



**ETANOL KOSOLVENTLİ SÜPERKRİTİK KARBONDİOKSİT
ÖZÜTLEMESİ METODU İLE KIRMIZI KANTARON BİTKİSİNDEN İLAÇ
ETKEN MADDESİ FLAVONOİDLERİN VE TOPLAM ANTİOKSİDAN
MADDELERİN TESPİTİ**

Sima BAYRAM

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

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜ**

HAZİRAN 2019

Sima BAYRAM tarafından hazırlanan “ETANOL KOSOLVENTLİ SÜPERKRİTİK KARBONDİOKSİT ÖZÜTLEMESİ METODU İLE KIRMIZI KANTARON BİTKİSİNDEN İLAÇ ETKEN MADDESİ FLAVONOİDLERİN VE TOPLAM ANTİOKSİDAN MADDELERİN TESPİTİ” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi KİMYA MÜHENDİSLİĞİ Ana Bilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Metin GÜRÜ

Kimya Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

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

.....

Başkan: Prof. Dr. M. Atilla MURATHAN

Kimya Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

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

.....

Üye: Doç. Dr. Çetin ÇAKANYILDIRIM

Kimya Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Hitit Üniversitesi

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

.....

Tez Savunma Tarihi: 18/06/2019

Jüri tarafından kabul edilen bu çalışmanın Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....

Prof. Dr. Sena YAŞYERLİ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
 - Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
 - Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
 - Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
 - Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,
- bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Sima BAYRAM
18/06/2019

ETANOL KOSOLVENTLİ SÜPERKRİTİK KARBONDİOKSİT ÖZÜTLEMESİ
METODU İLE KIRMIZI KANTARON BİTKİSİNDEN İLAÇ ETKEN MADDESİ
FLAVONOİDLERİN VE TOPLAM ANTİOKSİDAN MADDELERİN TESPİTİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Sima BAYRAM

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Haziran 2019

ÖZET

Çevresel ve psikolojik etkilerle kişilerde stres düzeyinin artması serbest radikal oluşumuna neden olmaktadır. Canlı bünyesinde serbest radikaller antioksidanlar ile bir denge halindedir. Fakat bu denge antioksidanların aleyhine kaydığı anda canlı vücudunda oksidatif stres meydana gelmeye başlar, oksidatif stres vücuttaki bütün sistemler için hastalık yapıcı bir etmendir. Antioksidan bileşenlerin en önemli kaynakları bitkisel doğal besin maddeleridir. Gıdalarda doğal olarak var olan antioksidan ve fenolik maddeler; serbest radikal bağlayıcı görevleri sayesinde antioksidan etkilerini gösterirler ve metabolizmaya olumlu şekilde etki ederler. Flavonoidler meyve, sebze, çeşitli yararlı biyokimyasallar ve antioksidan etkiye sahip bazı içeceklerde bulunan aromatik pigment bileşikleridir. Kırmızı kantaron (*Erythraea Centaurium*) bitkisi yüzyıllardır gastrointestinal tedavide, sindirime yardımcı, iştah arttırıcı, antispazmotik, antienflamatuvar, sedatif ve antidiyabetik etkileri sayesinde kullanılmaktadır. Kırmızı kantaron bitkisine bu özellikleri veren ise ihtiva ettiği flavonoidler ve fenolik bileşenlerdir. Bu çalışmada sıcaklık, basınç ve özütleme süresi değiştirilirken sabit etanol katkısıyla verimin artırılması planlanmıştır. Kırmızı kantaron çiçeklerinden kuersetin, rutin, kaemferol, apigenin, silibinin ve taksifolin tayininde çevre dostu olan ve zararlı solvent kalıntısı bırakmadığı için süperkritik karbondioksit özütlemesi metodu tercih edilmiştir. Deneysel çalışma koşulları Design Expert 11.1.2.0 Trial programı ile belirlenmiştir. HPLC (yüksek basınç sıvı kromatografi) analizleri sonucunda kuersetin, rutin, kaemferol ve apigeninin maksimum verimleri sırasıyla 12,83 µg/g, 7,86 µg/g, 11,42 µg/g ve 10,40 µg/g olarak bulunmuştur. Son olarak da özütlerde Difenil-1 Pikrilhidrazil Radikal Tutma Kapasitesi (DPPH) metodu ile toplam antioksidan madde, Folin-Ciocalteu metodu ile de toplam fenolik madde analizleri yapılmıştır. Referans özütlemesi olarak da Soxhlet özütlemesi ile karşılaştırma yapılmıştır.

Bilim Kodu : 91202
Anahtar Kelimeler : Kırmızı Kantaron, Süperkritik Karbondioksit Özütlemesi, Yüzey Yanıt Metodu
Sayfa Adedi : 81
Danışman : Prof. Dr. Metin GÜRÜ

THE DETERMINATION OF FLAVONOIDS AND TOTAL ANTIOXIDANT
SUBSTANCES OF A DRUG IMPACT OF RED KANTARON USAGE WITH THE
SUPERCRITICAL CARBONDIOXIDE EXTRACTION METHOD OF ETHANOL
COSOLVENTINE

(M. Sc. Thesis)

Sima BAYRAM

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

June 2019

ABSTRACT

Increasing the level of stress in people with environmental and psychological effects cause free radical formation. Free radicals are in equilibrium with antioxidants. However, when this balance deteriorates against antioxidants, oxidative stress, which has disease-causing effects, is produced for all systems in the body. Naturally occurring antioxidant and phenolic substances in foods; they show the antioxidant effect by binding free radicals and positively affect the metabolism. Flavonoids are aromatic pigment compounds and are found in fruits and vegetables. Red centaury (*Erythraea Centaurium*) has common use especially in gastrointestinal treatment, digestion, appetite enhancer, anti-spasmodic, anti-inflammatory, sedative and anti-diabetic. Red centaury has a variety of phenolic components that give these properties of plant. In this study, it is planned to increase the efficiency with constant ethanol additive while changing the temperature, pressure and extraction time. The method of supercritical carbon dioxide extraction was preferred because it was environmentally friendly and did not leave any harmful solvent residue in the determination of kuersetin, rutin, kaempferol and apigenin from the *Erythraea centaurium*. Experimental working conditions were determined by Design Expert 11.1.2.0 Trial program. As a result of HPLC (high pressure liquid chromatography) analysis, maximum quercetin, rutin, kaempferol, silibinin, taxifolin and apigenin amounts were found to be 12,83 µg/g, 7,86 µg/g, 11,42 µg/g and 10,40 µg/g respectively. Finally, the total antioxidant content of the extracts was performed by Diphenyl 1-1 Picrylhydrazil Radical Holding Capacity (DPPH) method and total phenolic analysis was performed by Folin-Ciocalteu method. Soxhlet extraction was used as reference extraction.

Science Code : 91202

Key Words : Red Centaury, *Erythraea centaurium*, Supercritical Carbondioxide
Extraction, Response Surface Methods

Page Number : 81

Supervisor : Prof. Dr. Metin GÜRÜ

TEŞEKKÜR

Rahmetli hocam Doç. Dr. Ayşe TOSUN' a bana Gazi Üniversitesi' ni sevdiren yolunu aydınlattığı için teşekkürlerimi ve sevgilerimi yollamayı borç bilirim.

Çalışmalarım boyunca değerli bilgi ve tecrübeleriyle beni yönlendiren saygı değer danışman hocam Prof. Dr. Metin GÜRÜ' ye, deneylerimin ve desteklerini esirgemeyen hocam Öğr. Gör. Dr. Levent NURALIN' a, kıymetli tecrübeleriyle tezime katkıda bulunan Prof. Dr. Canan CABBAR, Prof. Dr. Servet ÇETE, Arş. Gör. Deniz AKIN' a, özverilerini esirgemeyen mesai arkadaşım Ayşe CANOĞLU' na, yola devam etme gücü veren manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan canım annem Ülkü BAYRAK' a, canım babam Çetin BAYRAK' a, can yoldaşım kardeşlerim Alperen BAYRAK, Tuğba KADEMOĞLU, Büşra ŞEKER, Damla Melek ÖZDEN' e ve hayatıma nefes katan her nefesimde yanımda olan sevgili eşim İsmail BAYRAM' a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xiii
RESİMLERİN LİSTESİ.....	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	3
2.1. Kırmızı Kantaron (<i>Centaurium erythraea rafn</i> (Erythraea centaurium)) Bitkisi.....	3
2.2. Kırmızı Kantaron Bitkisinin Botanik Özellikleri.....	3
2.3. Kırmızı Kantaron Bitkisinin Yapısında Bulundurduğu Kimyasallar.....	5
2.3.1. İridoid glikozitleri.....	5
2.3.2. Fenolik bileşenler.....	6
2.4. Kırmızı Kantaron Bitkisinin Farmakolojik Etkileri.....	9
2.5. Süperkritik Akışkan Özütlemesi.....	9
2.5.1. Süperkritik akışkan ve özellikleri.....	10
2.5.2. Süperkritik akışkanın seçimi.....	11
2.5.3. Süperkritik akışkan özütlemesinin avantajları.....	12
2.5.4. Süperkritik akışkan özütlemesinin dezavantajları.....	13

