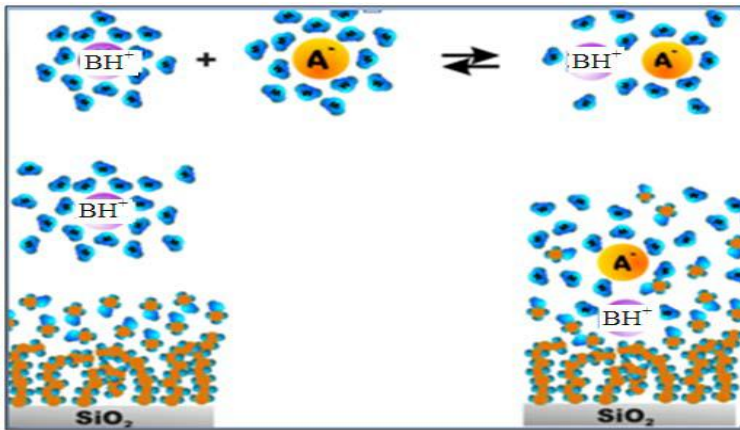


Zayıf asitte pH>4-5 iken temel tür A^- , zayıf bazda pH<7-8 iken temel tür BH^+ dir. İyonlaşmış türler, daha kısa sürede elüe olmaktadır.



Şekil 18. Asit, baz ve nötral bileşikler için alıkonma faktörüne karşı pH grafiği

Asidik bileşiklerle çalışılırken, pik şeklinin iyileştirilmesi amacıyla mobil faz modifiyerleri kullanılmaktadır. Bu amaçla en çok kullanılan mobil faz modifiyeri TFA ve asetik asittir. Düşük derişimlerde kullanılması TFA için tercih sebebi olmaktadır. Protonlanmış bazik bileşiklerin alıkonmasında ise inorganik mobil faz modifiyerleri etkilidir. Analitin mobil fazdaki solvasyon-desolvasyon dengesinin değişmesi ile ilişkilendirilen bu durum kaotropik etki olarak adlandırılmaktadır. İyon durumundaki bazik bileşiklerin alıkonması, mobil faz pH sına vetampon derişimine bağlıdır. Şekil 19.' da tampon anyonunun, bazik bileşiğin alıkonmasındaki etkisi şema olarak verilmiştir [93].



Şekil 19. Hidrofobik yüzeyde protonlanmış bazın alıkonmasında kaotropik madde etkisi

3.8. Validasyon Parametreleri

3.8.1. Doğruluk

Analiz sonucu elde edilen değerin gerçek değere yakınlığının ölçüsüdür. Sonuçlar ortalama % geri kazanım olarak verilir. Ortama ilave edilen analitin (analizi yapılacak madde) analiz yapılan ortamdan hangi oranda geri alınabildiğini gösterir. Seçilen her bir derişim için minimum 5 tayin yapılmalıdır. Bu tayinlerden minimum 3 tanesi ortalama değerin %15 inden daha fazla sapma göstermemelidir. Tayin alt sınırındaki derişim için bu sapma % 20' yi geçmemelidir.

Geri kazanım çalışmaları için 3 yol izlenebilir. Bunlar:

i.Referans bir yöntemle karşılaştırmak:

Geliştirilen analiz yöntemi ile 3 farklı derişimde, üçer ölçüm alınır ve bu değerler % geri kazanım değerlerine çevrildikten sonra tümü bir araya getirilir. Sonuçlar referans kabul edilen veya basılı olan başka bir yöntem sonuçları ile istatistiksel olarak karşılaştırılır. Sonuçların ortalamaları, % bağıl standart sapma (%BSS) ve/veya % bağıl hata (BH) (% Bias) ile beraber verilir

$$\%BSS = \frac{SS}{X_{ort}} \times 100$$

$$\%BH = \frac{GD - X_{ort}}{GD} \times 100$$

GD: Gerçek Değer

SS: Standart Sapma

X_{ort}: Ortalama Değer

ii. Kör matriks ortamına analizi yapılan maddeyi ilave etmek:

Farmasötik dozaj formları gibi matriks etkisi olan numunelerle çalışıldığı zaman kullanılan bir yöntemdir.

Analizi yapılacak madde boş matrikse değişik derişimlerde eklenir. Boş matriks, ilaç dozaj formları için (etken maddesiz) yardımcı maddelerden, pestisit kalıntıları için pestisit ile muamele edilmemiş ekinlerden oluşur.

Genellikle % 50, 75, 100, 125 ve 150 oranında madde ilavesi yapılır ve her seviyede en az 3'er ölçüm yapılır. Sonuçlar % geri kazanım olarak ifade edilir ve % bağıl standart sapma ve/veya % bağıl hata (% Bias) ile beraber verilir.

iii. Standart ekleme yöntemi ile saf madde ilavesi:

Analizi yapılacak maddenin bilinen ve değişik miktarları, matriks içerisinde yer alan ve miktarı bilinmeyen veya daha önce tayin edilmiş aynı maddenin üzerine ilave edilir. Asıl numunedeki etken madde derişimi, deney verilerinden matematiksel olarak hesaplanır. Genellikle % 25, 50, 100 oranında madde ilave etmek iyi bir yaklaşımdır. Madde ilave edilmiş ve ilave edilmemiş bütün numuneler en az 3'er defa analiz edilir. Sonuçlar, ilave edilen ve ölçülen madde miktarları verilerek ifade edilir. Bu teknik, katkı maddelerinin ve yardımcı maddelerin bilinmediği durumlarda kullanılır. Sonuçların ortalamaları, % bağıl standart sapma ve/veya % bağıl hata (% Bias) ile beraber verilir.

3.8.2. Kesinlik

Geliştirilen yöntemin çalışılan koşullar altında tekrarlanabilirliğinin ölçüsüdür. Başka bir ifade ile aynı yöntem birden çok sayıda uygulandığında analit için bulunan sonuçların birbirine yakınlığının bir ölçüsüdür. % BSS (Bağıl Standart Sapma) veya % VK (Varyasyon Katsayısı) olarak ifade edilir. Ölçüm yapılan her bir derişim için minimum 5-6 tayin yapılmalıdır. Bunlardan en az 3 deney sonucunun % BSS' 1, teorik değerin % 15'inden daha fazla sapma göstermemelidir.

Kesinlik, tekrarlanabilirlik (repeatability), orta kesinlik (intermediate precision) ve tekrar elde edilebilirlik (reproducibility) olmak üzere üç kısımda incelenmektedir.

3.8.2.1. Tekrarlanabilirlik

Kısa zaman aralığı içerisinde aynı işlem koşulları altındaki kesinliği ifade eder. Analizi yapılacak maddenin çalışma ortamındaki çözeltisi hazırlanır ve bu çözeltilerden en az 10 ölçüm yapılır (30-40 ölçüm tercih edilmelidir). Bu tekrar edilebilirlik, gün içi kesinlik olarak da adlandırılır. Kesinlik, elde edilen değerlerin %BSS' ı verilerek ifade edilir ve $\%BSS \leq 1,0$ olmalıdır.

3.8.2.2. Orta-Kesinlik

Orta kesinlik, laboratuvar içi deneysel farklılıkları belirten bir kesinlik derecesidir. Farklı günlerde, farklı analizciler veya farklı cihazlar kullanılarak belirlenen değerlerdir. Günler arası kesinlik olarak tanımlanan bu değer, çalışmanın tam anlamda kesinliğini belirtir. Bu kesinliği sağlayan çalışma, diğer kesinlik parametrelerini de sağlamış olur. Analizi yapılacak maddenin çalışma ortamındaki çözeltisi ayrı ayrı hazırlanır ve bu çözeltilerin her birinden en az 3'er ölçüm, farklı günlerde ve/veya farklı analizciler tarafından ve/veya farklı cihazlarla yapılır. Orta kesinlik, elde edilen değerlerin %BSS' ı verilerek ifade edilir ve $\%BSS \leq 2,0$ olmalıdır. Biyolojik numunelerle çalışırken %BSS değerleri 10-15'e kadar çıkabilmektedir.

3.8.2.3. Tekrar Elde Edilebilirlik

Tekrar elde edilebilirlik, özellikle ortak çalışma yapan farklı laboratuvarların uygulamaları sonucu elde edilen ve deneysel farklılıkları belirten bir kesinlik derecesidir. Özellikle yöntem standardizasyonu çalışmalarında kullanılan bir kesinlik değeridir. Geliştirilecek yöntem, farklı laboratuvarlarda aynı anda kullanılacaksa bu kesinliğin hesaplanması ve değerinin raporda belirtilmesi gerekir. Analizi yapılacak maddenin çalışma ortamındaki çözeltisi ayrı ayrı laboratuvarlarda, farklı zamanlarda ve farklı analizciler tarafından hazırlanır ve bu çözeltilerin her birinden en az 3'er ölçüm yapılır. Deneyle en az bir kaç gün ara ile yapılmalıdır.

Tekrar elde edilebilirlik, ölçülen değerlerin %BSS' ı verilerek ifade edilir ve $\%BSS \leq 2,0$ olmalıdır. Biyolojik numunelerle çalışırken %BSS değerleri 10-15'e kadar çıkabilmektedir.

3.8.3. Seçicilik

Analizi yapılacak maddenin, numunede mevcut girişim yapma ihtimali bulunan diğer yardımcı veya etken maddeler yanında miktarının tam ve doğru olarak tayin edilebileceğini gösteren bir parametredir. Özellikle kararlılık tayini çalışmalarında yapılması kesinlikle zorunlu olan bir parametredir. Seçicilik yeterli düzeyde değilse, yöntemin doğruluğu, kesinliği ve doğrusallığı hakkında bir şüphe uyanır.

Seçicilik, miktar tayini sırasında gerekli validasyon işlemleri yapılırken, teşhis testleri ve safsızlıkların tayini sırasında yapılmalıdır. Seçicilik, 2 yolla saptanır:

- i. Tayini yapılan bileşik ile girişim yapma olasılığı bulunan maddelerin girişim yapma oranına veya ayırma yöntemlerinde, “Ayrım gücü” (Rs) değerlerine bakılır. Bu değer ayırma yöntemleri için $R_s \geq 2,0$ olmalıdır.
- ii. Ayırma yöntemlerinde duyarlı bir detektör seçilebilir. İncelenecek bileşiğe cevap verme yeteneğine sahip olan detektörler, elektrokimyasal veya radyoaktivite detektörleridir. Bu detektörler belli maddelere duyarlıdır ve başka maddelerin girişim yapma ihtimalini yok ederler.

3.8.4. Teşhis Sınırı (LOD)

Analitin belirlenebildiği fakat nicel sınırlar içerisine girmediği en alt derişimdir. Doğrudan, yapılan deneylerden veya hesapla bulunabilir. Doğrudan yapılan deneylerden, gözlenerek yapılan hesaplamalarda genel olarak Sinyal/Gürültü (signal/noise) oranı 3 olarak alınır.

Teşhis Sınırı aşağıdaki gibi hesaplanır.

$$LOD = 3,3 \times SS / m$$

Bu eşitlikte SS, kör çözeltilerinde (en az 5 adet) yöntem uygulandığında elde edilen sonuçların veya ilgili kalibrasyon doğrusunun kesim değerinin standart sapması; m, ilgili kalibrasyon doğrusunun eğim değeridir.

3.8.5. Tayin Alt Sınırı

Analizi yapılan maddenin miktarının kabul edilebilir düzeyde kesinlikte ve doğrulukta tayin edilebileceği kalibrasyon eğrisinin en alt derişimini oluşturan derişim düzeyidir. Doğrudan yapılan deneylerden veya hespla bulunabilir. Doğrudan yapılan deneylerden gözlenerek LOQ tespiti için genel olarak Sinyal/Gürültü oranı 10 olarak alınır. Tayin Alt Sınırı aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanır.

$$LOQ= 10 \times SS / m$$

Burada SS, kör çözeltilerinde (en az 5 adet) yöntem uygulandığında elde edilen sonuçların veya y eksenindeki kesim değerinin standart sapması; m, ilgili kalibrasyon doğrusunun eğim değeridir. Bir yöntemde SS ve m değerleri, LOD eşitliğinde kullanılan değerlerle aynıdır.

3.8.6. Doğrusallık

Derişime karşı cevabın doğru orantılı olarak artması ve çizilen grafikte noktaların düz bir çizgi üzerinde yer almasıdır. Korelasyon katsayısı (r), doğrusallığı veren parametredir. Doğrusallık, korelasyon katsayısı r, 0,999 ise sağlanmış demektir.

Doğrusallığı belirleyebilmek için stok çözeltilerden en az 5 değişik derişimin hazırlanması ve analiz edilmesi gerekir. Bu derişimin alt sınırı hedef seviyenin % 50 sinden düşük ve üst sınır da % 150 sinden yüksek olacak aralıkta seçilmelidir. Bu 5 değerle yapılan doğrusallığın saptanması işleminin en az 3 defa tekrarlanması gerekir. Doğrusallığın tam validasyonu için ayrıca eğim ve kesim değerlerinin %BSS' ları veya standart hataları da hesaplanmalı ve raporda verilmelidir.

3.8.6.1. Kalibrasyon Grafiği

Analitin bilinen derişimleri ile değişen değişkenin cevapları arasındaki ilişkidir. Bir kalibrasyon eğrisi hazırlanırken seçilen derişimler daha önce yapılan çalışmalarla belirlenir. Doğrusal veya doğrusal olmayan sonuçlar elde edilebilir. Tayin alt sınırı ve tayin üst sınırı derişimleri de dahil olmak üzere çalışma aralığında en az 5 derişim için cihazdan ölçülen değerler kullanılarak hazırlanır. Doğrusal olmayan eğriler için daha fazla standart derişimin seçilmesi uygun olur.

3.8.6.2. Duyarlılık

Duyarlılık, doğrusallığın geçerli olduğu aralıktaki doğru denkleminin eğimidir. Pek çok kitapta aynı zamanda tayin alt sınırı olarak da tanımlanmıştır. Tayin alt sınırı ne kadar küçükse yöntem o derece duyarlıdır.

3.8.6.3. Çalışma Aralığı

Yeterli doğruluk ve duyarlılıkta doğrusallığa sahip yöntemin geçerli olduğu alt ve üst sınırlar arasında yer alan derişim aralığıdır. Derişim aralığı genellikle seçilen yöntemin tipine göre değişir. Bu aralık yöntemin doğrusallığı bulunduğundan sonra belirlenir. Ana maddenin analizinde standartların derişimleri genellikle hedeflenen seviyede veya ona yakın ölçülür. Bu derişimin alt sınırı hedef seviyenin %50' sinden düşük ve %150' sinden yüksek olacak aralıkta seçilmelidir. Hedef miktarın % 50, 75, 100, 125 ve 150 olacak şekilde aralık düzenlenebilir.