2.6. Süperkritik Akışkan Özütlemesinde Kosolvent Kullanımı.....	13
2.7. Antioksidan Maddeler ve Fenolik Bileşenler.....	14
3. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI.....	21
3.1. Kırmızı Kantaron Bitkisinin Yapısında Bulundurduğu Bileşenler ve Tıbbi Etkileri Üzerine Yapılmış Çalışmalar.....	21
3.2. Süperkritik Akışkan Özütlemesi Üzerine Yapılmış Çalışmalar.....	24
4. MATERYAL VE METOD.....	29
4.1. Kullanılan Materyaller.....	29
4.2. Süperkritik CO ₂ Özütlenmesi.....	30
4.2.1. Süperkritik CO ₂ özütlenmesi deney sistemi.....	30
4.2.2. Süperkritik CO ₂ özütlenmesi deney yöntemi.....	31
4.3. Erythraea Centaurium Bitkisinin Fenolik Bileşenlerinin Analiz Yöntemi.....	34
4.3.2. Soxhlet yöntemi.....	38
4.3.3. UV-VIS spektrofotometrik yöntemi.....	39
4.4. Deneysel Tasarım Yöntemi.....	42
5. DENEY SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	43
5.1. Yüzey Cevap Yöntemi ile Matematiksel Modelleme.....	43
5.2. Kırmızı Kantaron Çiçeğinden Süperkritik CO ₂ ile Kuersetin Özütleme Verimine İşletim Parametrelerin Etkisi.....	44
5.2.1. Kuersetin özüt verimine sıcaklık-basınç; sıcaklık-zaman; basınç-zaman parametrelerinin etkisi.....	47
5.3. Kırmızı Kantaron Çiçeğinden Süperkritik CO ₂ ile Rutin Özütleme Verimine İşletim Parametrelerin Etkisi.....	50
5.3.1. Rutin özüt verimine sıcaklık-basınç; sıcaklık-zaman; basınç-zaman parametrelerinin etkisi.....	53

Sayfa

5.4. Parametrelerin Kırmızı Kantaron Çiçeği Süperkritik CO ₂ ile Kaemferol Özütleme Verimine Etkisi.....	56
5.4.1.Kaemferol özüt verimine sıcaklık-basınç; sıcaklık-zaman; basınç-zaman parametrelerinin etkisi.....	58
5.5. Kırmızı Kantaron Çiçeği Süperkritik CO ₂ ile Özütleme Sürecinde Yüzey Cevap Analizi Optimizasyon Sonuçları.....	61
5.6. Kırmızı Kantaron Çiçeği Süperkritik CO ₂ ile Özütleme Sürecinde Elde Edilen Özütlerin Toplam Fenolik Madde Tayini Sonuçları.....	63
5.7. Kırmızı Kantaron Çiçeği Süperkritik CO ₂ ile Özütleme Sürecinde Elde Edilen Özütlerin Toplam Antioksidan Madde Tayini Sonuçları.....	65
6. TARTIŞMA.....	69
7. SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ VE ÖNERİLER.....	73
KAYNAKLAR.....	75
ÖZGEÇMİŞ.....	81

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Kırmızı kantaron bitkisi taksonomik sınıflandırma.....	3
Çizelge 2.2. Kırmızı kantaron bitkisinin içerdiği kimyasallar.....	9
Çizelge 4.1. Design Expert 11.1.2.0 Trial programı tarafından belirlenen özütleme çalışma koşulları.....	33
Çizelge 4.2. HPLC çalışma koşulları.....	36
Çizelge 5.1. Deneysel Tasarım Yöntemi için seçilen parametreler.....	43
Çizelge 5.2. Sıcaklık, basınç ve özütleme süresi olarak seçilen tasarım değişkenlerinin aralığı.....	43
Çizelge 5.3. Deneysel algoritma ve kuersetin özütleme çıktıları.....	44
Çizelge 5.4. Kuersetin deneyleri için kullanılan modelin tutarlılığı ve parametreler arası ilişkilerin anlamlılığı.....	45
Çizelge 5.5. Kuersetin için hesaplanan model istatistikleri.....	46
Çizelge 5.6. Deneysel işletim şartları ve rutin özütleme çıktıları.....	51
Çizelge 5.7. Rutin deneyleri için kullanılan modelin ANOVA testi verileri.....	52
Çizelge 5.8. Rutin için hesaplanan model istatistikleri.....	52
Çizelge 5.9. Deneysel işletim şartları ve kaemferol özütleme çıktıları.....	56
Çizelge 5.10. Kaemferol deneyleri için kullanılan modelin ANOVA testi verileri.....	57
Çizelge 5.11. Kaemferol için hesaplanan model istatistikleri.....	57
Çizelge 5.12. Süperkritik özütleme ve soxhlet deneyleri sonucu elde edilen özütlerin toplam fenolik madde miktarları.....	65
Çizelge 5.13. Süperkritik özütleme ve soxhlet deneyleri sonucu elde edilen özütlerin toplam antioksidan madde tayini sonuçları.....	67
Çizelge 5.14. Tez kapsamında Kırmızı Kantaron çiçeği ile yapılan çalışma koşulları.....	69
Çizelge 5.15. SC-CO ₂ ve soxhlet (EtOH ile) özütlemesi karşılaştırılması.....	70

Çizelge	Sayfa
Çizelge 5.16. Tez kapsamında yapılan çalışmalar için SC-CO ₂ optimum flavonoid eldesi şartları.....	71

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. İridoit glikoziti moleküler yapısı.....	7
Şekil 2.2. a) Swertiamarin moleküler yapısı b) Gentiopicrin moleküler yapısı c) Sweroside moleküler yapısı.....	6
Şekil 2.3. Saf bir maddenin basınç-sıcaklık faz diyagramı.....	11
Şekil 2.4. CO ₂ basınç-sıcaklık diyagramı	12
Şekil 2.5. Antioksidan bileşenlerin sınıflandırılması.....	15
Şekil 2.6. Flavonoid kimyasal yapısı	16
Şekil 2.7. Flavonoid çeşitlerinin kimyasal yapısı	17
Şekil 2.8. Kuersetinin kimyasal yapısı.....	18
Şekil 2.9. Rutinin kimyasal yapısı.....	18
Şekil 2.10. Kaemferolün kimyasal yapısı.....	19
Şekil 2.11. Apigenin kimyasal yapısı.....	20
Şekil 4.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan cihazlar ve kimyasallar.....	29
Şekil 4.2. Özütleme işleminin sabit, değişken ve bağımlı parametreleri.....	32
Şekil 4.3.Süperkritik CO ₂ özütleme sistemi akım şeması.....	34
Şekil 4.4. Kuersetin (50 ppm), rutin (50 ppm), kaemferol (50 ppm) ve apigenin (50ppm) standartlarına ait kromatogram.....	37
Şekil 4.5. Silibinin (50 ppm) ve taksifonin (50 ppm standartlarına ait kromatogram.....	37
Şekil 4.6. 57,5°C, 215 bar ve 120 min çalışmasına ait kromatogram (Numune no: 20).....	37
Şekil 4.7.Soxhlet özütlemesine ait kromatogram.....	37
Şekil 5.1. Kuersetin verimine a)basınç- sıcaklık; b) zaman- sıcaklık; c) zaman-basınç ikili etkileşimlerinin etkisi.....	48
Şekil 5.2. Rutin verimine a) basınç- sıcaklık; b) zaman- basınç; c) zaman- sıcaklık ikili etkileşiminin etkisi.....	54

Şekil	Sayfa
Şekil 5.3. Kaemferol verimine a)basınç- sıcaklık; b)zaman- sıcaklık; c)zaman- basınç ikili etkileşiminin etkisi.....	59
Şekil 5.4. Modelin öngördüğü ve deneylerden elde edilen kuersetinin verim kıyaslaması.....	61
Şekil 5.5. Modelin öngördüğü ve deneylerden elde edilen rutin % verim kıyaslaması....	62
Şekil 5.6. Modelin öngördüğü ve deneylerden elde edilen kaemferol % verim kıyaslaması.....	62
Şekil 5.7. Gallik asit kalibrasyon eğrisi grafiği.....	64
Şekil 5.8. DPPH kalibrasyon eğrisi grafiği.....	66

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. Kırmızı kantaron çiçekleri a) canlı b) toplanıp kurutulmuş.....	4
Resim 2.2. Kırmızı kantaron bitkisi a) çiçekleri temizlenmiş b) öğütülmüş.....	4
Resim 4.1.a) Bitki değirmeni b) Elek seti.....	30
Resim 4.2.a) Süperkritik karbondioksit özütleme sistemi b) Fırın içi.....	31
Resim 4.3. UV dedektörlü HPLC cihazı ve bilgisayarı.....	35
Resim 4.4.Soxhlet özütleme sistemi.....	38
Resim 4.5.UV-VIS Spektrofotometre cihazı.....	39
Resim 5.1. DPPH Kalibrasyonu için hazırlanan stok çözeltiler.....	63

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler	Açıklamalar
atm	Basınç birimi
bar	Basınç birimi
cm	Santimetre
min	Dakika
g	Gram
L	Litre
m	Metre
M	Molar
mL	Mililitre
μL	Mikrolitre
μg	Mikrogram
μ	Mikron
nm	Nanometre
P	Basınç
P_c	Kritik Basınç
ppm	Parts Per Million (milyonda bir)
rpm	Revalutions Per Minute (Dakikadaki Devir Sayısı)
T	Sıcaklık
T_c	Kritik Sıcaklık
°C	Celcius
K	Kelvin

Kısaltmalar**Açıklamalar**

ABTS	Troloks Eşiti Antioksidan Kapasite Tayini Yöntemi
ANOVA	Analysis of Variance (Varyans Analizi Metodu)
BHA	Bütilllenmiş hidroksi anisol
BHT	Bütilllenmiş hidroksi toluen
EC	<i>Erythraea Centaurium</i> (Kırmızı Kantaron)
CO₂	Karbondioksit
DAD	Fotoiyot Array Dedektörü
DPPH	Difenil-1 Pikrilhidrazil Radikali
ESI-MSⁿ	Elektrospray İyonizasyon- Kütle Spektrofotometresi
EtOH	Etanol
FRAP	Demir (III) İyonu İndirgeyici Antioksidan Gücü Metodu
GC/MS	Gaz Kromatografisi / Kütle Spektrofotometresi
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
MetOH	Metanol
SC-CO₂	Süperkritik Karbondioksit
ROS	Reaktif Oksijen Türlerini
UHPLC	Ultra Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
UV	Ultraviyole
UV-VIS	Ultraviyole ve Görünür Işık

1. GİRİŞ

Kırmızı kantaron (*Erythraea Centaurium*) bitkisi Gentianaceae ailesine mensup birbitkidir. Avrupa, Batı Asya, Kuzey Afrika, Kuzey Amerika ve Doğu Avustralya gibi kuru ve kumlu bölgelerde yetişir (Kachmar, Oliveira, Valentão, Gil-Izquierdo, Domínguez-Perles, Ouahbi, El Badaoui, Andrade, Ferreres, 2019; Liliya, Iryna, Olena, Svetlana, 2017).

Gıda katkı maddesi olarak kullanılmasının yanı sıra, bitki çayı hazırlanarak tüketilen kırmızı kantaron geleneksel tıpta sindirim, mide, tonik, depuratif, yatıştırıcı ve ateş düşürücü olarak kullanılır. Birçok çalışmada antibakteriyel, antioksidan, antidiyabetik, antienflamatuar, antipiretik (Bouyahya, Belmehdi, El Jemli, Marmouzi, Bourais, Abrini, Faouzi, Dakka, Bakria, 2019), antitümör, antikolinesteraz özelliklere ve yara iyileşmesi aktivitesine sahip olduğu belirtilmektedir. Kırmızı kantaron alerji yatıştırıcı ve sıkılaştırıcı özellikleri nedeniyle bazı kozmetik preparatlarına da dahil edilmiştir (Božunović, Živković, Gašić, Glamočlija, Ćirić, Matekalo, Šiler, Soković, Tešić, Mišić, 2018; Kachmar ve diğerleri, 2019; Liliya ve diğerleri, 2017). Bitki hem gıda hem de içecek endüstrisinde büyük öneme sahiptir. Nitekim Avrupa Konseyi, bu bitkiyi küçük miktarlarda gıda maddelerine eklenebileceğini gösteren doğal bir gıda tatlandırıcı kaynağı olarak listelemiştir (Kachmar ve diğerleri, 2019).

Yapılan çalışmalar kırmızı kantaron bitkisinin flavonoidler, hidroksisinamik asitler, tanik maddeler, kumarinler, yağ ve organik asitler, aminoasitler, karotenoidler ve klorofiller içerdiğini bulmuştur. Fenolik bileşiklerden kuersetin, isorhamnetin, kaempferol ve p-kumarik, ferulik ve sinapik asit varlığı tanımlanmıştır. (Liliya ve diğerleri, 2017).

Kırmızı kantaron bitkisinin bileşenleri gerek tıp gerekse bitki bilimi için önem vaatmektedir, ancak ayırma teknolojileri düşünüldüğünde klasik ayırma metodlarının birtakım dezavantajları bu çalışmayı süperkritik özütlemeye yönlendirmiştir. Klasik özütlemeye metodlarına alternatif olarak, özütlemeye süresini kısaltan, organik solvent tüketimini azaltan ve çevre kirliliğini önleyen üstünlüklerinden dolayı enstrümental ekstraksiyon yöntemlerine olan ilgi artmaktadır. Karbondioksit gibi temiz ve ucuz bir akışkan kullanılması ve çevre dostu oluşu süperkritik karbondioksit özütlemesi metodunu cazip kılar. Ayrıca sıcaklık, basınç, özütlemeye süresi, tanecik büyüklüğü gibi parametrelerden

herhangi birini veya birkaçını değiştirmek özütleme veriminde büyük değişime sebep olduğundan sonuçları manipüle etmek çalışan kişinin kontrolündedir (Ballesteros-Vivas, Mendiola, Ibanez, 2019; Barzotto, Santos, Antonio, Sene, Da Silva, Vieira, 2019).

Bu yüksek lisans tez çalışmasının amacı etanol kosolventli (ikincil çözücü) süperkritik karbondioksit özütlemesi metodu ile kırmızı kantaron bitkisi çiçeklerinden özüt eldesi, elde edilen özütlerde bazı flavonoidlerin içeriğine HPLC analizi ile bakılması, ardından toplam antioksidan madde ve toplam fenolik madde analizleri yapılmasıdır. Özütleme metoduna referans metot olarak karşılaştırma imkânı sunması açısından soxhlet metodu ile de özütleme yapılp bileşen verimi, toplam antioksidan ve toplam fenolik madde karşılaştırılması yapılmıştır.

Kırmızı kantaron çiçekleri temizleme işleminin ardından belirlenen boyutlar aralığında öğütüldü. Etanol kosolventli süperkritik CO₂ özütlenmesi ile çeşitli parametrelerin bileşen verimi üzerindeki etkileri araştırıldı.

Yüzey Cevap Yöntemi kapsamında Design Expert 11.1.2.0 Trial programı ile sıcaklık, basınç, özütleme süresi parametrelerinin özütleme verimine etkisini gösteren ön algoritma oluşturuldu. Programın sunduğu koşullardaki deneyler yapılp; yanıt fonksiyonu olan bağımlı değişken ise özütleme sürecinin verimi (µg flavonoid / g bitki) olarak belirlendi. Deney sonuçları ile modelin önerdiği sonuçların uyumlu olduğu görüldü.

Kırmızı kantaron çiçeğinin etanol kosolventli süperkritik CO₂ özütlemesi ile elde edilen özütü içerisinde yer alan ve ilaç etken maddesi olan kuersetin, rutin, apigenin, kaemferol, silibinin ve taksifolin maddelerinin ilk olarak HPLC yöntemi ile kalitatif ve kantitatif olarak analizleri gerçekleştirildi. Ardından özütlerde Difenil-1 Pikrilhidrazil Radikal Tutma Kapasitesi (DPPH) metodu ile toplam antioksidan madde, Folin-Ciocalteu metodu ile de toplam fenolik madde analizleri yapıldı. Tüm bu çalışmalara ek olarak da etanol kosolventli süperkritik CO₂ özütlemesi verimi ile karşılaştırma yapılabilmesi açısından kırmızı kantaron çiçeklerinden soxhlet özütlemesi yapılp HPLC yöntemi ile kalitatif ve kantitatif olarak analizleri ve Difenil-1 Pikrilhidrazil Radikal Tutma Kapasitesi (DPPH) metodu ile toplam antioksidan madde ve Folin-Ciocalteu metodu ile de toplam fenolik madde analizleri de yapıldı.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Kırmızı Kantaron (*Centaurium erythraea rafn (Erythraea centaurium)) Bitkisi*

Bu bölümde Kırmızı Kantaron (*Centaurium erythraea rafn (Erythraea centaurium))* bitkisine ait botanik özellikler, yapısında bulundurduğu önemli bileşikler ve farmakolojik etkileri incelenmiştir.

2.2. Kırmızı Kantaron Bitkisinin Botanik Özellikleri

Gentianaceae ailesine mensup olan ve ailenin en yaygın türü olan kırmızı kantaron bitkisi Avrupa, Batı Asya, Kuzey Afrika, Kuzey Amerika ve Doğu Avustralya gibi kuru ve kumlu bölgelerde yetişir. Bütün kısımları bitkisel ilaçlarda kullanılmaktadır, “*Small centaury*” olarak da bilinmektedir. Almanya ve Fransa’dan Rusya’ya kadar uzanan yetişme alanına sahip iki de alt türü bulunmaktadır (Banjanac, Dragicevic, Siler, Gasic, Bohanec, Zivkovic, Trifunovic, Misic, 2014; Kachmar ve diğerleri, 2019; Liliya ve diğerleri, 2017).

Kırmızı kantaron bitkisinin taksonomik sınıflandırılması Çizelge 2.1’ de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Kırmızı kantaron bitkisi taksonomik sınıflandırma

Bölüm:	Plantae
Alt Bölüm:	Tracheobionta
Sınıf:	Magnoliopsida
Alt Sınıf:	Asteridae
Takım	Gentianales
Familiya:	Gentianaceae
Cins:	Centaurium

Kırmızı kantaron bitkisinin 2000 yıldır başta Avrupa ve özellikle Balkanlar olmak üzere Asya’dan Afrika kıtasına uzanan bir yetişme ve kullanım alanı mevcuttur. Balkan kültüründe “kichica” olarak isimlendirilir (Stefkov, Miov, Dinevska-Kjovkarovska Petreska-Stanoeva, Stefova, Petrusevska, Kulevanova, 2014).

Resim 2.1’de görüldüğü gibi kırmızı kantaron 15-24 cm yüksekliğe kadar büyüyen bir binal bitkidir. Sapları dallanmış, pembe veya kırmızı çiçek kümeleri taşır (Kachmar ve diğerleri, 2019).



Resim 2.1. Kırmızı kantaron çiçekleri a) canlı b) toplanıp kurutulmuş



Resim 2.2. Kırmızı kantaron bitkisi a) çiçekleri temizlenmiş b) öğütülmüş

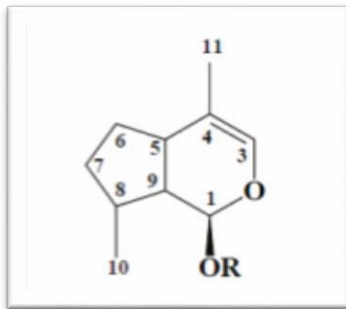
2.3. Kırmızı Kantaron Bitkisinin Yapısında Bulundurduğu Kimyasallar

Kırmızı kantaron bitkisi başta antioksidan özelliği ile serbest radikallerden vücudu korumasının yanı sıra; tıbbi olarak önemini, ihtiva ettiği önemli bileşenlere borçludur (Stefkov ve diğerleri, 2014).