3.8.6.4. Sağlamlık

Yöntemin, analiz parametrelerindeki ufak değişimlerden etkilenmeden kalabilme kapasitesidir. Bu parametreler organik çözücü yüzdesi, pH, iyonik güç, sıcaklık gibi etkenlerdir. Kararlılık yöntemin normal kullanımındaki güvenilirliğinin bir ölçüsüdür ve yöntem geliştirilirken değerlendirilmesi gereken bir parametredir.

3.8.6.5. Tutarlılık

Yöntemin gerçek kullanım koşulları altında tekrar edilebilirliğinin saptanmasıdır. Bunun için çalışma, aynı laboratuarda farklı analizciler tarafından; aynı laboratuarda farklı cihazlar tarafından farklı laboratuarda gerçekleştirilmesi gerekir. Reaktif ve çözücülerin markalarının değiştirilmesi; farklı günlerde ve sıcaklıklarda yapılması gibi normal test şartlarının değiştirilmesi; aynı marka ve modele sahip yeni bir kolon kullanarak tekrarlanması gereklidir [94].

4. MATERYAL VE METOT

4.1. Kullanılan Materyal

Deneysel çalışmalarda kullanılacak enginar ve dişbudak ağacı yaprakları bahar aylarında toplandı ve oda sıcaklığında karanlık odada bir ay süreyle kurutuldu. Kurutulmuş yapraklar ekstraksiyondan önce robot ile 80-100 mesh tane boyut aralığına öğütülmüştür.

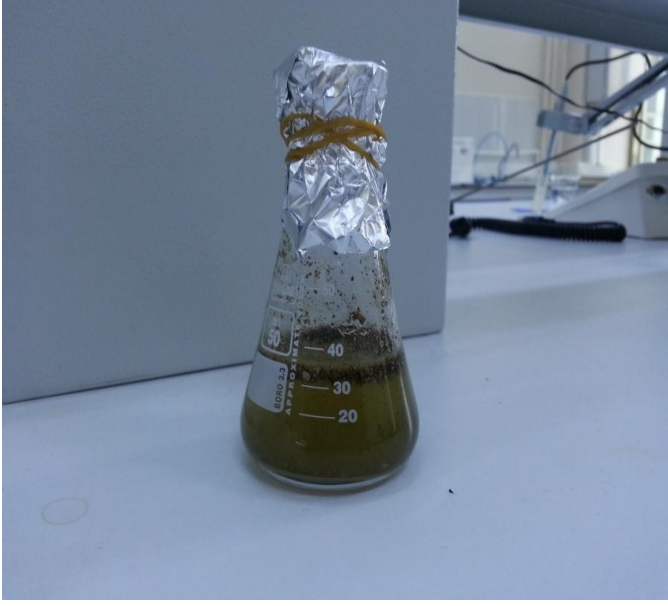
Deneyselerde kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıkta ve analizlerde kullanılan kimyasallar HPLC grade saflıktadır. Metanol, Amonyak, Glasiyel Asetik Asit, Hidroklorik Asit and Sodyum Hidroksit ve Klorojenik Asit standardı Sigma-Aldrich firmasından satın alındı. Solvent olarak Millipore Milli-Q Su Saflaştırma Sisteminden elde edilen $<18 \text{ m}\Omega$ deiyonize su kullanıldı. Tampon çözeltilerin filtrasyonu için $0,45\mu\text{m}$ boyutunda membran filtre (Millipore, Bedford, MA, USA) kullanılmıştır. Standart olarak kullanılan Klorojenik asitin özellikleri aşağıda belirtilmiştir;

Çizelge 2. Kullanılan klorojenik asit standardının özellikleri

Marka	Sigma Aldrich
Yüzde Saflık	>99
Molekül Kütlesi	$354.31 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

4.2. Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon

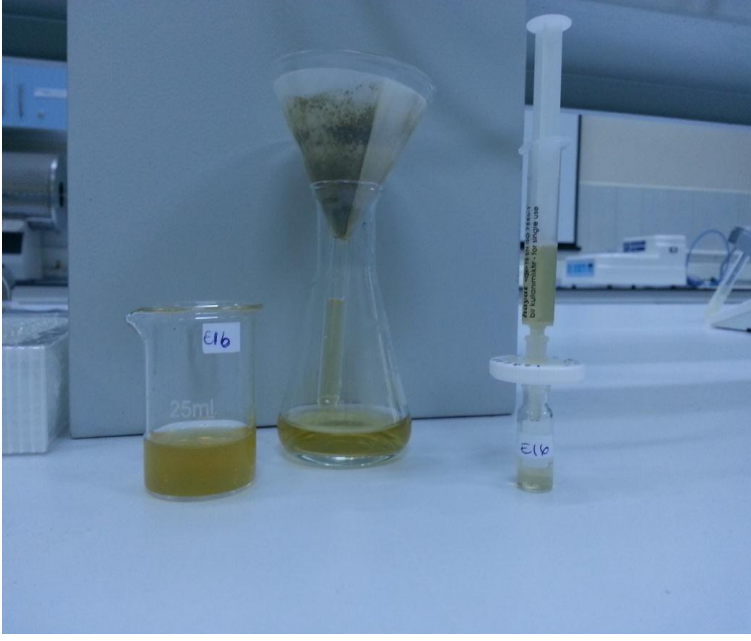
Ultrasonik destekli ekstraksiyon Bandelin Sonorex marka 50 kHz frekanslı ultrasonik banyoda yapıldı. Erlenmayere kurutulmuş ve öğütülmüş dişbudak ağacı yaprakları ve enginar yapraklarından 500 mg tartıldı. Üzerine 30 ml solüsyon olarak saf su ilave edildi. Erlenin ağzı alüminyum folyo ile kapatıldı ve banyo içerisine yerleştirildi. Erlendeki solvent düzeyi ile ultrasonik banyodaki su düzeyi aynı tutuldu. Tabloda belirtilen ultrason gücü, sıcaklık ve süre cihaza set edilip cihaz çalıştırıldı.



Resim 5. Ultrasonik banyoya konmaya hazır numune



Resim 6. Ultrasonik banyo sonrası ilk filtrasyon işlemi



Resim 7. 0,45 mikronluk membran ile vial filtrasyon işlemi (sağda)

Ekstraksiyon işlemi tamamlandıktan sonra kapilerin tıkanmasını önlemek amacıyla çözelti önce Whatman marka filtre kâğıdı ile sonrasındaysa 0,45 mikronluk membran filtre ile filtre edildi.

Çizelge 3. Bağımsız değişkenlerin değerleri ve sembolleri

Bağımsız Değişkenlerin Değerleri ve Sembolleri					
Bağımsız Değişkenler	Birimler	Değişkenlerin Sembolleri	Kod Düzeyleri		
			-1	0	1
Ultrason Gücü	%	A	25	50	75
Ekstraksiyon Süresi	dk	B	15	30	45
Ekstraksiyon Sıcaklığı	⁰ C	C	30	50	70

Çizelge 4. Deney koşulları

Deney No	Ultrason Gücü*(%)	Süre (dk)	Sıcaklık(⁰ C)
1	50	45	70
2	25	30	70
3	50	30	50
4	75	15	50
5	25	30	30
6	25	15	50
7	50	15	30
8	75	45	50
9	50	30	50
10	50	30	50
11	75	30	70
12	50	30	50
13	50	45	30
14	75	30	30
15	50	15	70
16	25	45	50
17	50	30	50

* Ultrasonik banyonun toplam gücü 420 wattır.

4.3. Kromatografik Koşullar (HPLC Metodu)

Ekstraktlardaki Klorojenik Asitin tanımlanması ve miktarının belirlenmesi oto örnekleyici, quaternar pompa, kolon fırını ve UV dedektör içeren ve bir Base-Deactivated Octadecylsilyl Silica Gel, 5 µm, 4.0 x 250mm kolon kullanan Agilent 1260 Kromatografik Sistem ile yapıldı.

Çizelge 5. HPLC metodu

HPLC Analiz Metodu	
Kolon	Base-deactivated Octadecylsilyl Silica Gel, 5 µm, 4.0 x 250mm
Mobil Faz	Mobil Faz A: 15 metanol + 85 ml su karışımı hazırlanır. pH seyreltik fosforik asit çözeltisi ile 2 ye ayarlanır. Mobil Faz B: Saf metanol
Enjeksiyon Hacmi	20 mL
Kolon Sıcaklığı	30 °C
Dedeksiyon	330 nm
Akış Hızı	1 ml/dk.
Analiz Süresi	36 dakika

4.3.1. HPLC Analiz Metodunun Validasyon Çalışmaları

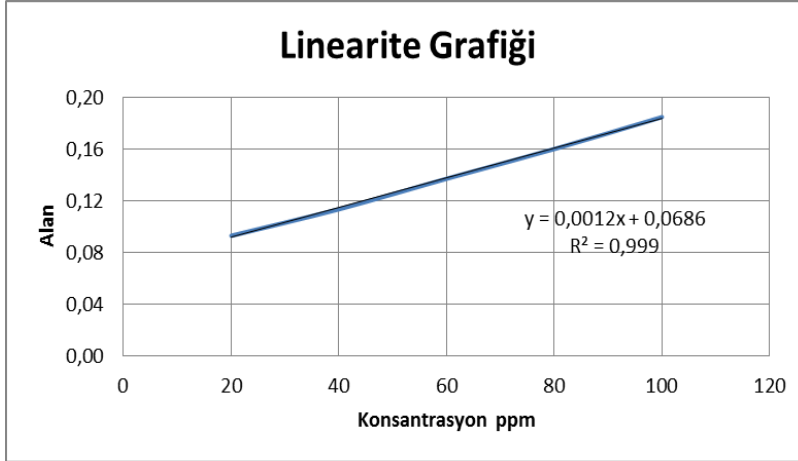
Analiz metodunun validasyon çalışmaları kapsamında SigmaAldrich firmasından temin edilen toz formundaki klorojenik asit standardı kullanılarak 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm ve 100 ppm lik standart solüsyonlar hazırlandı. Bu standart solüsyonlar her biri beşer kez HPLC cihazına enjeksiyonu yapıldı. Elde edilen kromatogramlardaki pik alanlarından yararlanılarak gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik, kalibrasyon doğrusalılığı ve tekrarlanabilirlik testleri yapıp, konsantrasyon aralığı, korelasyon katsayısı, kayma, eğim, teşhis limiti değeri (LOD), tayin limiti değeri (LOQ) ve alıkonma zamanı tespit edildi.

Çizelge 6. Analitik metodun validasyonu süresince farklı parametrelerin testinden elde edilen sonuçlar

Parametreler	Klorojenik Asit	
Linearite	Konsantrasyon Aralığı (ppm)	20-100
	Korelasyon Katsayısı	0.9999
	Kayma	4.526
	Eğim	6.4094
LOD (ppm)	0.076	
LOQ (ppm)	0.254	
Alıkonma Zamanı (dk)	9.480	

4.3.1.1. Analitik Metodun Doğrusallığı

5 farklı konsantrasyona karşı elde edilen pik alanları grafiğe geçirilerek kalibrasyon doğrusallığı elde edilmiştir.

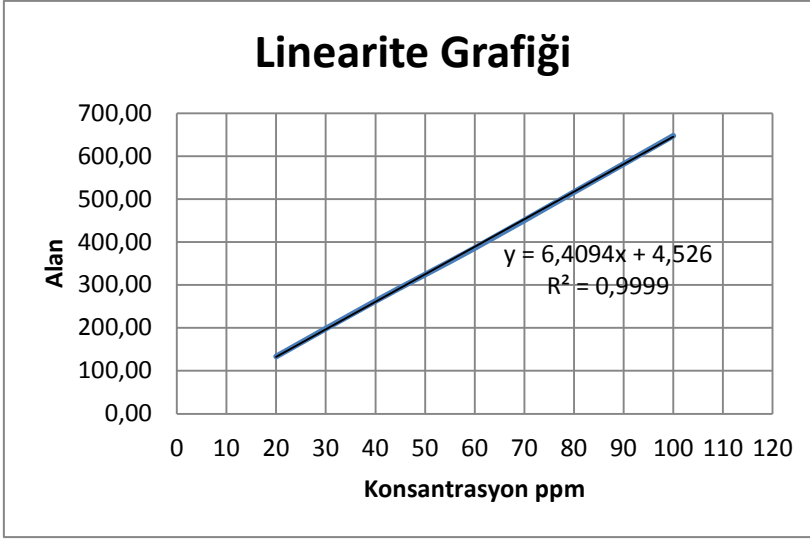


Şekil 20. Standartların doğrusallığı

Cihazın kalibrasyonu için 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, 100 ppm lik standart solüsyonlarından ardı ardına beşer enjeksiyon yapıldı. Bu enjeksiyonlardan elde edilen kromatogramlar ve pik alanları aşağıdaki gibidir.