Yapılan araştırmalarda kırmızı kantaron bitkisi yapısında öncelikli olarak iridoid glikozitleri ve fenolik bileşenler olmak üzere; uçucu bileşenler, polisakkaritler, klorofiller ve karotenoidlerin de bulunduğu belirtilmiştir. Fenolik bileşenler ise fenolik asitler, flavonoidler ve ksantonlardır (Banjanac ve diğerleri, 2014; Božunovića ve diğerleri, 2018; Stefkov ve diğerleri, 2014; Stoiko ve Kurylo, 2018).

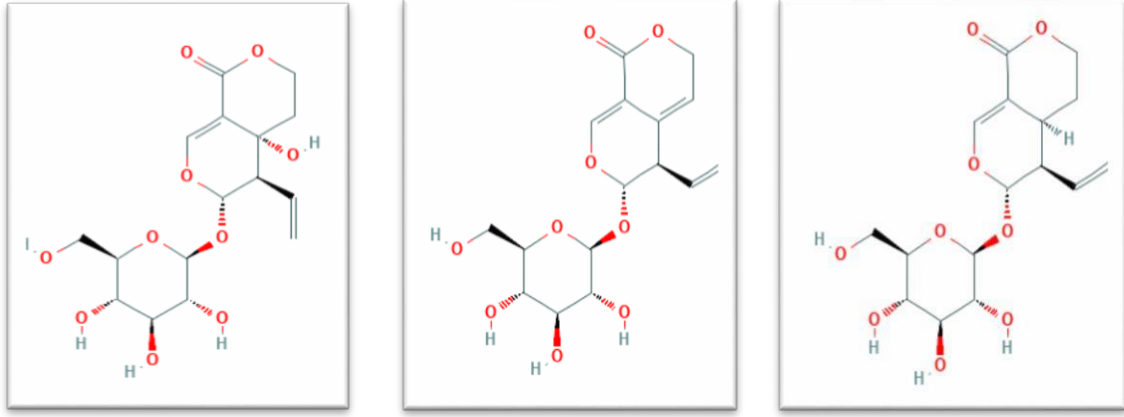
2.3.1. İridoid glikozitleri

İridoitler birçok bitki tarafından üretilen sekonder metabolitlerdir. İlk defa 1962’ de Foderaro ve arkadaşları *Penstemon secundiflorus* bitkisinden X- ışınları kristal analizi ile bir iridoid glikozit izole etmiştir. (Atar ve Çölgeçen, 2013). İridoid glikozitler tıbbi açıdan önemli bir yere sahiptir. 2019 yılı itibari ile bitki dünyası yapısında 3000 civarı iridoid glikoiziti varlığı tespit edilmiştir. İnsan sağlığı üzerinde antimikrobiyal, antitümör, antikardiyak, antienflamatuar, antihepatoma, antioksidan, nöron koruyucu gibi etkiler gösterir. Doğal olarak meydana gelen iridoid glikozitler kimyasal özelliklerine ve iskeletindeki karbon sayılarına bakılarak genellikle sekiz, dokuz veya on karbonlu olarak farklı gruplarla sınıflandırılır (Dinda ve diğerleri, 2019).



Şekil 2.1. İridoit Glikoziti Moleküler Yapısı (Atar ve Çölgeçen, 2013)

Kırmızı kantaron yapısında bulunan önemli sekoiridoit glikozitleri Swertiamarin ($C_{16}H_{22}O_{10}$), Gentiopirin ($C_{16}H_{20}O_9$), Sweroside ($C_{16}H_{22}O_9$) yapılarıdır (Matekalo ve diğerleri, 2018).



Şekil 2.2. a) Swertiamarin Moleküler Yapısı b) Gentiopirin Moleküler Yapısı c) Sweroside Moleküler Yapısı (Atar ve Çölgeçen, 2013)

Swertiamarin ve sweroside glikozitlerinin antibakteriyel özellikleri mevcuttur, bunu *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Citrobacter freundii* ve *Escherichia coli* bakterilerinin büyümelerini inhibe ederek gösterirler (Committee on Herbal Medicinal Products, 2015).

2.3.2. Fenolik bileşenler

Fenolik maddeler aromatik halkasında bir veya daha fazla hidroksil grubu içeren bileşiklerdir. Yapılarındaki hidroksil gruplar sayesinde antioksidan özellik gösterirler. ‘Fenol explorer’ isimli polifenol veri bankasına göre çoğu meyvelerde olmak üzere doğada 500’den fazla fenolik bileşen mevcuttur (Lima ve diğerleri, 2019).

Kırmızı kantaron bitkisi ise kaempferol, kuersetin, rutin, apigenin, kaempferol 3-O-glikozit, p-kumarik asit, ferulik asit, sinapik asit, kuersetin 3-O-glikozit (izokuersetin), rutin, gallik asit ($C_7H_5O_5^-$), klorogenik asit ($C_{16}H_{17}O_9^-$), kafeik asit ($C_9H_7O_4^-$), vanilik asit ($C_8H_7O_4^-$), sinamik asit ($C_9H_7O_2^-$) gibi onlarca fenolik bileşen içermektedir, Çizelge 2.2.’de kırmızı kantaron bitkisinin içerdği fenolik bileşenlerin birçoğu verilmiştir, Božunović ve

arkadaşlarının 100 mg bitkinin 5 mL metanolde 1 gece özütlenmesi ile elde edilen özütten UHPLC- MS / MS ile analiz edilmiş verilerdir (Božunović ve diğerleri, 2018).

Çizelge 2.2. Kırmızı kantaron bitkisinin içeriğindeki kimyasallar (Banjanac ve diğerleri 2017)

Bileşen Adı	Moleküler Formül
p-Hidroksibenzoik asit	$C_7H_5O_3^-$
Dihidroksibenzoik asit Pentosil hegzosit	$C_{18}H_{23}O_{13}^-$
Kafeik asit	$C_9H_7O_4^-$
Hidroksibenzoik asit Pentosil hegzosit	$C_{18}H_{23}O_{12}^-$
Klorojenik asit	$C_{16}H_{17}O_9^-$
Ferulik asit hegzosit	$C_{16}H_{19}O_9^-$
Sinapik asit hegzosit	$C_{17}H_{21}O_{10}^-$
Kafeik asit hegzosit	$C_{15}H_{17}O_9^-$
Vanillik asit	$C_8H_7O_4^-$
p-Kumarik asit	$C_9H_7O_3^-$
Vanillin	$C_8H_7O_3^-$
Sinapik asit	$C_{11}H_{11}O_5^-$
Ferulik asit	$C_{10}H_9O_4^-$
Siringaldehit	$C_9H_9O_4^-$
Sinnamik asit	$C_9H_7O_2^-$
p-Coumaric asit methyl ester	$C_{10}H_9O_3^-$
Luteolin	$C_{15}H_9O_6^-$
Naringenin	$C_{15}H_{11}O_5^-$
Apigenin	$C_{15}H_9O_5^-$
Kaemferol	$C_{15}H_9O_6^-$
Kuersetin	$C_{15}H_9O_7^-$
Galangin	$C_{15}H_9O_5^-$
Kaemferol glikozit derivative 1	$C_{33}H_{39}O_{20}^-$
Kaemferol glikozit derivative 2	$C_{33}H_{39}O_{19}^-$
Kuersetin 3-O-glikozit (Isokuercitrin)	$C_{21}H_{19}O_{12}^-$
Kuersetin 3-O-rutinosit (Rutin)	$C_{27}H_{29}O_{16}^-$
Kaemferol glikozit derivative 3	$C_{48}H_{55}O_{25}^-$
Kaemferol glikozit derivative 4	$C_{48}H_{55}O_{25}^-$
Kaemferol 3-O- glikozit (Astragalin)	$C_{21}H_{19}O_{11}^-$
Kaemferol glikozit türevi 5	$C_{50}H_{57}O_{27}^-$
Kaemferol glikozit türevi 6	$C_{50}H_{57}O_{26}^-$

Çizelge 2.2. (devam) Kırmızı kantaron bitkisinin içeriğindeki kimyasallar (Banjanac ve diğerleri 2017)

Bileşen Adı	Moleküler Formül
Metil kaemferol glikozit türevi 1	$C_{51}H_{59}O_{27}^-$
Kaemferol glikozit türevi 7	$C_{50}H_{57}O_{26}^-$
Metil kaemferol glikozit türevi 3	$C_{51}H_{59}O_{27}^-$
Metil kaemferol glikozit türevi 4	$C_{43}H_{47}O_{22}^-$
Metil kaemferol glikozit türevi 5	$C_{43}H_{47}O_{22}^-$
Metil kaemferol glikozit türevi 6	$C_{43}H_{47}O_{22}^-$
Kaemferol glikozit türevi 8	$C_{36}H_{35}O_{17}^-$
Kaemferol glikozit türevi 9	$C_{36}H_{35}O_{17}^-$
Trihidroksi trimetoksi ksanton O pentosil heksositol	$C_{27}H_{33}O_{17}^+$
Dihidroksi tetrametoksi ksanton O pentosil heksositol 1	$C_{28}H_{35}O_{17}^+$
Dihidroksi tetrametoksi ksanton 1	$C_{17}H_{17}O_8^+$
Trihidroksi trimetoksi ksanton 1	$C_{16}H_{15}O_8^+$
Trihidroksi monometoksi ksanton 1	$C_{14}H_{11}O_6^+$
Dihidroksi tetrametoksi ksanton O-heksositol	$C_{23}H_{27}O_{13}^+$
Monohidroksi trimetoksi ksanton 2	$C_{16}H_{15}O_6^+$
Dihidroksi trimetoksi ksanton O-pentosilheksositol	$C_{27}H_{33}O_{16}^+$
Dihidroksi trimetoksi ksanton 1	$C_{16}H_{15}O_7^+$
Monohidroksi pentamethoxy ksanton O-pentosilheksositol	$C_{29}H_{37}O_{17}^+$
Dihidroksi tetramethoxy ksanton O-pentosilheksositol2	$C_{28}H_{35}O_{17}^+$
Dihidroksi tetrametoksi ksanton 2 (Demethyleustomin)	$C_{17}H_{17}O_8^+$
Trihidroksi dimetoksi ksanton O- rhamnosylheksositol	$C_{27}H_{33}O_{16}^+$
Monohidroksi trimetoksi ksanton 3	$C_{16}H_{15}O_6^+$
Trihidroksi monometoksi ksanton 2	$C_{14}H_{11}O_6^+$
Trihidroksi monometoksi ksanton 3	$C_{14}H_{11}O_6^+$
Trihidroksi monometoksi ksanton 4	$C_{14}H_{11}O_6^+$
Dihidroksi metoksi ksanton	$C_{14}H_{11}O_5^+$
Dihidroksi tetrametoksi ksanton 3	$C_{17}H_{17}O_8^+$
Dihidroksi dimetoksi ksanton 2	$C_{15}H_{13}O_6^+$
Dihidroksi trimetoksi ksanton 2	$C_{16}H_{15}O_7^+$
Monohidroksi trimetoksi ksanton 4	$C_{16}H_{15}O_6^+$
Trihidroksi dimetoksi ksanton	$C_{15}H_{13}O_7^+$
Trihidroksi trimetoksi ksanton 2	$C_{16}H_{15}O_8^+$
Swertiamarin + CH_3COOH	$C_{18}H_{25}O_{12}^-$
Swerositol + CH_3COOH	$C_{18}H_{25}O_{11}^-$
Gentiopicroin + CH_3COOH	$C_{18}H_{23}O_{11}^-$

2.4. Kırmızı Kantaron Bitkisinin Farmakolojik Etkileri

Kırmızı kantaron bitkisi 23 farklı ülkenin farmakopesinde yer almaktadır. İçerdiği glikozit yapıları ve fenolik bileşenler bitkinin antipiretik (ateş düşürücü), sedatif, antibakteriyel, antioksidan, antidiyabetik, antienflamatuvar, antitümör, hipoglisemik ve hepatoprotektif ve diüretik etki göstermesini sağlar (Bouyahya ve diğerleri 2019; Božunović ve diğerleri 2018; Kachmar ve diğerleri 2019; Matekalo ve diğerleri 2018; Sefi ve diğerleri, 2011).

Tıbbi olarak faydaları aşağıda verilmiştir;

- Karaciğer sağlığını korur
- Mide sağlığını korur, ülserle karşı kullanılır
- Pankreas sağlığını korur
- Diyabete karşı savaşı
- İltihap ile savaşı
- Tümörlerle savaşı
- Kan basıncını düşürür
- Alerji ve astım rahatsızlıklarına karşı korur
- Romatizma tedavisinde yardımcıdır

Sinirleri yatıştırır (Bouyahya ve diğerleri, 2019; Božunović ve diğerleri, 2018; Dorđević ve diğerleri, 2017; Kachmar ve diğerleri 2019; Matekalo ve diğerleri, 2018; Sefi ve diğerleri, 2011).

2.5. Süperkritik Akışkan Özütlemesi

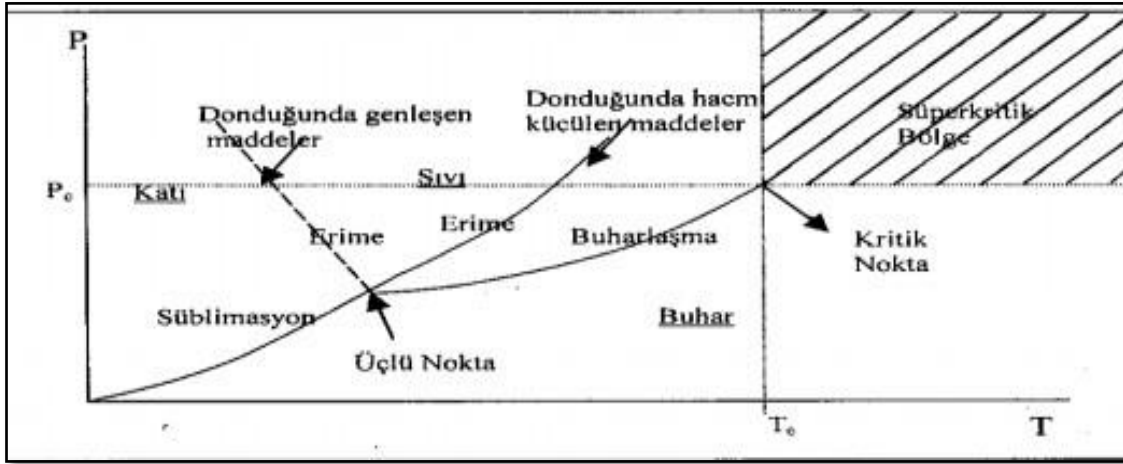
Süperkritik akışkan özütlemesi bir süperkritik çözücü akışkan yardımı ile ayrılmak istenen bileşenin bir başka fazdan veya matristen ayrılması olarak açıklanabilir (Ariff, Yusri, Razak, Jaapar, 2018).

Süperkritik akışkan teknolojisi, bir maddenin kritik noktası yakınındaki veya üzerindeki basınç ve sıcaklıklarda gerçekleştirilen prosesleri kapsar. Bir maddenin kritik sıcaklığı ve kritik basıncı, gaz ve sıvı fazların bir arada bulunabildiği en yüksek sıcaklık ve basınçtır. (Johner ve Meireles, 2016).

Süperkritik CO₂ özütlemesinde çözücü akışkan karbondioksittir. Süperkritik karbondioksitin güçlü fizikokimyasal özellikleri karbondioksiti bu proses için uygun kılar (Liu ve diğerleri, 2018). SC-CO₂ özütlemesi doğadaki bitkilerden etken madde eldesi için bilim dünyasına büyük kolaylık vaatetmektedir. 20. yüzyılın başlarında gelişen ilaç, gıda ve yakıt teknolojileri ile birlikte; bitkilerden SC-CO₂ özütlemesi ile özüt eldesi işlemi de popülerlik kazanmıştır. 20. yüzyılın ikinci yarısında ise yeni özütleme ürünleri ve yeni yapı malzemeleri üzerine çalışmaların artmasıyla SC-CO₂ özütlemesi metodu kullanımı hızlı bir artış kaydetti. 1970'lerin başında en popüler uygulamalardan birisi SC-CO₂ özütlemesiydi. Bu teknolojinin dünya çapında ilk ana uygulamaları, demleme endüstrisi için şerbetçiotu özlerinin üretilmesini ve kafeinin kahve çekirdeğinden ve çay yapraklarından çıkarılmasını içerir (Rój, 2014).

2.5.1. Süperkritik akışkan ve özellikleri

Bir akışkan kritik noktanın üzerindeki sıcaklık ve basınçta “Süperkritik akışkan” olarak adlandırılır. Süperkritik akışkanlar ilk olarak 19. yüzyılın başlarında keşfedildi, ancak bu terim o dönemde kullanılmadı ve tanımlamaları yapılmadı. Endüstriyel uygulamalar, daha sonra yapılan araştırma ve süperkritik akışkanlar hakkındaki bilginin genişletilmesi ile birlikte geldi. Özellikle süperkritik akışkan sistemlerindeki ısı ve kütle değişimiyle ilgili yoğun çalışmalar 20 yıldan fazla bir süredir yürütülmektedir. Süperkritik alanda, çözme gücü yoğunluğa bağlı olduğundan özütleme parametrelerindeki manipülasyonlarla normal çözücülere kıyasla çok ayrıntılı çözümler yaratırlar. (Rój, 2014; Pimentel-Moral ve diğerleri, 2019). Şekil 2.3.'de saf bir maddenin basınç-sıcaklık diyagramı verilmiştir.

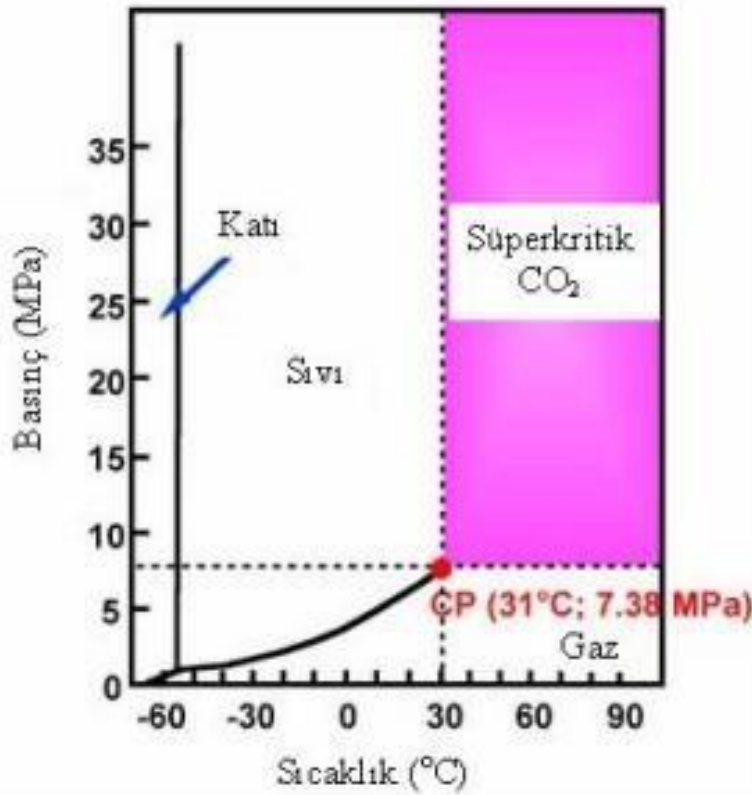


Şekil 2.3. Saf bir maddenin basınç-sıcaklık faz diyagramı

2.5.2. Süperkritik akışkanın seçimi

Süperkritik akışkanlar enzim katalizli reaksiyonlar için sulu olmayan çözücüler olarak sayısız avantajlarından dolayı 1980'lerden beri enzimologların dikkatini çekmiş ve çeşitli biyoteknolojik çalışmalarda kullanılmıştır. Bu bağlamda süperkritik akışkanın özellikleri de prosesin yönlendirilmesi açısından büyük önem taşır. 21. Yüzyıl bilim dünyasında akışkanın öncelikli olarak toksik, yanıcı ya da patlayıcı olmaması, mümkünse çevre dostu olması aranan özelliklerindendir. Çözme gücünün iyi olması, ucuz olması, kolay bulunabilirliği de süperkritik akışkan için aranan özelliklerdendir (Barzotto ve diğerleri, 2019; Budisa ve; Parhi ve Suresh, 2015; Pimentel-Moral ve diğerleri, 2019; Schulze-Makuch, 2014).