Çizelge 7. Kalibrasyon tablosu

ENJEKSİYON	20 ppm	40 ppm	60 ppm	80 ppm	100 ppm
1	133,82	262,17	383,32	517,07	648,52
2	132,32	264,19	387,59	515,39	648,37
3	131,10	262,90	387,25	516,29	647,36
4	137,83	261,91	385,94	516,32	645,98
5	131,82	261,13	385,62	516,13	646,91
ORTALAMA	133,38	262,46	385,94	516,24	647,43
SD	2,6810	1,1556	1,6886	0,5984	1,0547
%RSD	2,0101	0,4403	0,4375	0,1159	0,1629



Şekil 21. Kalibrasyon doğrusallığı

4.3.1.2. Teşhis Limiti Değeri (LOD) ve Tayin Limiti Değeri (LOQ) Belirlenmesi

- $y = 6,4094x + 4,526$ $R^2 = 0,9999$ $SD = 0,1629$

i. Dedeksiyon Limitinin (LOD) Hesaplanması:

- $LOD = 4,526 + 3 \cdot (0,1629)$
 $LOD = 5,015$
 $Y = 5,015 = 6,4094 X + 4,526$
 $X = 0,076 \text{ ppm}$

ii. Tayin Limitinin (LOQ) Hesaplanması:

- $LOQ = 4,526 + 10 \cdot (0,1629) = 6,155$
 $Y = 6,155 = 6,4094 x + 4,526$
 $X = 0,254 \text{ ppm}$

5. UV – VİS SPEKTROMETRE

5.1.Çalışma İlkesi

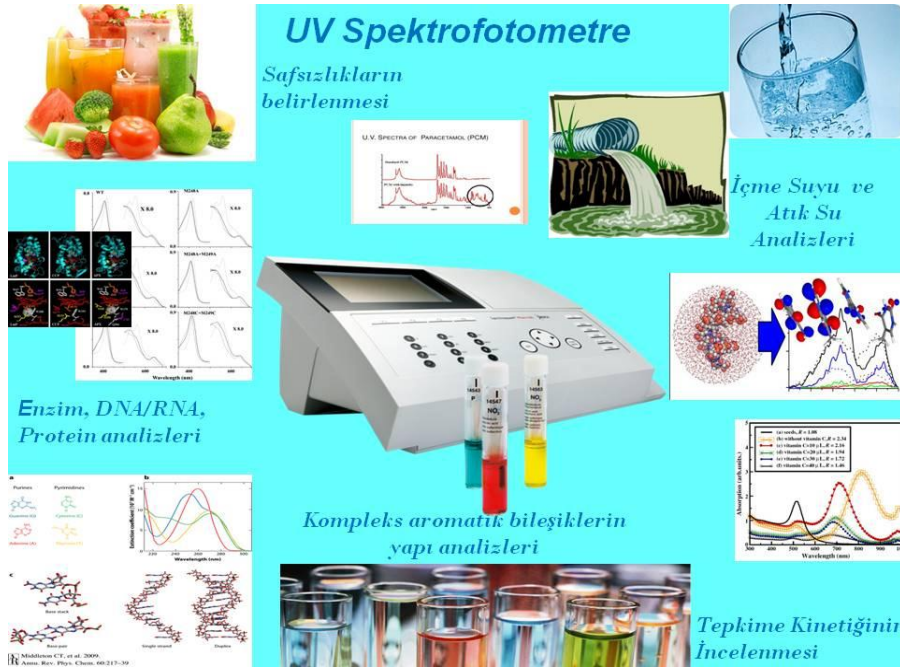
Moleküler absorpsiyon spektroskopisi 160-780 nm dalga boyları arasındaki ışığın b ışın yoluna sahip bir hücredeki çözeltinin geçirgenliğinin (T) veya absorbansının (A) ölçümüne dayanır. Bu absorpsiyon daha çok moleküllerdeki bağ elektronlarının uyarılmasından kaynaklanır, bunun sonucu olarak moleküler absorpsiyon spektroskopisi bir moleküldeki fonksiyonel grupların tanımlanmasında ve aynı zamanda fonksiyonel grupları taşıyan bileşiklerin nicel tayininde kullanılır. UV/Vis spektroskopisi çok sayıda organik ve inorganik bileşiğin analizinde kullanılmaktadır [96].

5.2.Ultraviyole (morötesi) / Visible (Görünür Bölge) Moleküler Absorpsiyon Ölçümü

λKalitatif analizler ve kantitatif analizler

λSpektroskopik titrasyonlar

λDenge sabitlerinin tayini



Resim 8. UV spektrometrenin uygulama fotoğrafları

5.3. UV Spektrometre Cihazının Kısımları

Cihazın ilk olarak ilgili dalga boyunda UV-Visible ışın vermesi ve bu ışının numuneden geçtikten sonra ne kadarının soğurulduğunun ölçülmesi gerekir. Aşağıdaki şekil cihazın temel kısımlarını basit olarak göstermektedir [118].

5.3.1. Işın Kaynağı

İlk ışın kaynağı olarak tungsten fitilli lambalar (aydınlatma ampulleri!) kullanıldı. Fakat bu lambaların yerini zamanla tungsten-halojen lambalar aldı.

Bu gibi ışın kaynakları 320 nm' ye kadar olan dalgaboylarında ışın yapabilirler. 400 nm' nin altında ise sürekli spektrum verebilen Döteryum lambası gibi lambalar kullanılır.

5.3.2. Monokromatör

Monokromatör ("tek renk"), bir soğurum ölçümünün yapılabilmesi için dalga boyunun seçilmesinde kullanılır. Gerçekte bir tek dalga boyunu pratik olarak elde etmek mümkün değildir fakat bunun yerine dalga boylarının dar bir aralığı seçilir ki buna bant genişliği adı verilir. İki temel monokromatör tipi vardır. Bunlar prizma ve optik ağlardır. Günümüz modern cihazlarında en çok kullanılan monokromatör türü ise Yatsıtmalı optik ağlardır. Gelen ışın prizmaya girer ve farklı dalga boylarında ışınlar ayrılmış olarak çıkar. Mavi ışık en az yansıtılırken kırmızı ışık en çok yansıtılır (Bundan dolayı gökyüzü mavi görünür. Çünkü kırmızı ışık yansıtılmaz). Prizma veya yatsıtmalı optik ağ yavaşça döndürülürse ışığın değişik dalgaboyları elde edilir ve bu ışık çıkış yarığında çıkarak doğruca numune üzerine gönderilir. Monokromatör döndürüldükçe spektrum elde edilir ve dedektörden geçen ışının şiddeti ölçülür. Yansıtımlı optik ağların prizmalara göre birincil avantajı daha küçük bant genişliğine sahip olmalarıdır. Dezavantajı ise bir kat daha fazla kırınım yapmasıdır (Bragg Kırınımı). Bunun anlamı şudur: Eğer monokromatör mesela 600 nm' ye ayarlanmışsa ikinci dereceden 300 nm' deki ışın da geçecektir. Bu problem filtre kullanımı ile kolayca giderilebilir ve istenmeyen ışınlar kolayca sistemden uzaklaştırılabilir.

5.3.3. Numune

Numuneler her zaman sıvıdır ve bundan dolayı hücre veya küvet olarak bilinen uygun araçlar kullanılır. Soğurum olayının küvetin ışık yolu uzunluğuna bağlı olmasından dolayı numune hücresinin yüksek doğrulukta ve paralel yüzeylere sahip olması gerekir. Bu numune hücresinin boyu genellikle 1 cm' dir. Hücrenin iki karşı yüzeyi de nereden tutulması gerektiğini göstermesi amacıyla mat olarak üretilmiştir. Aksi takdirde şeffaf yüzeylerin ellerden gelen yağ ve kirle kirlenmesi kaçınılmazdır.

Eğer referans kullanılacaksa iki adet küvet kullanılmalıdır. Bunlardan birine referans değerine ise numune konulmalıdır.

5.3.4. Dedektör

Işın enerjisini elektriksel sinyale dönüştüren cihazlara dedektör adı verilir. Dedektörlerin en önemli özelliklerinden birisi üzerine düşen ışın şiddetiyle elektriksel çıkışın doğrudan orantılı olmasıdır. Buna ilaveten iyi bir dedektör üzerine düşen çok az sayıda foton içeren ışın demetini elektriksel sinyale dönüştürebilmelidir. Birçok dedektör dizaynı kullanılmasına rağmen bunlardan en çok kabul gören ve en yaygın olanı fotoçoğaltıcı tüp 'tür. Bunun nedeni ise bu dedektörün çok duyarlı olması ve geniş dalga boyu aralığında kullanıma imkan vermesidir. En büyük dezavantajı ise şiddetli ışına maruz kaldığında hemen bozulmasıdır. Bu tür cihazlar sodyum, potasyum gibi kolay iyonlaşabilen elementlerden imal edilmiş katot ve anottan yapılmıştır. Katota gönderilen ışın elektronları koparır ve bu kopan elektronlar anot tarafından çekilir. 1970'li yıllardan beri ticari olarak kullanılan bir diğer dedektör tipi ise fotodiyot array 'dir. Bu tür yarı-iletkenli dedektörler önceleri çok pahalıydı fakat sonraları fiyatlar düştü ve birçok modern cihazlarda bu dedektörler kullanılmaya başlandı. Bu dedektörler 2cmX25 mikron boyutunda ince bir bant üzerinde binlerce fotodiyodun yanyana gelmesiyle elde edilir. İlk önce herbir diyot yüklenir ve elektronik bağlantılar yardımıyla yüklenme seviyesi izlenir. Bu diyotlar eğer ışığa maruz kalırsa ışın şiddetiyle orantılı olarak yüklerini boşaltırlar.

Bu tür dedektörlerin cihaz altyapıları biraz farklıdır. Çünkü kaynaktan gelen ışın doğruca numuneden (monokromatörden değil) sonra sabit yansıtımlı optik ağa geçer.

Bu tür dedektörlerin en büyük avantajı birden fazla dalga boyunda eş zamanlı olarak aynı anda ölçüm yapabilmesidir.

5.3.5. Veri Kaydetme

Önceleri imal edilen cihazların dedektörleri doğrudan kağıtlı grafiksel kaydedicilere bağlıydı ve bu şekilde veriler alınabiliyordu. Daha sonraları integratörler piyasaya çıktı. Fakat günümüzde çok modern cihazlar artık verileri dijital olarak kaydediyor ve bilgisayarlar yardımıyla işleyebiliyor.

Bilgisayarlar işlenecek verilerin çok olması sonucu oldukça önemli yer tutmaktadır. Özellikle fotodiyot array ile yapılan çok sayıda tarama sonucu elde edilen verilerin işlenmesinde bilgisayarlardan sıkça yararlanılmaktadır [118].

5.4. UV-Vis Spektrometrede Analiz Metodu

Dişbudak yaprağı ve enginar yaprağındaki toplam fenolik içeriğini belirlemek için UV spektrometrede analiz yapıldı. Çalışmada, Perkin Elmer UV-Vis Spektrometre, Lambda 35 markalı cihaz kullanılmıştır.



Resim 9. Analizde kullanılan UV spektrometre

5.4.1. Ekstraksiyon

Bir beher içerisine öğütülmüş dişbudak ağacı yaprakları ve enginar yaprağı 500 mg tartılarak üzerlerine deney koşullarında belirtilen konsantrasyonlarda etanol ilave edilmiştir. Bu işlem dişbudak ağacı yaprağı için 17, enginar yaprağı için 17 deney olmak üzere toplam 34 deneyde tamamlanmıştır. Her biri deney programında belirtilen parametrelere uygun olarak ultrasonik banyoya yerleştirilir. Ultrasonik banyodan çıkarılan numuneler filtre edilip numune kaplarına boşaltılmıştır.

Çizelge 8. UV analizi için ekstraksiyon deney koşulları

Deney No	Ultrason Gücü*(%)	Süre (dk)	Etanol(%)
1	50	45	70
2	25	30	70
3	50	30	50
4	75	15	50
5	25	30	30
6	25	15	50
7	50	15	30
8	75	45	50
9	50	30	50
10	50	30	50
11	75	30	70
12	50	30	50
13	50	45	30
14	75	30	30
15	50	15	70
16	25	45	50
17	50	30	50

* Ultrasonik banyonun toplam gücü 420 wattır.

5.4.2. Numunelerin UV Spektrometre için Hazırlanması

Her bir numune aşağıdaki yol izlenerek hazır hale getirilmiştir;

- 5 µl Ekstrakt
- 1000 µl Hacimce % 5 Etanol
- 2000 µl Folin Ciocalteu Reagent
- 20 ml % 15 Na₂CO₃
- 10 ml Ultra pürsu

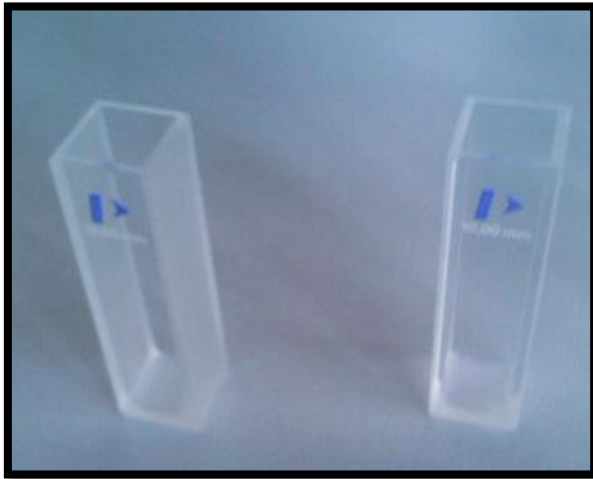
Karıştırılarak numune kabına konulup 2 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ölçüm için kör, standart ve numune olmak üzere 3 tüp hazırlanır.

Kör: Küvet, solvent ve aranan madde hariç reaktif ve numunede ki diğer maddelerden kaynaklanan non-spesifik absorpsiyonların tespit edilerek analiz ölçümüne etkilerini sıfırlamaktır. İçinde aradığımız madde dışındaki maddelerin bulunabileceği cihazın sıfır ayarının yapılmasında kullanılan çözeltilerdir.

Numune: İçindeki madde miktarını tayin etmek istediğimiz çözeltilerdir.

Standart: Aranan maddenin bilinen konsantrasyondaki çözeltilerdir.

Hazırlanan her bir numune kabından örnekler alınarak UV spektrometre numune kaplarına konulmuştur. Kör ile sıfırlama yaptıktan sonra UV spektrometrede 765 nm de absorbansı okunmuştur.



Resim 10. UV spektrometreye yerleştirilen küvetler

5.5. Toplam Fenolik Sonuçları

Çizelge 9. Dişbudak yaprağında toplam fenolik içerik sonuçları

Deney no	UltrasonGücü*(%)	Süre (dk)	Etanol(%)	Absorbans
1	50	30	50	0,1190
2	25	30	30	0.0560
3	75	45	50	0,0850
4	25	15	50	0,0710
5	75	30	30	0,0580
6	75	30	70	0.0500
7	50	15	70	0.0500
8	50	30	50	0.1195
9	50	30	50	0,1177
10	25	30	70	0.0500
11	75	15	50	0.0620
12	50	45	70	0.0500
13	50	30	50	0,1184
14	25	45	50	0,0740
15	50	45	30	0.0640
16	50	30	30	0.0600
17	50	30	50	0,1189

* Ultrasonik banyonun toplam gücü 420 wattır.

Çizelge 10. Enginar yaprağında toplam fenolik içerik sonuçları

Deney no	UltrasonGücü*(%)	Süre(dk)	Etanol(%)	Absorbans
1	50	30	50	0,1466
2	25	30	30	0.0710
3	75	45	50	0,1073
4	25	15	50	0,0900
5	75	30	30	0,0730
6	75	30	70	0.0630
7	50	15	70	0.0620
8	50	30	50	0.1550
9	50	30	50	0,1434
10	25	30	70	0.0625
11	75	15	50	0.0780
12	50	45	70	0.0630
13	50	30	50	0,1534
14	25	45	50	0,0930
15	50	45	30	0.0810
16	50	30	30	0.0760
17	50	30	50	0,1507

* Ultrasonik banyonun toplam gücü 420 wattır.

6. SONUÇLAR

6.1. Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon Performansı Üzerine Proses Değişkenlerinin Etkisi

Design Expert 8.0.7.1 ile tasarlanmış Box-Behnken tasarım çalışmalarının deneysel koşulları aşağıdaki tabloda sunulmuştur. Tablo ayrıca ultrasonik destekli ekstraksiyondan elde edilen ekstraksiyon verimliliği üzerine sıcaklık, zaman ve ultrason gücünün etkilerini göstermektedir.