Karbondiyoksit ise 'yeşil' özelliğinin yanı sıra ucuz olması, tehlikesiz olması, çözücülerden kolayca ayrışabilmesi gibi özellikleri sayesinde en rağbet gören süperkritik akışkanlardandır, ayrıca CO₂'in kritik sıcaklığı ($T_c=31^\circ\text{C}$) ve kritik basıncı ($P_c=73,8$ bar) oldukça düşüktür (Barzotto ve diğerleri 2019) (Şekil 2.4.). CO₂'nin polar özeliği, zayıf polaritedeki çözücüler gibidir (Nuralın, 2018). Bu sebeple SC-CO₂ apolar çözücüler grubuna girmektedir. SC-CO₂ üstün çözünürlük, yayınlılık, çözme gücü ve iletim kabiliyeti onu süperkritik özütleme prosesi için çok uygun bir akışkan haline getirmiştir (Liu ve diğerleri, 2018). Şekil 2.4.' de CO₂ basınç-sıcaklık diyagramı verilmiştir.



Şekil 2.4. CO₂ basınç-sıcaklık diyagramı (Tuna, 2006)

2.5.3. Süperkritik akışkan özütlemesinin avantajları

Süperkritik akışkan özütlemesinin, mikrodalga destekli özütlemesi, mekanik özütleme, ultrasound destekli özütleme gibi diğer yeşil özütleme metodlarına göre çok çeşitli avantajları bulunmaktadır. Bunlardan bazıları;

- Hızlı özütleme
- Çözücü kalıntısı olmadan temiz özüt eldesi
- Basıncın ve sıcaklığın indirilmesini müteakiben akışkan maddenin özütten zorlanmaksızın uzaklaştırılabilmesi
- Kosolventli veya kosolventsiz çalışabilme kolaylığı
- Seçici özütleme olanağı
- Bir kere temin edildikten sonra ucuz ve kolay çalıştırma olanağı termal olarak kararsız bileşenlerin korunması olarak sıralanabilir (Khaw ve diğerleri, 2017; Sür, 2017)

2.5.4. Süperkritik akışkan özütlemesinin dezavantajları

Her proseste olduğu gibi süperkritik akışkan özütlemesinde de dezavantajlar mevcuttur, bunlar;

- Başlangıç için cihazların pahalı olması
- Henüz sisteme hâkim yeterli sayıda kalifiye eleman olmaması
- Yüksek basınçlarda çalışıldığında işletme maliyetinin artması
- Kullanılan cihazların oldukça hassas ve dikkat gerektiren cihazlar olması (Khaw ve diğerleri, 2017)

2.6. Süperkritik Akışkan Özütlemesinde Kosolvent Kullanımı

Kosolvent (yardımcı çözücü) kelime anlamı olarak ‘birlikte çözmek’ olarak ifade edilebilir. Bir proseste çözünürlüğü veya verimi artırmak ya da ana çözücünün seçiciliğini değiştirmek için kullanılan ek çözücü kosolventtir. Modifiye edici veya sürükleyici olarak da görev alır. Çözücü paçallanması olarak da ifade edilebilir. Daha çok etanol ve metanol gibi kısa zincirli alkoller tercih edilir (Tirado ve Calvo, 2018). Bunlara ek olarak asetonitril, aseton, su, etil eter ve diklorometan da tercih edilen polar kosolventlerdendir (Salleh ve diğerleri, 2013). Süperkritik CO₂ apolar bir çözücü olduğundan gerektiğinde polariteyi artırmak özütleme verimini artırabilir, bu durumda polar çözücüler olarak kosolventler devreye girer. Kosolventler hidrojen bağları gibi kimyasal güçleri kuvvetlendirerek, ayrışma faktörünü artırarak ya da fiziksel etkileşimi artırarak çözünürlüğü ve dolayısı ile de özütleme işleminin verimini artırabilirler (Tonato ve diğerleri, 2019; Tirado ve Calvo, 2019). Ayrıca daha düşük basınçta ve daha az süperkritik çözücü ile çalışma olanağı sunduğu için ekonomik bakımdan sisteme katkı sağlar (Tirado ve Calvo, 2019).

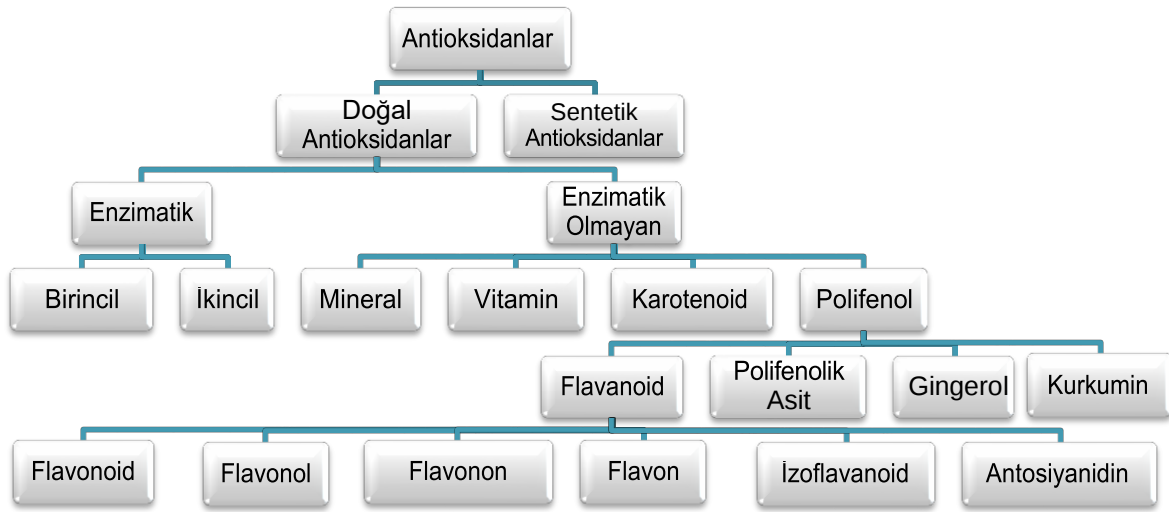
Süperkritik özütlemelerde kosolvent olarak etanol kullanımı, etanolün toksik olmaması nedeniyle oldukça uygundur (Pimentel- Moral ve diğerleri 2019; Salleh ve diğerleri, 2013).

2.7. Antioksidan Maddeler ve Fenolik Bileşenler

Radyasyon, hava ve su kirliliği, UV ışınları, sigara kullanımı, aşırı stres, tüketilen besinlerin kalitesizleşmesi gibi nedenlerle başta kanser olmak üzere pek çok hastalık günümüzde yaygınlaşmıştır. Bu durumla birlikte antioksidan maddelerin de önemi artmıştır. Kimyada, “antioksidan” basitçe “reaktif türleri yok eden bileşik” olarak tanımlanmaktadır. Aerobik hücreler, metabolik bir proses yan ürünü olarak reaktif oksijen türlerini (ROS) üretir (Salehi ve diğerleri 2018). Hücresel metabolizma sırasında oluşan hidroksil radikali, süperoksit radikali ve hidrojen peroksit gibi maddeler reaktif oksijen türleri (ROS) olarak ifade edilir (Özcan ve diğerleri, 2016).

Normal şartlar altında canlı metabolizması sağlıklı iken antioksidanlar ile serbest radikaller denge halindedir (Karabulut ve Gülay,2016). Vücutta antioksidanlar ile serbest radikaller arasındaki denge serbest radikaller lehine kayarsa oksidatif stres adı verilen sorun oluşur. Terimsel olarak oksidatif stres zararlı serbest radikal zincirlerinin kontrolsüz çoğalması anlamına gelir. Serbest radikaller yani oksidatif stres hücre membranlarına, proteinlere ve nükleik asitlere zarar vermekle başlayarak çoklu organ yetmezliği ve kanser dahil olmak üzere pek çok hastalığa sebep olurlar (Nugent, 2019).

İnsan vücudunun serbest radikaller tarafından oluşturulabilecek oksidatif stresi ortadan kaldırmak için en önemli silahı antioksidanlardır, zira antioksidanlar serbest radikalleri temizleyebilen ve hücre hasarını engelleyebilen maddelerdir (Karabulut ve Gülay, 2016) ve oksidasyon sürecinin bir inhibitörüdürler (Yadav ve diğerleri, 2016). Şekil 2.5.’de antioksidanların sınıflandırılması görülmektedir.



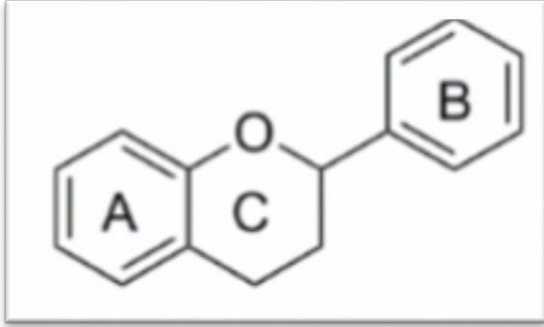
Şekil 2.5. Antioksidan bileşenlerin sınıflandırılması (Pal, Misra, Dhillon, Verma, 2014)

Fenolik bileşikler, bir aromatik halkaya bağlı fonksiyonel türevleri de dahil olmak üzere bir veya birden fazla hidroksil grubu içeren maddelerdir (Güleşçi ve Aygül, 2016). ‘Fenolik bileşikler’, ‘fenolikler’ veya ‘polifenoller’ olarak adlandırılırlar ve bitki krallığında 4000’den fazla çeşit ile temsil edilirler. Yapıya dahil olma, büyüme kontrolü ve renk verme gibi önemli görevleri vardır (Bhuyan ve Basu, 2017). Fenolik bileşenler en aktif doğal antioksidanlardan olup, antioksidan etkilerini serbest radikalleri bağlama, metallerle şelatları oluşturmaları ve lipoksijenaz enzimini inhibe etmeleri ile gerçekleştirirler (Güleşçi ve Aygül, 2016).

Fenolik bileşenler canlı insan ve hayvan vücudunda antimikrobiyal, antienflamatuvar, antitümoral ve hepatoprotektif etki gösterirler ve kardiyovasküler hastalıklar, kanser, osteoporoz, diyabet ve nörodejeneratif hastalıklarda koruyucudurlar. Antioksidan etkinlikleri ise hidroksil gruplarının yerine ve pozisyonuna göre şekillenir (Caleja ve diğerleri, 2017; Kolaç, 2017).

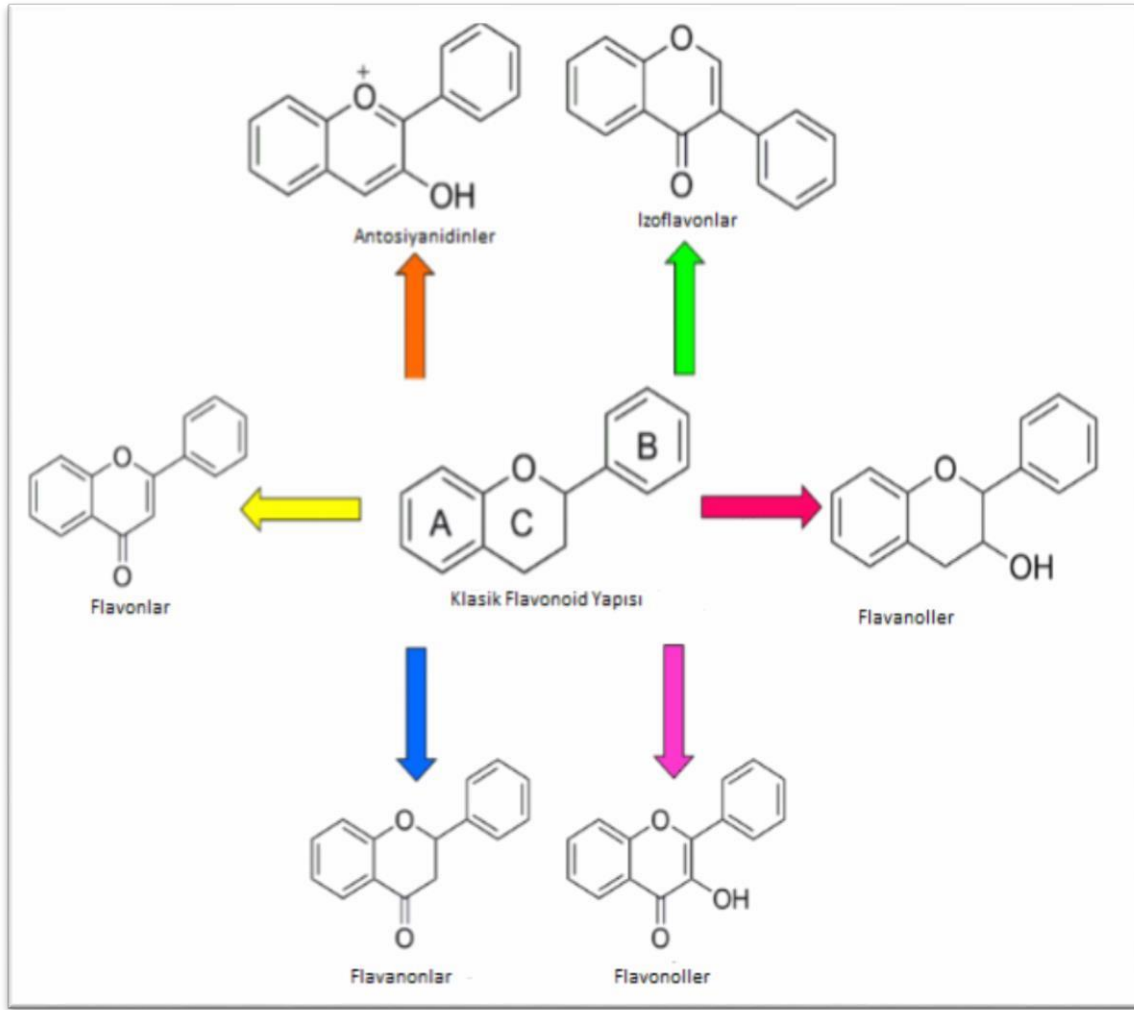
Şekil 2.6. ‘da görüleceği üzere heterosiklik halka şeklinde olan C halkasında meydana gelen değişimler flavanoidleri en yaygınları flavonol ve flavonlar olmak üzere; flavonoller, flavonlar, flavanonlar, flavanoller (veya kateşinler), izoflavon, flavanonoller ve antosiyanidinler olarak ana bileşik gruplarına ayırır. Flavanoidler, C₆-C₃-C₆ konfigürasyonda düzenlenmiş on beş karbon atomunu kapsayan, düşük molekül ağırlıklı

bileşiklerdir. Şekil 2.6.' da flavonoidlerin genel kimyasal yapısı ve Şekil 2.7.' de flavonoid çeşitlerinin kimyasal yapıları görülmektedir (Pal ve diğerleri 2014; Kolaç, 2017).



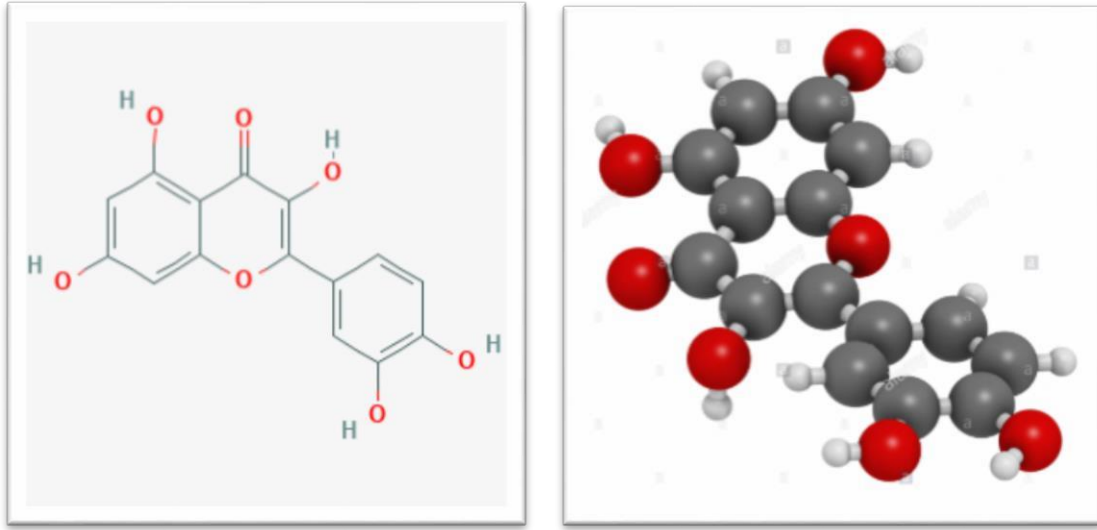
Şekil 2.6. Flavonoid kimyasal yapısı (Li , Zhang, Chen, 2018)

Doğada bitkilerin yapısında bulunan flavonoidlerden özellikle kuersetin, kaemferol, mirisetin, apigenin, luteolin, isorhamnetin, kafeik asit ve p-kumarik asit en çok araştırma konusu olmuş bileşenlerdir (Caleja ve diğerleri, 2017). Şekil 2.7.'de flavonoid çeşitlerinin kimyasal yapısı verilmiştir.



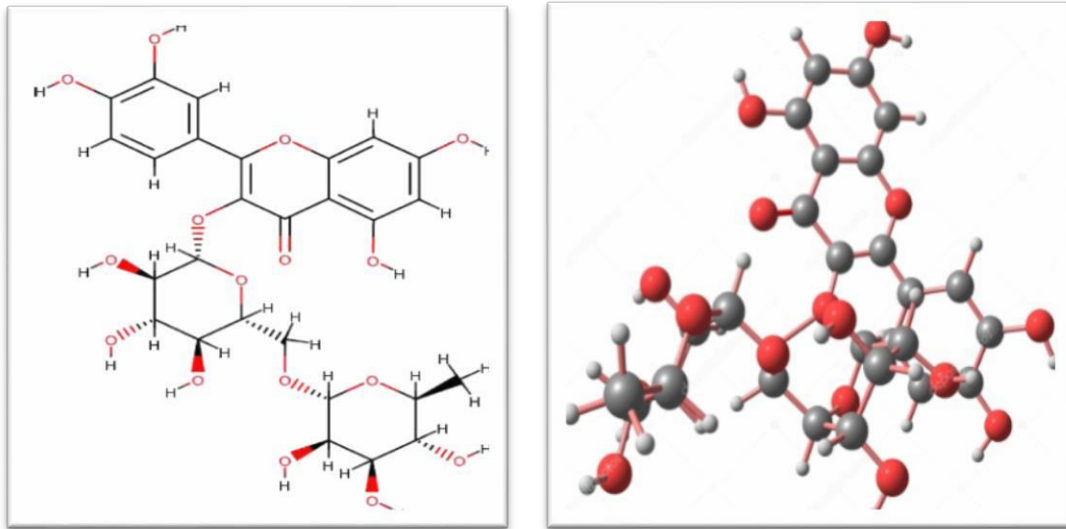
Şekil 2.7. Flavonoid çeşitlerinin kimyasal yapısı (Li ve diğerleri, 2018).