Çizelge 11. Dişbudak yaprağı ekstraksiyon verimi için deneysel sonuçlar

Sonuçlar				
Deney No	Ultrason Gücü* (%)	Süre(dk)	Sıcaklık(⁰ C)	Klorojenik Asit Verim (ppm)
1	50	45	70	11.49
2	25	30	70	11.16
3	50	30	50	8.13
4	75	15	50	8.04
5	25	30	30	6.75
6	25	15	50	6.72
7	50	15	30	6.85
8	75	45	50	7.95
9	50	30	50	7.09
10	50	30	50	8.15
11	75	30	70	10.35
12	50	30	50	7.47
13	50	45	30	9.30
14	75	30	30	6.66
15	50	15	70	11.70
16	25	45	50	8.24
17	50	30	50	8.12

* Ultrasonik banyonun toplam gücü 420 wattır.

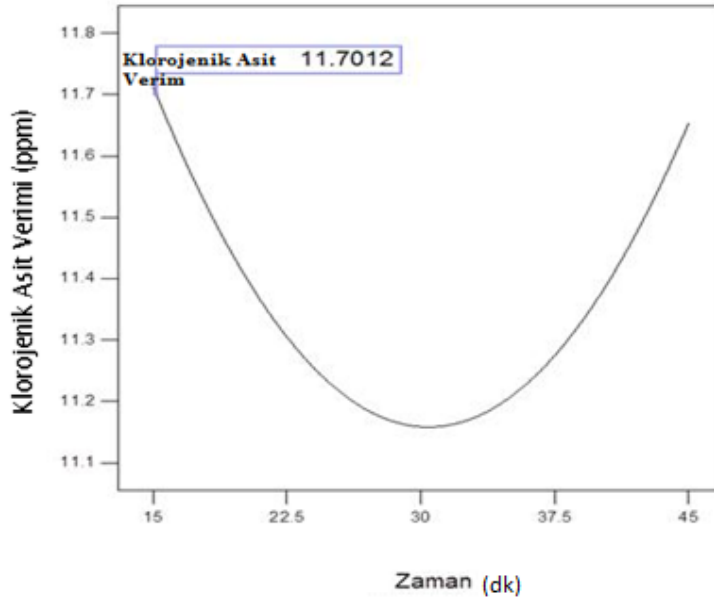
Çizelge 12. Enginar yaprağı ekstraksiyon verimi için deneysel sonuçlar

Sonuçlar				
Deney No	Ultrason Gücü* (%)	Süre(dk)	Sıcaklık(⁰C)	Klorojenik Asit Verim (ppm)
1	50	45	70	8.66
2	25	30	70	6.53
3	50	30	50	9.83
4	75	15	50	5.4
5	25	30	30	2.45
6	25	15	50	3.73
7	50	15	30	2.3
8	75	45	50	6.56
9	50	30	50	8.92
10	50	30	50	9.27
11	75	30	70	4.35
12	50	30	50	9.97
13	50	45	30	4.26
14	75	30	30	3.24
15	50	15	70	4.98
16	25	45	50	7.6
17	50	30	50	9.71

* Ultrasonik banyonun toplam gücü 420 wattır.

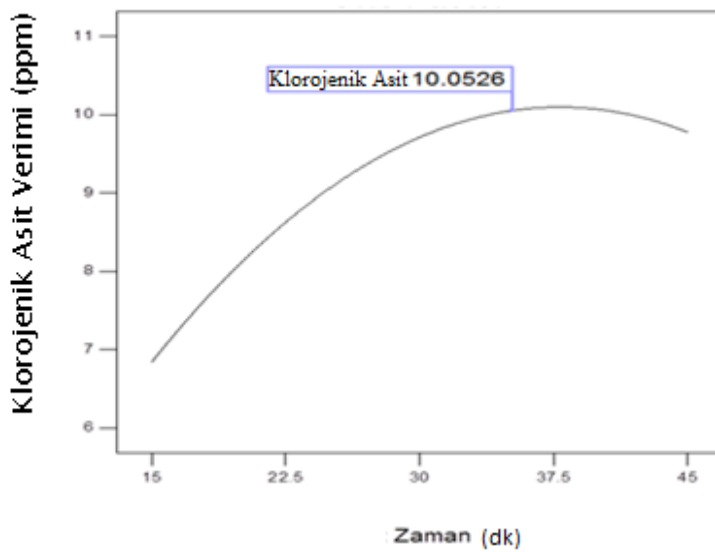
6.2. Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon Performansı Üzerine Ekstraksiyon Zamanının Etkisi

Dişbudak ağacı yaprağından klorojenik asit ekstraksiyon verimi üzerine ultrason zamanının etkisi 15-45 dakika aralığında test edildi. Sonuçlar Çizelge 11' de verilmiştir. Sonuçlar gösteriyor ki 15-30 dk arası solvante geçen klorojenik asit miktarı azalırken, 30. dakikadan sonra klorojenik asit miktarı giderek artmıştır. Klorojenik asitin solvante salınması ve hücre duvarlarının zarar görmesi için 15 dakika ultrason süresi yeterli olmaktadır.



Şekil 22. Dişbudak ağacı yaprağında klorojenik asit veriminin ekstraksiyon zamanıyla değişimi

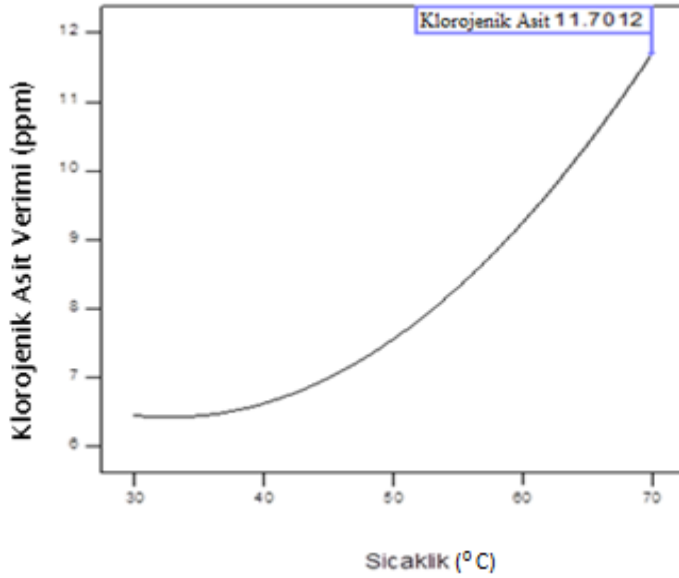
Enginar yaprağından klorojenik asit ekstraksiyon verimi üzerine ultrason zamanının etkisi 15-45 dakika aralığında test edildi. Ve sonuçlar Çizelge 12’de verilmiştir. Sonuçlar gösteriyor ki, solvente geçen klorojenik asit miktarı zaman geçtikçe artmıştır. Klorojenik asitin solvente salınması ve hücre duvarlarının zarar görmesi için 15 dakika ultrason süresi yeterli olmaktadır.



Şekil 23. Enginar yaprağında klorojenik asit veriminin ekstraksiyon zamanıyla değişimi

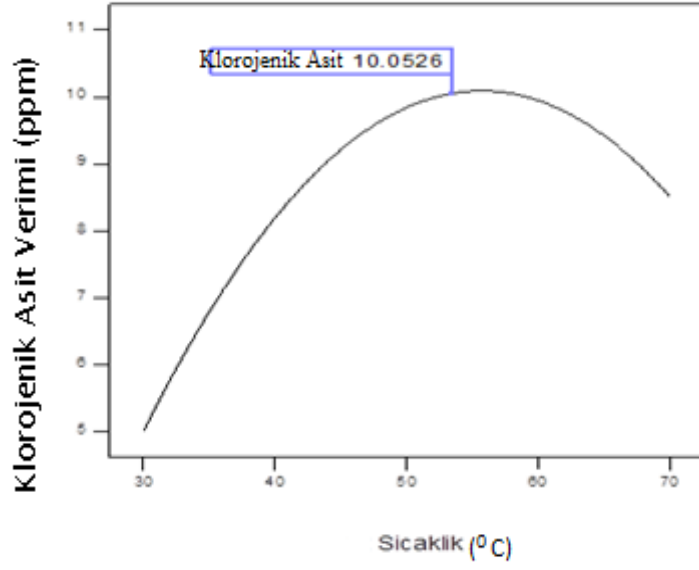
6.3. Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon Performansı Üzerine Ekstraksiyon Sıcaklığının Etkisi

Daha yüksek sıcaklıklarda çalışmak pratik ve ekonomik olmadığı için dişbudağı ağacı yapraklarının ekstraksiyonu 30-70 °C aralığında değişen sıcaklıklarda yapıldı. Beklenildiği gibi klorojenik asitin ekstraksiyon verimi sıcaklığın bir fonksiyonu olarak kararlı bir şekilde arttı. Kütle transferi sıcaklıkla artar tezini doğruladı. Genelde yüksek sıcaklıktaki ekstraksiyonlar kütle transferini ve ekstraksiyon performansını artırır.



Şekil 24. Dişbudak ağacı yaprağından klorojenik asit ekstraksiyon veriminin sıcaklıkla değişimi

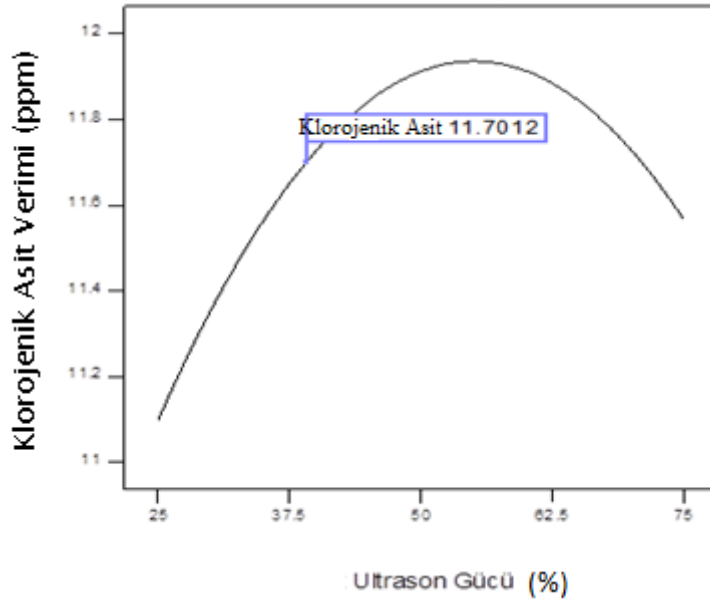
Yine daha yüksek sıcaklıklarda çalışmak pratik ve ekonomik olmadığı için enginar yapraklarının ekstraksiyonu 30-70 °C aralığında değişen sıcaklıklarda yapıldı. Beklenildiği gibi klorojenik asitin ekstraksiyon verimi sıcaklığın bir fonksiyonu olarak kararlı bir şekilde arttı. Fakat 52-55 °C aralığından sonra azalmaya başlamıştır.



Şekil 25. Enginar yaprağından klorojenik asit ekstraksiyon veriminin sıcaklıkla değişimi

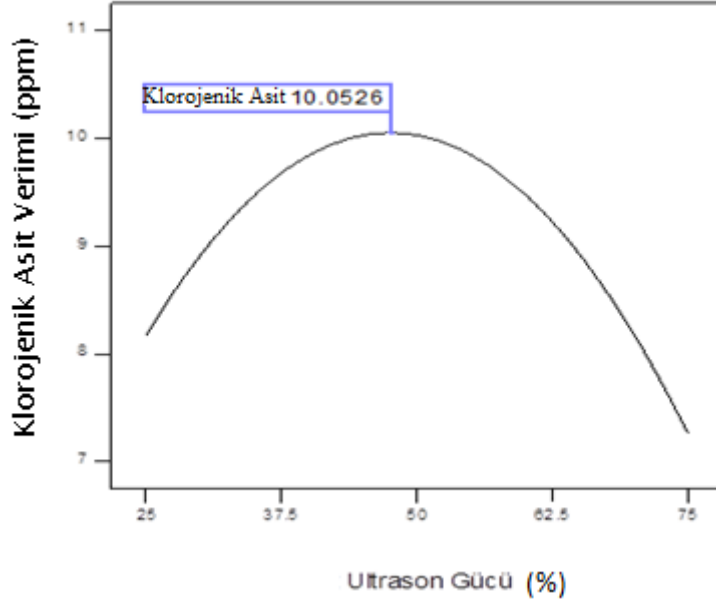
6.4. Ultrason Destekli Ekstraksiyon Performansı Üzerine Ultrason Gücünün Etkisi

Ultrason gücünün artmasıyla dişbudak yaprağından solvante geçen klorojenik asit miktarı belli bir noktaya kadar artmıştır.

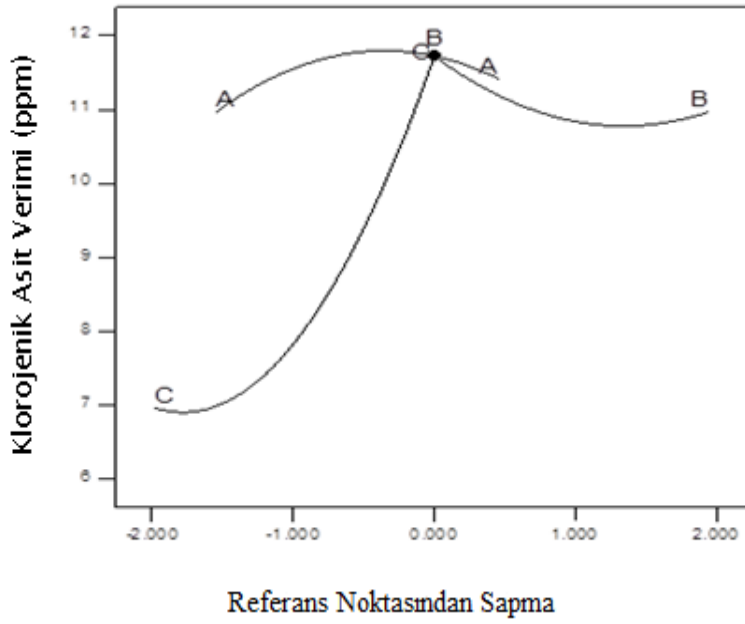


Şekil 26. Dişbudak ağacı yapraklarından klorojenik asit ekstraksiyon veriminin ultrason gücüyle değişimi

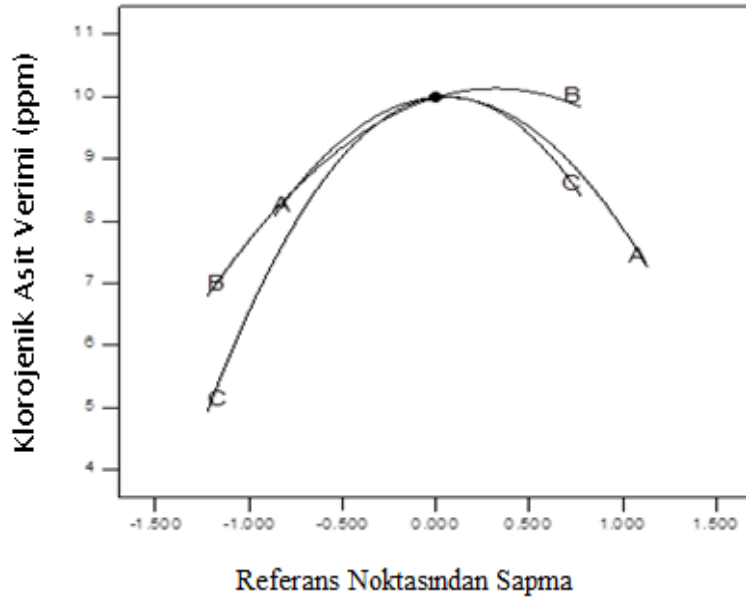
Enginar yaprağında ise dişbudak yaprağına nazaran, ultrason g¼c¼n¼n artmasıyla klorojenik asit verimi daha erken azalmaya başlamıştır.



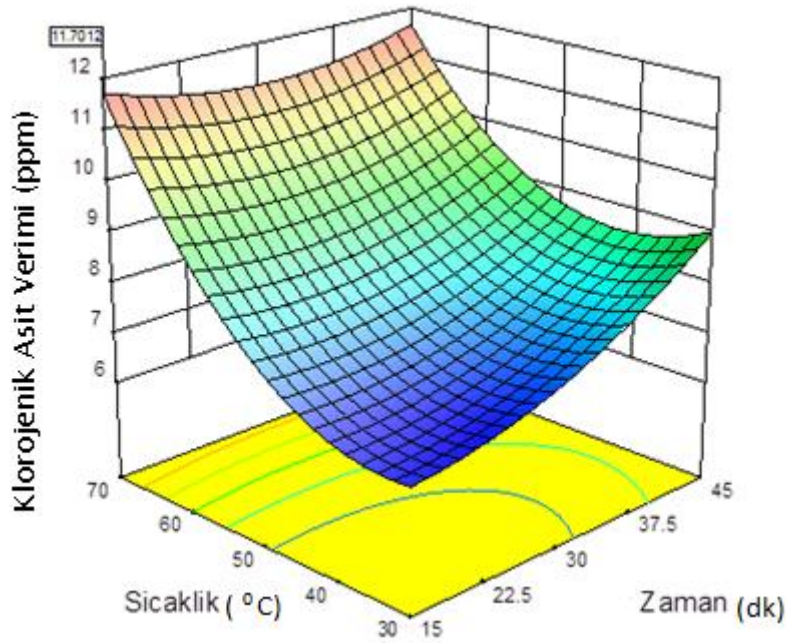
şekil 27. Enginar yaprağından klorojenik asit ekstraksiyon veriminin ultrason g¼c¼yle değişimi



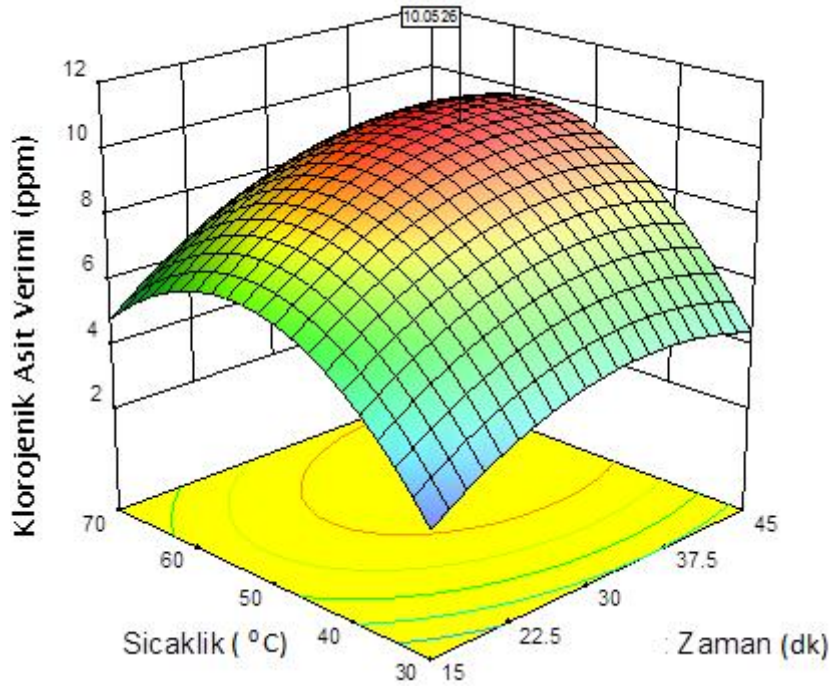
şekil 28. Dişbudak ağacın yaprağından klorojenik asit ekstraksiyon veriminin t¼m değişkenler ile değişimi grafiği (A: Ultrason g¼c¼B: Zaman, C: Sıcaklık)



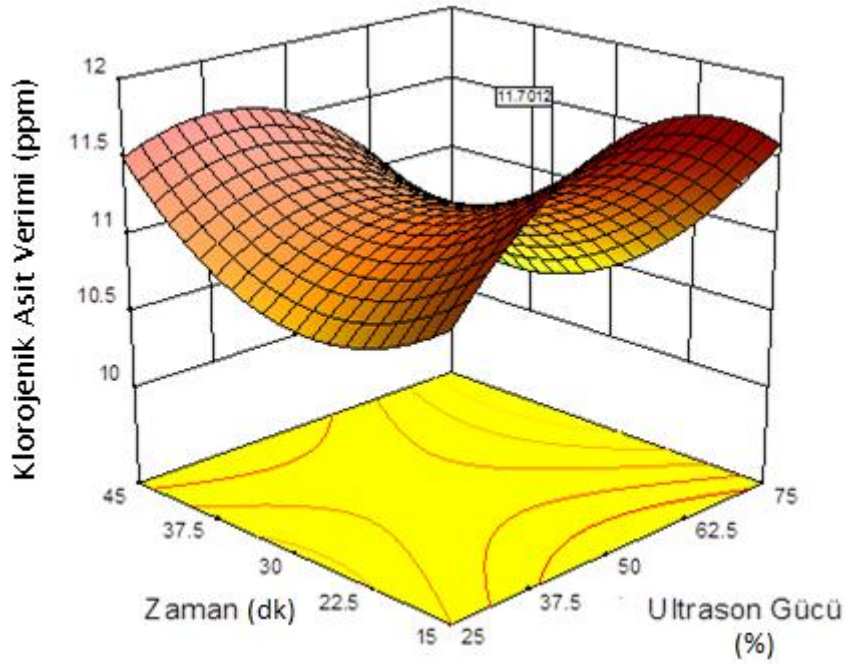
Şekil 29. Enginar yaprağından klorojenik asit ekstraksiyon veriminin tüm değişkenler ile değişimi grafiği (A: Ultrason gücü, B: Zaman, C: Sıcaklık)



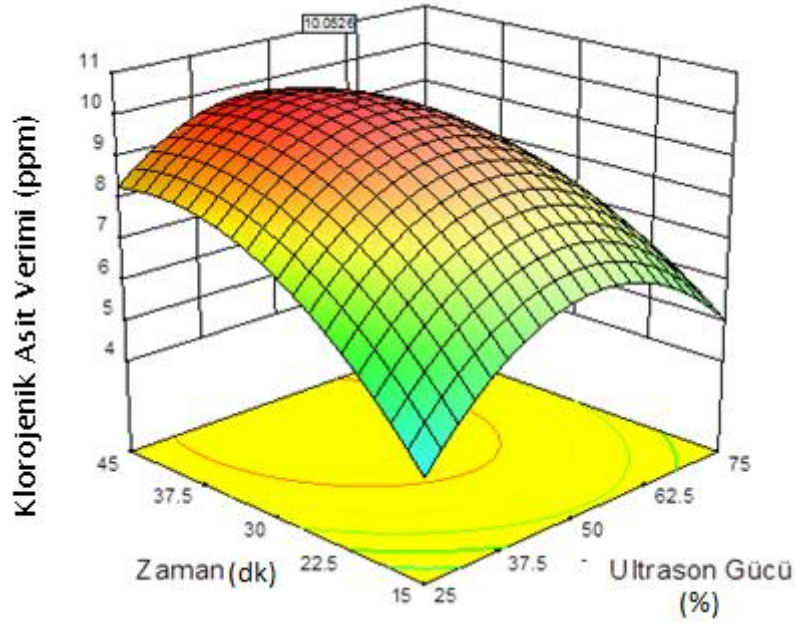
Şekil 30. Ekstraksiyon sıcaklığına zaman oranının bir fonksiyonu olarak dişbudak ağacı yapraklarından klorojenik asit verimi için yüzey yanıt grafiği



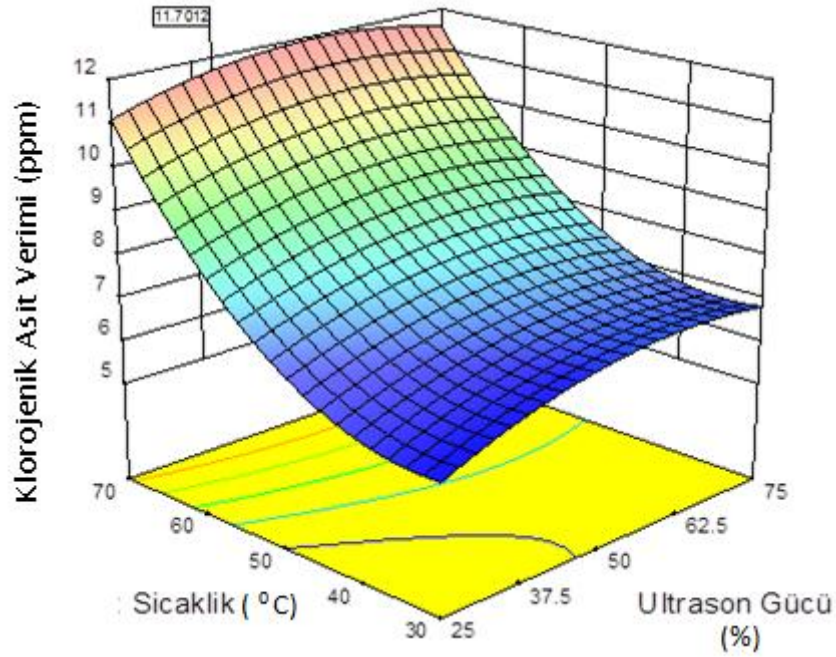
Şekil 31. Ekstraksiyon sıcaklığına zaman oranının bir fonksiyonu olarak enginar yapraklarından klorojenik asit verimi için yüzey yanıt grafiği



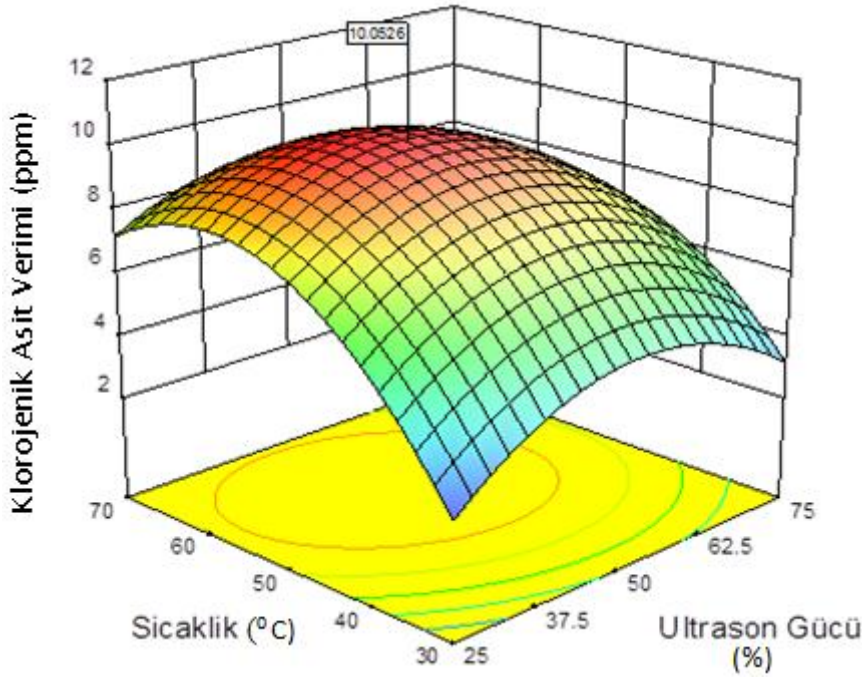
Şekil 32. Ekstraksiyon zamanına ultrason gücü oranının bir fonksiyonu olarak dişbudak ağacı yapraklarından klorojenik asit verimi için yüzey yanıt grafiği



Şekil 33. Ekstraksiyon zamanına ultrason gücü oranının bir fonksiyonu olarak enginar yapraklarından klorojenik asit verimi için yüzey yanıt grafiği



Şekil 34. Ekstraksiyon sıcaklığına ultrason gücü oranının bir fonksiyonu olarak dişbudak ağacı yapraklarından klorojenik asit verimi için yüzey yanıt grafiği



Şekil 35. Ekstraksiyon sıcaklığına ultrason gücü oranının bir fonksiyonu olarak enginar yapraklarından klorojenik asit verimi için yüzey yanıt grafiği

6.5. Yüzey Yanıt Metoduyla Ultrasonik Destekli Ekstraksiyonun Optimizasyonu

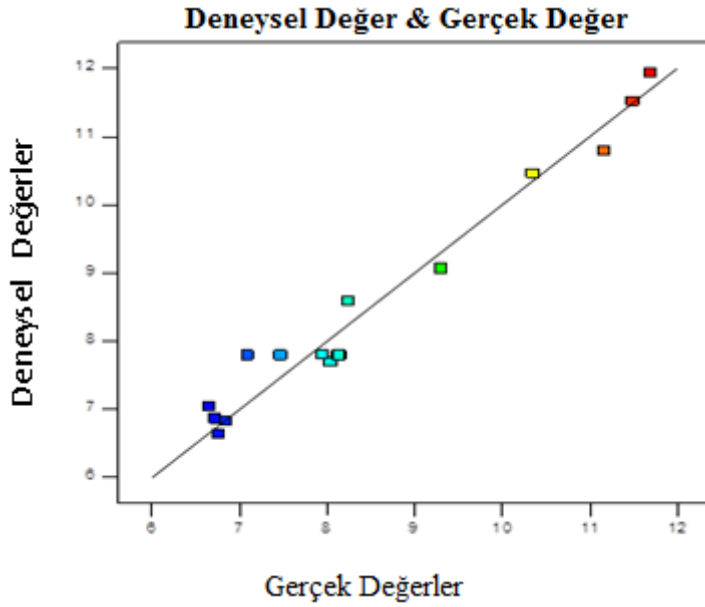
Aynı anda tek faktör yaklaşımı olarak bilinen proses değişkenlerinin bireysel etkileri önceki bölümde uygulandı. Bu klasik yaklaşım proses değişkenlerinin birbiriyle olan muhtemel etkileşimlerini göz ardı eder. Yüzey yanıt metodolojisi işletme parametreleri arasındaki muhtemel etkileşimleri göz önünde bulundurur. Çizelge minimum, orta, maksimum noktaları içeren üç parametreyi (Ultrason gücü, zaman ve sıcaklık) göstermektedir. 17 deney çalışıldı, dizayn expert software tarafından rastgele seçildi ve yanıtlar kaydedildi.

Software nedeniyle yüzey yanıt metodolojisi kullanan, ekstraksiyon verimleri için sadece adım adım ileri değil aynı zamanda geri yok etme regresyonlarını uygulayan kuadratik bir model elde edildi. Softwareden yüzey yanıt metodu kullanan kuadratik bir model aşağıda verildiği gibi türetildi.

$$\text{Dişbudak ağacı için klorojenik asit} = +8.05369 + 0.093410 \times A + 1.35 \times 10^{-3} \times B - 0.21831 \times C - 2.21 \times 10^{-3} \times B \times C - 9.27 \times 10^{-4} \times A^2 + 2.33 \times 10^{-3} \times B^2 + 3.79 \times 10^{-3} \times C^2$$

$$\text{Enginar yaprağı için klorojenik asit} = -35.19562 + 0.49465 \times A + 0.48225 \times B + 0.87919 \times C - 1.806 \times 10^3 \times A \times B - 1.48 \times 10^3 \times A \times C + 1.43 \times 10^3 \times B \times C - 3.70 \times 10^3 \times A^2 - 6.24 \times 10^3 \times B^2 - 7.71 \times 10^3 \times C^2$$

A: Ultrason Gücü, B :Zaman, C: Sıcaklık



Şekil 36. Dişbudak yaprağı için denklemden elde edilen değerler ile deneysel verilerin karşılaştırılması

Optimum ekstraksiyon koşulları dizayn expert software optimizasyonu kullanarak bulundu. Bu değerler Dişbudak ağacı yaprakları (*Fraxinus Excelsior*) için ultrason gücünün % 39.12, ekstraksiyon süresinin 15.18 dakika, ekstraksiyon sıcaklığının 69.98 °C olduğu optimum koşullar belirlendi. Bu koşullarda maksimum klorojenik asit verimi 11.70 ppm olarak belirlendi.

Optimal koşullar bulunduktan sonra gerçek numune ekstraksiyonu deneyleri 3 kez tekrarlandı ve sonra relatif standart sapmalı ortalama hesaplandı.

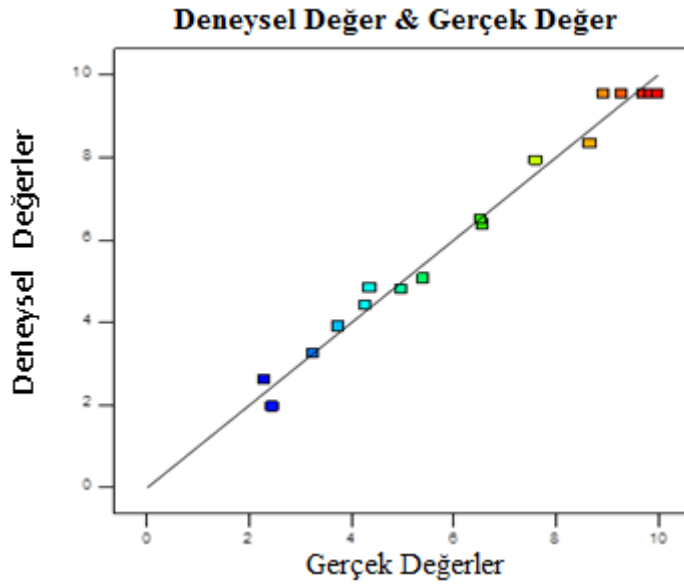
Ortalama: 10,2553

Standart Sapma: 0,015

Relatif Standart Sapma: 0,425

Klorojenik Asit Verim (mg/500 mg numune): 10,2553±0,015

İstatistiksel değerlendirme için sonuçlar uygundur.



Şekil 37. Enginar yaprağı için denklemden elde edilen değerler ile deneysel verilerin karşılaştırılması

Optimum ekstraksiyon koşulları dizayn expert software optimizasyonu kullanarak bulundu. Bu değerler Enginar (Cynara Scolymus) yaprakları için ise ultrason gücünün % 47.65, ekstraksiyon süresinin 35.18 dakika, ekstraksiyon sıcaklığının 53.40 °C olduğu optimum koşullar belirlendi. Bu koşullarda maksimum klorojenik asit verimi 10.05 ppm olarak belirlendi. Optimal koşullar bulunduktan sonra gerçek numune ekstraksiyonu deneyleri 3 kez tekrarlandı ve sonra relatif standart sapmalı ortalama hesaplandı.

Ortalama: 9,8553

Standart Sapma: 0,015

Relatif Standart Sapma: 0,435

Klorojenik Asit Verim (mg/500 mg numune): 9,8553±0,015

İstatistiksel değerlendirme için sonuçlar uygundur.

6.6.Model Uygunluğu

Ekstraksiyon verimlerinin yanıtları için dizayn expert 8.0.7.1 in quadratik denklemleri için varyans (ANOVA) analizleri. Değişkenlerin en uygununu elde etmek için stepwise (adım adım) regresyonu kullanıldı. Bu prosese göre adı geçen değişkenler test edildi. İleri ve geri teknikler kullanan verilen alfa düzeyleri içerisinde (0,1) değerlendirildi.

Geri teknikler parametreleri tahmin etmek için tüm değişkenleri içermektedir. Ve sonra alfa düzeyde uygun olmayan parametrelere her bir değişken denklemden atıldı bu proses önemli değişken kalmayınca kadar devam etti. Geri tekniklere benzer şekilde ileri teknikler de verilen alfa düzeyleri içerisinde verilen değişkenleri değerlendirmekte kullanıldı. Geri tekniklerden farklı olarak ileri teknikler, denklemden bulunmayan hiçbir değişken ile başlamaz. Standardize betanın en yüksek değerlerine sahip önemli değişkenler denkleme katılacaktır.

Çalışmamızda, türetilen model ekstraksiyon verimleri için R-Squared (0.9650); Adj R-Squared (0.9200) ve Pred R-Squared (0.7325) değerleri elde edilmiştir. Ve bu değerler türetilen modelin hassasiyetini göstermektedir. Sonuçta, ultrasonik destekli ekstraksiyon ile dişbudak ağacı yapraklarından ekstraksiyon veriminin belirlenmesi yüzey yanıt modellemesi ile başarılabilir. Ayrıca varyasyon katsayısı değeri (C.V. %) 5.70 olarak bulunmuştur. Bu düşük varyasyon değeri deneysel sonuçların güvenilirliği ve yüksek hassasiyetini gösterilmektedir.

Çizelge 13. Dişbudak yaprağı ANOVA tablosu

Kaynak	Kareler Toplamı	df	Kareler Ortalaması	F Değeri	P Değeri POlasılık > F
Model	45.05	9	5.01	21.44	0.0003
A-Ultrason Gc	2.112E-003	1	2.112E-003	9.047E-003	0.9269
B-Zaman	1.68	1	1.68	7.21	0.0313
C-Sicaklik	28.65	1	28.65	122.70	< 0.0001
AB	0.65	1	0.65	2.78	0.1397
AC	0.13	1	0.13	0.56	0.4805
BC	1.77	1	1.77	7.58	0.0284
A ²	1.42	1	1.42	6.06	0.0433
B ²	1.16	1	1.16	4.97	0.0609
C ²	9.70	1	9.70	41.54	0.0004
Artık Değer	1.63	7	0.23	-	-
Uyum eksikliği	0.69	3	0.23	0.97	0.4897
Hata	0.95	4	0.24	-	-
Düz Toplam	46.69	16		-	-

*Düz. Toplam: Düzeltmiş ortalamaların toplamı

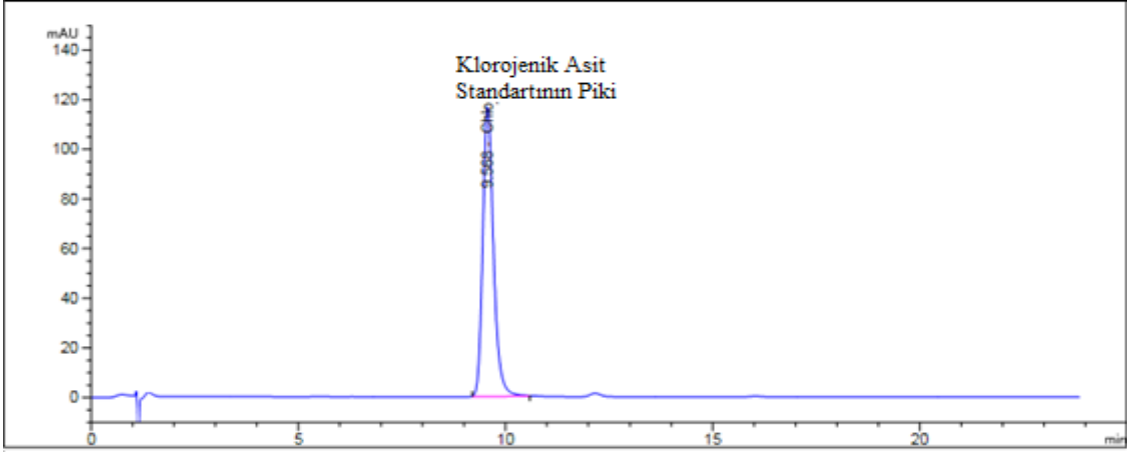
*df: Serbestlik derecesi

Çalışmamızda, türetilen model ekstraksiyon verimleri için R-Squared(kare) (0.9851); Adj R-Squared (0.9659) ve Pred R-Squared (0.8539) değerleri elde edilmiştir. Ve bu değerler türetilen modelin hassasiyetini göstermektedir. Sonuçta, ultrasonik destekli ekstraksiyon ile enginar yapraklarından ekstraksiyon veriminin belirlenmesi yüzey yanıt modellemesi ile başarılabilir. Ayrıca varyasyon katsayısı değeri (C.V. %) 7.91 olarak bulunmuştur. Bu düşük varyasyon değeri deneysel sonuçların güvenilirliği ve yüksek hassasiyetini gösterilmektedir.

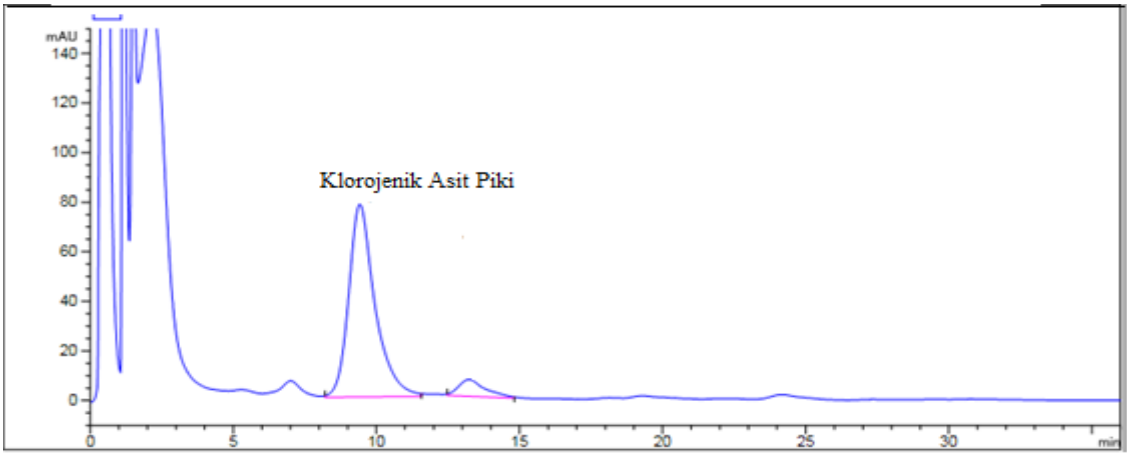
Çizelge 14. Enginar yaprağı ANOVA tablosu

Kaynak	Kareler Toplamı	df	Kareler Ortalaması	F Değeri	P Değeri POlasılık > F
Model	116.15	9	12.91	51.38	< 0.0001
A-Ultrason Gc	0.072	1	0.072	0.29	0.6085
B-Zaman	14.23	1	14.23	56.66	0.0001
C-Sicaklik	18.82	1	18.82	74.92	< 0.0001
AB	1.84	1	1.84	7.31	0.0305
AC	2.21	1	2.21	8.78	0.0210
BC	0.74	1	0.74	2.94	0.1299
A ²	22.52	1	22.52	89.64	< 0.0001
B ²	8.31	1	8.31	33.09	0.0007
C ²	40.07	1	40.07	159.54	< 0.0001
Artık Değer	1.76	7	0.25	-	-
Uyum eksikliği	1.00	3	0.33	1.77	0.2915
Hata	0.76	4	0.19	-	-
Düz Toplam	117.91	16	-	-	-

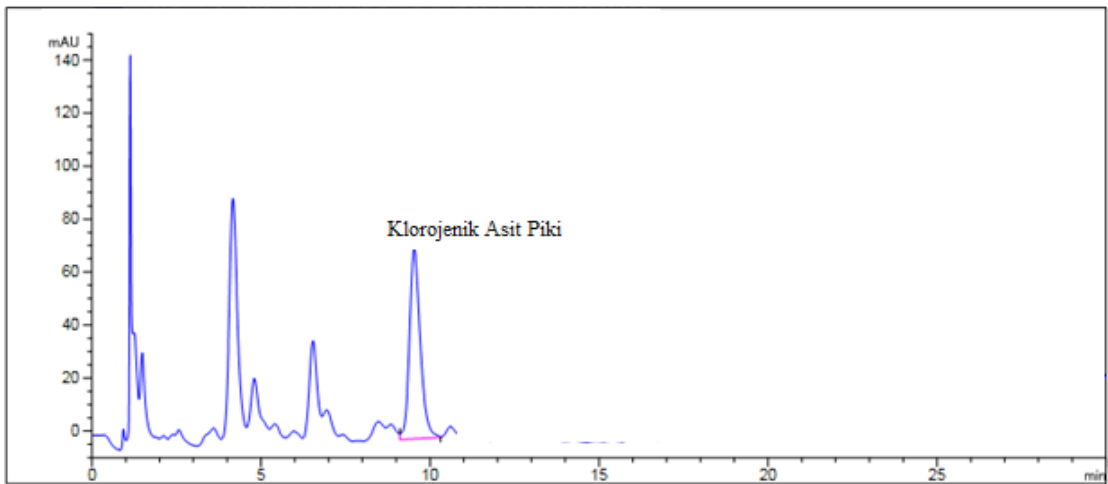
Sonuç olarak yüzey yanıt modellemesi ultrasonik destekli ekstraksiyon dışbudak ağacı yapraklarından ve enginar yapraklarından klorojenik asitin ekstraksiyon veriminin belirlenmesinde başarılı bir şekilde uygulanabilir. Varyasyon katsayısının düşük değeri yüksek hassasiyeti ve deney sonuçlarının güvenilirliğini göstermektedir. Çalışmamızda dışbudak ağacı yapraklarından klorojenik asit ekstraksiyonu için varyasyon katsayısı değeri (% C.V) 5.70, enginar yaprağı için ise varyasyon katsayısı değeri (% C.V) 7.91 bulunmuştur. Şekillerde ultrasonik destekli ekstraksiyon ile elde edilen ekstraktların ekstraksiyon verimi ile ilgili eşitliklerden hesaplanan data ve deneysel data arasındaki ilişkiyi gösteriyor. İşletme koşullarında deneysel data ile modelden hesaplanan datanın uyum içinde olduğu görülmektedir.



Şekil 38. Klorojenik asit standardının kromatogramı



Şekil 39. Dişbudak ağacı yaprağı ekstraktının kromatogramı



Şekil 40. Enginar yaprağı ekstraktının kromatogramı

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmanın ilk aşamasında dişbudak ağacı yaprağı ve enginar yaprağından klorojenik asitin HPLC (Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografi) ile belirlenmesi için metod optimizasyonu yapıldı. Klorojenik asitin potansiyel kaynakları dişbudak ağacı yaprakları ve enginar yaprakları bu çalışmada araştırma materyali olarak kullanıldı. Kurutulmuş yapraklar ultrasonik destekli ekstraksiyon yöntemi ile ekstrakte edildi. Ultrasonik destekli ekstraksiyon yöntemi çevre dostudur, geleneksel ekstraksiyon metotlarına göre daha az solvent kullanılması ve kısa sürede yapıldığı için avantajlıdır. Dişbudak ağacı yaprakları (*Fraxinus Excelsior*) için optimum koşullar; ultrason gücü % 39.12, ekstraksiyon süresi 15.18 dakika, ekstraksiyon sıcaklığı 69.98 °C olarak belirlendi. Bu koşullarda maksimum klorojenik asit verimi 11.70 ppm olarak belirlendi. Enginar (*Cynara Scolymus*) yaprakları için ise optimum koşullar; ultrason gücü % 47.65, ekstraksiyon süresi 35.18 dakika, ekstraksiyon sıcaklığı 53.40 °C olarak belirlendi. Bu koşullarda maksimum klorojenik asit verimi 10.05 ppm olarak belirlendi. Optimal koşullar bulunduktan sonra gerçek numune ekstraksiyon deneyleri 3 kez tekrarlandı ve sonra relatif standart sapmalı ortalama hesaplandı. Dişbudak ağacı yaprağında klorojenik asit ekstraksiyon verimi 10,2553±0,015 ppm bulunmuştur. Enginar yaprağı için ise 9,8553±0,015 ppm klorojenik asit verimi elde edildi.

Elde ettiğimiz sonuçlara göre dişbudak ağacı yaprağından klorojenik asitin ekstraksiyon sıcaklığı enginar yaprağından klorojenik asit ekstraksiyonun gerçekleştiği sıcaklıktan daha yüksektir. Dişbudak ağacı yaprağında hücre duvarının yıkılıp klorojenik asitin solvante geçmesi için enginar yaprağındaki ekstraksiyona göre daha yüksek sıcaklık gereklidir. Dişbudak ağacı yaprağı hücre duvarı, enginar yaprağının hücre duvarına göre daha sert olabileceğini düşündüğümüzden dolayı bulduğumuz sonuçlar da bu düşüncüyü desteklemektedir. Dişbudak ağacından klorojenik asit ekstraksiyon verimi sıcaklıkla artarken enginar yaprağından klorojenik asit ekstraksiyon verimi belli sıcaklığa kadar arttıktan sonra azalmaya başlamıştır. Bu da yüksek sıcaklıklarda enginardaki klorojenik asitin bozunmuş olmasından kaynaklanabilir. Ultrason gücüyle ise ekstraksiyon verimi her iki materyelde de belli bir noktaya kadar artmıştır daha sonra ise azalmaya başlamıştır. Buna göre çok fazla ekstraksiyon gücünün klorojenik asiti bozunmaya uğrattığı söylenebilir.

Sonuç olarak HPLC ile yapılan analizde dişbudak ağacı yaprağında klorojenik asit miktarının enginar yaprağındaki klorojenik asit miktarına göre daha fazla olduğu tespit edildi.

Çalışmanın ikinci aşamasında ise dişbudak ağacı yapraklarında ve enginar yapraklarının antioksidan kapasitelerini belirlemek için toplam fenolik içerikleri UV Spektrometre ile analiz edildi. Dişbudak yaprağı için optimum koşullar; ultrason gücü % 47.76, süre 29.69 dakika, etanol konsantrasyonu % 54.40 olarak belirlendi. Optimum koşullarda dişbudak yaprağında toplam fenolik içeriği 40.74 ppm olarak belirlendi. Enginar yaprağı için optimum koşullar; ultrason gücü % 47.29, süre 29.67 dakika, etanol konsantrasyonu % 55.33 olarak belirlendi. Optimum koşullarda enginar yaprağında toplam fenolik içeriği 70.24 ppm olarak belirlendi.

UV Spektrometre ile yapılan analiz sonuçlarına göre enginar yaprağındaki toplam fenolik içeriği, dişbudak ağacı yaprağındaki toplam fenolik içeriğinden daha fazla olduğu tespit edildi. Dolayısıyla enginar yaprağının antioksidan kapasitesi dişbudak ağacı yaprağının antioksidan kapasitesine göre daha fazladır. Antioksidan kapasitelerinin bu bitkilerin yetiştiği bölgenin fiziki ve coğrafi özelliklerine göre değiştiği söylenebilir.

Çalışmanın iki aşamasında da kullanılan ultrasonik destekli ekstraksiyonun diğer ekstraksiyon tekniklerine alternatif yöntem olabileceği görülmüştür. Ekstraksiyon tekniklerinden Soxhlet ekstraksiyonu, daha uzun süre gerektirmesi ve büyük miktarda organik solvent kullanılmasından dolayı ultrasonik destekli ekstraksiyona göre dezavantajlıdır. Ayrıca Soxhlet ekstraksiyonun solvent seçiciliği ve otomasyonu zor olması gibi dezavantajları da bu yönteme alternatif bir yönteme ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir. Basınçlı sıvı ekstraksiyonunda ise örneğe ekstraksiyon işlemi yapılmadan önce dondurma ve kurutma gibi ön işlemler gerektirebilir. Ayrıca çok fazla organik solvent kullanılması ve temizliğinin maliyetli olması da bu ekstraksiyon tekniğinin dezavantajlarıdandır. Mikrodalga destekli ekstraksiyon yönteminde ise fazla miktarda organik solvent kullanılması bu yöntemi dezavantajlı bir yöntem yapmaktadır. Süperkritik akışkanlarla ayırma işlemlerinin yüksek basınçta gerçekleşmesinden dolayı yüksek yatırım maliyeti ve yüksek enerji gereksinimi gibi birkaç dezavantajı vardır. Son derece önemli olduğu halde ihmal edilen diğer bir dezavantajı ise, en çok kullanılan CO₂ tir.

Saf CO₂ tüplerinin içeriğinde bile varolan %1-2'lik oksijenin, antioksidanlar gibi oksijene hassas bileşikler ile tepkimeye girip az miktarda da olsa bozunmalarına neden olmasıdır. Geleneksel solvent ekstraksiyonunun ise iki dezavantajı vardır. Bunlardan birincisi ekstraksiyon sonrası yoğunlaştırma işlemi sırasında molekül ağırlığı düşük uçucu bileşiklerin kaybı ve artifakların oluşumu ikincisi ise ekstraksiyon sonrası geri kalan çözücüdür. Bu problem hem ekonomik açıdan hem de çevre kirliliği (toksik özellikleri) bakımından nemlidir. Saf ve kaliteli çözücüler pahalı ve büyük miktarlarda kullanıldığında maddi bir yük getirmektedir. Tüm bu tekniklere alternatif teknik olarak belirlediğimiz ultrasonik destekli ekstraksiyon diğer tekniklerle karşılaştırıldığında ucuz, basit ve etkili olduğu görülmüştür. Ultrasonun katı-sıvı ekstraksiyonunda kullanılmasının başlıca yararları hızlı kinetik ve verim artışıdır. Ayrıca ultrason, düşük sıcaklıklarda da etkin olarak uygulanabildiğinden sıcaklığa duyarlı maddelerin ekstrakte edilmesini mümkün kılar. Buna göre elde edilen bu sonuçlar klorojenik asit etken bileşeninin ekstraksiyonu için Ultrasonik Destekli Ekstraksiyonun (UAE) etkili bir metod olabileceğini göstermiştir.

8. KAYNAKLAR

1. Wikipedi, http://en.wikipedia.org/wiki/Chlorogenic_acid.
2. Fraxigen, , Ash species in Europe: biological characteristics and practical guidelines for sustainable use. Oxford Forestry Institute, University of Oxford, UK. 128 p, 2005.
3. Forestry Commission, <http://www.forestry.gov.uk/>.
4. Agroforestry Database 4.0 (Orwa et al.2009).
5. Ağaclar.org- ash low-forest servis, <http://www.agaclar.net/dergi/>.
6. Cynara Scolymus L.'nin Fitoterapideki Önemi, Mehmet Çalık, Ankara Üniversitesi, Sağlık bilimleri Enstitüsü, Farmakognozi Ana bilim dalı.
7. Prof.Dr. Benian Eser, Doç. Dr. Hülya İldi, Dr. Atnan Uğur, Enginar yetiştiriciliği ve enginarın sağlık açısından önemi, Hasad Dergisi. 2006.
8. MEB, Bahçecilik, Enginar Yetiştiriciliği, Ankara, 2010.
9. Yuru Chen, Extraction and HPLC Characterisation of Chlorogenic Acid from Tobacco Residuals, 2007,.
10. Abebe Ayelign and Kebba Sabally, , Determination of Chlorogenic Acids (CGA) in Coffee Beans using HPLC American Journal of Research Communication, 1(2): (78-91), 2013.
11. Holim Jang, Hong Ryul Ahn, Hyoung Jo, Kyung-A Kim, Eun Ha Lee, Ki Won Lee, Sang Hoon Jung, and Chang Y. Lee , Chlorogenic Acid and Coffee Prevent Hypoxia-Induced Retinal Degeneration, J. Agric. Food Chem. 2013
12. Mehmet Saltuerk, Institute for Genetics, University of Cologne, New evidence that natural substances in green coffee beans help control blood sugar levels, 2013,.
13. Errol Zeiger, Raymond Tice, Ph.D., , Chlorogenic Acid and Caffeic Acid Review of Toxicological Literature Prepared for, 1998 .
14. Onakpoya, I J; Spencer, E A; Thompson, M J; Heneghan, C J., 1 2014, "The effect of chlorogenic acid on blood pressure: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials". Journal of Human Hypertension 29: 77–81. 2014.
15. Zhao, Y.; Wang, J.; Balleve, O.; Luo, H.; Zhang, W. "Antihypertensive effects and mechanisms of chlorogenic acids". Hypertension Research; Hypertens Res 35 (4):3704, 2011.

16. Stacewicz-Sapuntzakis, M; Bowen, PE; Hussain, EA; Damayanti-Wood, BI; Farnsworth, NR "Chemical composition and potential health effects of prunes: a functional food?". *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 41 (4): 251–86. (2001).
17. Freedman, Samuel O.; Shulman, Robert; Krupey, John; Sehon, A.H. "Antigenic properties of chlorogenic acid". *J. Allergy* 35 (2): 97–107. (1964).
18. "Effects of chlorogenic acid and its metabolites on spontaneous locomotor activity in mice.". *Biosci Biotechnol Biochem* 70 (10): 2560–3. 2006
19. *Brain Res Bull*, "Chlorogenic acid inhibits LPS-induced microglial activation and improves survival of dopaminergic neurons.". 88 (5): 487–94. 2012.
20. R. Kellner, M.M., M.Otto, M.Valcarcel, H.M. Widmer, *Sample Preparation, in Analytical Chemistry: Modern Approach to Analytical Science.* 2004, Wiley: Weinheim. p. 506-508.
21. Luque-Garcia, J.L., de Castro, M.D.L.: Focused microwave-assisted Soxhlet extraction: devices and applications. *Talanta*, 64(3), 571 (2004)
22. de Castro, M.D.L., Priego-Capote, F.: Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of Chromatography A*, 1217(16), 2383 (2010)
23. de Castro, M.D.L., Garcia-Ayuso, L.E.: Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. *Analytica Chimica Acta*, 369(1-2), 1 (1998)
24. Falandysz, J., Wyrzykowska, B., Warzocha, J., Barska, I., Garbacik-Wesolowska, A., Szefer, P.: Organochlorine pesticides and PCBs in perch *Perca fluviatilis* from the Odra/ Oder river estuary, Baltic Sea. *Food Chemistry*, 87(1), 17 (2004)
25. Diagne, R.G., Foster, G.D., Khan, S.U.: Comparison of Soxhlet and microwave-assisted extractions for the determination of fenitrothion residues in beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(11), 3204 (2002)
26. Richter, B.E., Jones, B.A., Ezzell, J.L., Porter, N.L., Avdalovic, N., Pohl, C.: Accelerated solvent extraction: A technique for sample preparation. *Analytical Chemistry*, 68(6), 1033 (1996)
27. Mockel, H.J., Welter, G., Melzer, H.: Correlation between Reversed-Phase Retention and Solute Molecular-Surface Type and Area .1. Theoretical Outlines and Retention of Various Hydrocarbon Classes. *Journal of Chromatography*, 388(2), 255 (1987)
28. Moreno, E., Reza, J., Trejo, A.: Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil using water under subcritical conditions. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 27(4), 239 (2007)

29. Lundstedt, S., van Bavel, B., Haglund, P., Tysklind, M., Oberg, L.: Pressurised liquid extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soils. *Journal of Chromatography A*, 883(1-2), 151 (2000)
30. Rostagno, M.A., Villares, A., Guillamon, E., Garcia-Lafuente, A., Martinez, J.A.: Sample preparation for the analysis of isoflavones from soybeans and soy foods. *Journal of Chromatography A*, 1216(1), 2 (2009)
31. R. Kellner, M.M., M.Otto, M.Valcarcel, H.M. Widmer, Sample Preparation, in *Analytical Chemistry: A Modern Approach to Analytical Science*, xyz, Editor. 2004, Wiley: Weinheim.
32. Bjorklund, E., Bowadt, S., Nilsson, T., Mathiasson, L.: Pressurized fluid extraction of polychlorinated biphenyls in solid environmental samples. *Journal of Chromatography A*, 836(2), 285 (1999)
33. Camel, V.: Recent extraction techniques for solid matrices-supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: their potential and pitfalls. *Analyst*, 126(7), 1182 (2001)
34. Wenzel, K.D., Hubert, A., Manz, M., Weissflog, L., Engewald, W., Schuurmann, G.: Accelerated solvent extraction of semivolatile organic compounds from biomonitoring samples of pine needles and mosses. *Analytical Chemistry*, 70(22), 4827 (1998)
35. Arnold, C.G., Berg, M., Muller, S.R., Dommann, U., Schwarzenbach, R.P.: Determination of organotin compounds in water, sediments, and sewage sludge using perdeuterated internal standards, accelerated solvent extraction, and large-volume-injection GC/MS. *Analytical Chemistry*, 70(14), 3094 (1998)
36. Schantz, M.M., Nichols, J.J., Wise, S.A.: Evaluation of pressurized fluid extraction for the extraction of environmental matrix reference materials. *Analytical Chemistry*, 69(20), 4210 (1997)
37. Heemken, O.P., Theobald, N., Wenclawiak, B.W.: Comparison of ASE and SFE with Soxhlet, sonication, and methanolic saponification extractions for the determination of organic micropollutants in marine particulate matter. *Analytical Chemistry*, 69(11), 2171 (1997)
38. Saim, N., Dean, J.R., Abdullah, M.P., Zakaria, Z.: An experimental design approach for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons from highly contaminated soil using accelerated solvent extraction. *Analytical Chemistry*, 70(2), 420 (1998)

39. Vandenburg, H.J., Clifford, A.A., Bartle, K.D., Zhu, S.A., Carroll, J., Newton, I.D., Garden, L.M.: Factors affecting high-pressure solvent extraction (accelerated solvent extraction) of additives from polymers. *Analytical Chemistry*, 70(9), 1943 (1998)
40. Bjorklund, E., Nilsson, T., Bowadt, S.: Pressurised liquid extraction of persistent organic pollutants in environmental analysis. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 19(7), 434 (2000)
41. Mustafa, A., Turner, C.: Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. *Analytica Chimica Acta*, 703(1), 8 (2011)
42. Smith, R.M.: Extractions with superheated water. *Journal of Chromatography A*, 975(1), 31 (2002)
43. Ong, E.S., Cheong, J.S.H., Goh, D.: Pressurized hot water extraction of bioactive or marker compounds in botanicals and medicinal plant materials. *Journal of Chromatography A*, 1112(1-2), 92 (2006)
44. Cam, M., Hisil, Y.: Pressurised water extraction of polyphenols from pomegranate peels. *Food Chemistry*, 123(3), 878 (2010)
45. Ferrera, Z.S., Sanz, C.P., Santana, C.M., Rodriguez, J.J.S.: The use of micellar systems in the extraction and pre-concentration of organic pollutants in environmental samples. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 23(7), 469 (2004)
46. Choi, M.P.K., Chan, K.K.C., Leung, H.W., Huie, C.W.: Pressurized liquid extraction of active ingredients (ginsenosides) from medicinal plants using non-ionic surfactant solutions. *Journal of Chromatography A*, 983(1-2), 153 (2003)
47. Luthria, D.L., Biswas, R., Natarajan, S.: Comparison of extraction solvents and techniques used for the assay of isoflavones from soybean. *Food Chemistry*, 105(1), 325 (2007)
48. Zhu, Y., Yanagihara, K., Guo, F.M., Li, Q.X.: Pressurized fluid extraction for quantitative recovery of chloroacetanilide and nitrogen heterocyclic herbicides in soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(9), 4097 (2000)
49. Richter, B.E., Covino, L.: New environmental applications of accelerated solvent extraction. *Lc Gc North America*, 18(10), 1068 (2000)
50. Bernal, J.L., Delnoz, M.J., Jimenez, J.J.: Use of a High-Pressure Soxhlet Extractor for the Determination of Organochlorine Residues by Gas-Chromatography. *Chromatographia*, 34(9-10), 468 (1992)

51. Lopez-Avila, V.: Sample preparation for environmental analysis. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 29(3), 195 (1999)
52. Blanco, E.V., Mahia, P.L., Lorenzo, S.M., Rodriguez, D.P., Fernandez, E.F.: Optimization of microwave-assisted extraction of hydrocarbons in marine sediments: comparison with the Soxhlet extraction method. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 366(3), 283 (2000)
53. Camel, V.: Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 19(4), 229 (2000)
54. Renoe, B.W.: Microwave-Assisted Extraction. *American Laboratory*, 26(12), 34 (1994)
55. Saim, N., Dean, J.R., Abdullah, M.P., Zakaria, Z.: Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soil using Soxhlet extraction, pressurised and atmospheric microwave-assisted extraction, supercritical fluid extraction and accelerated solvent extraction. *Journal of Chromatography A*, 791(1-2), 361 (1997)
56. Letellier, M., Budzinski, H.: Microwave assisted extraction of organic compounds. *Analisis*, 27(3), 259 (1999)
57. Thompson, S., Budzinski, H., LeMenach, K., Letellier, M., Garrigues, P.: Multi-residue analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons, polychlorobiphenyls, and organochlorine pesticides in marine sediments. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 372(1), 196 (2002)
58. LopezAvila, V., Benedicto, J.: Microwave-assisted extraction combined with gas chromatography and enzyme-linked immunosorbent assay. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 15(8), 334 (1996)
59. Bouaid, A., Martin-Esteban, A., Fernandez, P., Camara, C.: Microwave-assisted extraction method for the determination of atrazine and four organophosphorus pesticides in oranges by gas chromatography (GC). *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 367(3), 291 (2000)
60. Papadakis, E.N., Vryzas, Z., Papadopoulou-Mourkidou, E.: Rapid method for the determination of 16 organochlorine pesticides in sesame seeds by microwave-assisted extraction and analysis of extracts by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1127(1-2), 6 (2006)
61. Franke, M., Winek, C.L., Kingston, H.M.: Extraction of selected drugs from serum using microwave irradiation. *Forensic Science International*, 81(1), 51 (1996)
62. Desrosiers, N.A., Betit, C.C., Watterson, J.H.: Microwave-assisted extraction in toxicological screening of skeletal tissues. *Forensic Science International*, 188(1-3), 23 (2009)

63. Kiss, G.A.C., Forgacs, E., Cserhati, T., Mota, T., Morais, H., Ramos, A.: Optimisation of the microwave-assisted extraction of pigments from paprika (*Capsicum annum* L.) powders. *Journal of Chromatography A*, 889(1-2), 41 (2000)
64. Prados-Rosales, R.C., Garcia, J.L.L., de Castro, M.D.L.: Rapid analytical method for the determination of pesticide residues in sunflower seeds based on focused microwave-assisted Soxhlet extraction prior to gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 993(1-2), 121 (2003)
65. Priego-Capote, F., Luque-Garcia, U., de Castro, M.D.L.: Automated fast extraction of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons from soil by focused microwave-assisted Soxhlet extraction prior to gas chromatography-electron-capture detection. *Journal of Chromatography A*, 994(1-2), 159 (2003)
66. Capelo, J.L., Mota, A.M.: Ultrasonication for analytical chemistry. *Current Analytical Chemistry*, 1(2), 193 (2005)
67. Tadeo, J.L., Sanchez-Brunete, C., Albero, B., Garcia-Valcarcel, A.I.: Application of ultrasound-assisted extraction to the determination of contaminants in food and soil samples. *Journal of Chromatography A*, 1217(16), 2415 (2010)
68. Santos, H.M., Capelo, J.L.: Trends in ultrasonic-based equipment for analytical sample treatment. *Talanta*, 73(5), 795 (2007)
69. Huertas-Perez, J.F., Iruela, M.D., Garcia-Campana, A.M., Gonzalez-Casado, A., Sanchez-Navarro, A.: Determination of the herbicide metribuzin and its major conversion products in soil by micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1102(1-2), 280 (2006)
70. Lesueur, C., Gartner, M., Mentler, A., Fuerhacker, M.: Comparison of four extraction methods for the analysis of 24 pesticides in soil samples with gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-ion trap-mass spectrometry. *Talanta*, 75(1), 284 (2008)
71. Domeno, C., Blasco, M., Sanchez, C., Nerin, C.: A fast extraction technique for extracting polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from lichens samples used as biomonitors of air pollution: Dynamic sonication versus other methods. *Analytica Chimica Acta*, 569(1-2), 103 (2006)
72. Hyotylainen, T., Riekkola, M.L.: Potential of effective extraction techniques and new analytical systems for profiling the marine environment. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 26(8), 788 (2007)

73. Erbay, Z., Icier, F.: The Importance and Potential Uses of Olive Leaves. *Food Reviews International*, 26(4), 319 (2010)
74. Sanchez-Brunete, C., Perez, R.A., Miguel, E., Tadeo, J.L.: Multiresidue herbicide analysis in soil samples by means of extraction in small columns and gas chromatography with nitrogen-phosphorus and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 823(1-2), 17 (1998)
75. Sanchez-Brunete, C., Rodriguez, A., Tadeo, J.L.: Multiresidue analysis of carbamate pesticides in soil by sonication-assisted extraction in small columns and liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1007(1-2), 85 (2003)
76. Sanchez-Brunete, C., Albero, B., Tadeo, J.L.: Multiresidue determination of pesticides in soil by gas chromatography-mass spectrometry detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(6), 1445 (2004)
77. Kayali-Sayadi, M.N., Rubio-Barroso, S., Diaz-Diaz, C.A., Polo-Diez, L.M.: Rapid determination of PAHs in soil samples by HPLC with fluorimetric detection following so Sanchez-Brunete, C., Miguel, E., Tadeo, J.L.: Rapid method for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in agricultural soils by sonication-assisted extraction in small columns. *Journal of Separation Science*, 29(14), 2166 (2006)
78. Martinez, E., Gros, M., Lacorte, S., Barcelo, D.: Simplified procedures for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in water, sediments and mussels. *Journal of Chromatography A*, 1047(2), 181 (2004)
79. Oleszczuk, P., Baran, S.: Concentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludge-amended soil. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 36(9-10), 1083 (2005)
80. Rodriguez-Sanmartin, P., Moreda-Pineiro, A., Bermejo-Barrera, A., Bermejo-Barrera, P.: Ultrasound-assisted solvent extraction of total polycyclic aromatic hydrocarbons from mussels followed by spectrofluorimetric determination. *Talanta*, 66(3), 683 (2005)
81. Zhou, J.H., Xue, X.F., Li, Y., Zhang, J.Z., Chen, F., Wu, L.M., Chen, L.Z., Zhao, J.: Multiresidue determination of tetracycline antibiotics in propolis by using HPLC-UV detection with ultrasonic-assisted extraction and two-step solid phase extraction. *Food Chemistry*, 115(3), 1074 (2009)
82. Nania, V., Pellegrini, G.E., Fabrizi, L., Sesta, G., De Sanctis, P., Lucchetti, D., Di Pasquale, M., Coni, E.: Monitoring of perfluorinated compounds in edible fish from the Mediterranean Sea. *Food Chemistry*, 115(3), 951 (2009)

83. Collasiol, A., Pozebon, D., Maia, S.M.: Ultrasound assisted mercury extraction from soil and sediment. *Analytica Chimica Acta*, 518(1-2), 157 (2004)
84. Blackwell, P.A., Lutzhoft, H.C.H., Ma, H.P., Halling-Sorensen, B., Boxall, A.B.A., Kay, P.: Ultrasonic extraction of veterinary antibiotics from soils and pig slurry with SPE clean-up and LC-UV and fluorescence detection. *Talanta*, 64(4), 1058 (2004)
85. de Alda, M.J.L., Gil, A., Paz, E., Barcelo, D.: Occurrence and analysis of estrogens and progestogens in river sediments by liquid chromatography-electrospray-mass spectrometry. *Analyst*, 127(10), 1299 (2002)
86. Turiel, E., Martin-Esteban, A., Tadeo, J.L.: Molecular imprinting-based separation methods for selective analysis of fluoroquinolones in soils. *Journal of Chromatography A*, 1172(2), 97 (2007)
87. Xu, J., Wu, L.S., Chen, W.P., Chang, A.C.: Simultaneous determination of pharmaceuticals, endocrine disrupting compounds and hormone in soils by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1202(2), 189 (2008)
88. Zougagh, M., Valcarcel, M., Rios, A.: Supercritical fluid extraction: a critical review of its analytical usefulness. *Trends in Analytical Chemistry*, 23(5), 399 (2004)
89. Mira, B., Blasco, M., Berna, A., Subirats, S.: Supercritical CO₂ extraction of essential oil from orange peel. Effect of operation conditions on the extract composition. *Journal of Supercritical Fluids*, 14(2), 95 (1999)
90. Stashenko, E.E., Puertas, M.A., Combariza, M.Y.: Volatile secondary metabolites from *Spilanthes americana* obtained by simultaneous steam distillation solvent extraction and supercritical fluid extraction. *Journal of Chromatography A*, 752(1-2), 223 (1996)
91. Miyawaki, T., Kawashima, A., Honda, K.: Development of supercritical carbon dioxide extraction with a solid phase trap for dioxins in soils and sediments. *Chemosphere*, 70(4), 648 (2008)
92. Introduction to Modern Liquid Chromatography, 2nd ed., New York: Wiley, 1979
93. Lindsay, High Performance Liquid Chromatography, New York, Wiley, 1992
94. Operating Manual, High Performance Liquid Chromatograph, Agilent 1100; VWD, DAD, FLD, and RID. http://share.psu.ac.th/system/assets/media/files/000/007/356/original_Operatin_Manual_HPLC_1100.pdf?1306827231
95. Jaramillo, Mike. SOP for Agilent 1100 Series HPLC Instr
96. Physikalisch-chemisches Praktikum I UV/VIS Spectroscopy – 2014