Flavanoidlerin flavonol sınıfının en önemli, üyelerinden kuersetin (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavanone) meyve ve sebzelerde bulunan, suda çözünmeyen bir renk pigmenti olup; insan vücudunda sentezlenemez (Kumar, Vijayalakshmi, Nadanasabapathi, 2017). Antikarsinojenik, antienflamatuvar, antiviral özellikleri mevcuttur (Li ve diğerleri 2017). Ayrıca Caleja ve arkadaşlarına (2017) göre insan hücreleri üzerinde yapılan in vitro çalışmalarda mide kanseri, karaciğer kanseri, lösemi, akciğer kanseri ve prostat kanseri üzerinde antitümoral etki göstermiştir (Caleja ve diğerleri, 2017). Şekil 2.8.'de kuersetinin kimyasal yapısı verilmiştir.



Şekil 2.8. Kuersetinin kimyasal yapısı (Kumar ve diğerleri, 2017)

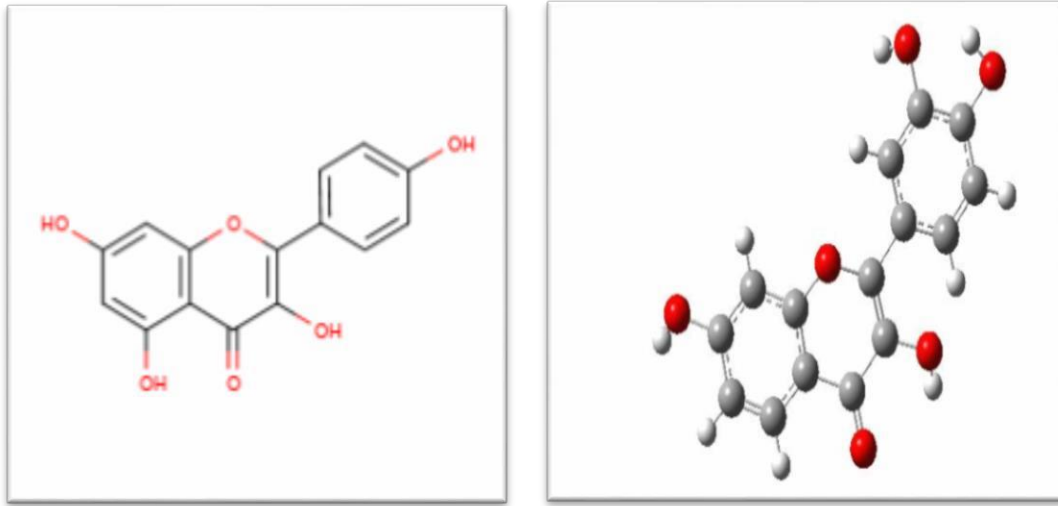
Rutin (3,30,40,5,7-pentahidroksi flavone-3-rhamnoglucosit) de flavonoidlerin flavonol grubunda bulunmaktadır. Antioksidan, sitoprotektif, vazoprotektif, antikarsinojenik, nöroprotektif ve kardiyoprotektif özellikleri mevcuttur (Ganeshpurkar ve Saliya, 2016). Şekil 2.9.'da rutin kimyasal yapısı verilmiştir.



Şekil 2.9. Rutinin kimyasal yapısı (Ganeshpurkar ve Saliya, 2016)

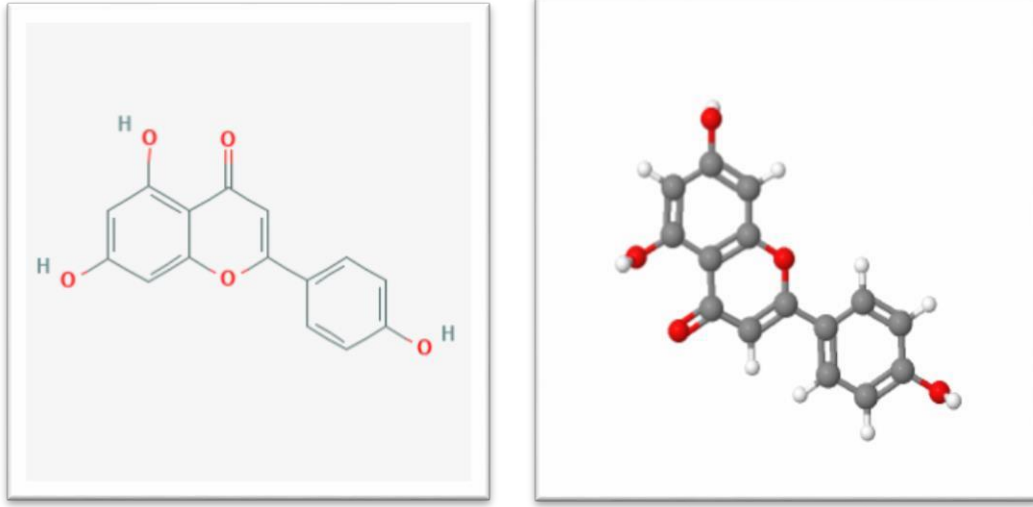
Kaemferol (3,5,7-trihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one) flavonoidinin ise antioksidan, antienflamatuvar ve antikanser etkileri mevcuttur. Chandramohan ve arkadaşlarına göre kalp rahatsızlıklarına bağlı ölüm riskini azaltmaktadır. Ayrıca yapılan in

vitro çalışmalarda hiperglisemi üzerinde olumlu etkisi olduğu tespit edilmiştir, bu etkisini de pankreas beta hücreleri üzerindeki oksidatif stresi baskılaması sayesinde oluşturduğu belirtilmiştir (Chandramohan ve diğerleri, 2015). Caleja ve arkadaşlarının (2017) yapmış olduğu çalışmaya göre kaemferol; insan hücreleri üzerinde yapılan in vitro çalışmalarda karaciğer kanseri, pankreas kanseri, meme kanseri ve yumurtalık kanseri hücreleri üzerinde antikanser etki göstermiştir (Caleja ve diğerleri, 2017). Şekil 2.10.'da Kaemferolün kimyasal yapısı verilmiştir.



Şekil 2.10. Kaemferolün kimyasal yapısı (Chandramohan ve diğerleri, 2015)

Apigenin (5,7-Dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4H-chromen-4-one) meyve ve sebzelerde bulunan doğal bir flavonoiddir. Antioksidan, antienflamatuvar ve antikanser özellikleri mevcuttur. 1980 lerde antimutajenik özellikleri ile tanınmaya başladığından beri antikanser etkinliği üzerinde önemli in vitro ve in vivo çalışmalara konu olmaktadır (Madunic ve diğerleri, 2018). Şekil 2.11.'de apigenin kimyasal yapısı verilmiştir.



Şekil 2.11. Apigenin kimyasal yapısı (Madunic ve diğerleri, 2018)

3. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

Literatür araştırması kısmı iki ana başlıktan oluşmaktadır;

- Kırmızı kantaron bitkisinin yapısında bulundurduğu bileşenler ve tıbbi etkileri üzerine yapılmış çalışmalar

-Süperkritik karbondioksit özütlemesi üzerine yapılmış çalışmalar

3.1. Kırmızı Kantaron Bitkisinin Yapısında Bulundurduğu Bileşenler ve Tıbbi Etkileri Üzerine Yapılmış Çalışmalar

Aşağıdaki çalışmalar kırmızı kantaron bitkisinin tıbbi önemini vurgulamak adına ve özellikle son yıllarda kullanılan özütleme ve analiz metotlarının aydınlatılması açısından özetlenmiştir.

Kachmar ve arkadaşlarının 2019 yılında yapmış oldukları çalışmaya göre kırmızı kantaron sulu sıvı faz özütü; başta kuersetin, kaempferol, p-kumarik asit, ferülik asit ve sinapik asit; ayrıca kuersetin, rutin ve kaemferolün farklı kompleks bileşikler olmak üzere pek çok fenolik bileşen içermektedir. Sulu sıvı faz özütün hazırlanması 3 gram toz bitkinin 500 mL distile suda 30 dakika boyunca kaynatılması, ardından 4000 rpm hızla 5 dakika boyunca santrifüjlenip daha sonra filtreleneceği ve filtre üstü kısmın dondurularak liyofilizasyonu ile elde edilmiştir. Liyofilize özüt kısmı analize kadar desikatörde ve karanlıkta tutulmuştur. Bitkinin fenolik profil karakterizasyonu (HPLC–DAD–ESI/MSⁿ) cihazı ile yapılmıştır. Ayrıca in vitro antioksidan ve antienflamatuar karakter analizleri hücresel ve hücresel olmayan spektrofotometrik mikro analizler ile değerlendirilmiştir Ayrıca sulu sıvı faz özütünün süperoksit anyonunu, hidroksil radikallerini, hipokloröz asidi temizleme etkisi ve ksantin oksidazı inhibe etme gücü olduğu tespit edilmiştir. Antioksidan ve antienflamatuar özellikleri olduğu belirtilmiştir.

Bouyahya ve arkadaşları 2019 yılında yapmış oldukları çalışmada kırmızı kantaron bitkisinin vejetatif, çiçeklenme ve çiçeklenme sonrası aşamalarındaki uçucu yağlarında in vitro olarak antioksidan, antidiyabetik, dermoprotektif ve antibakteriyel karakterlerini incelemişlerdir. Yağ eldesi hidrodistilasyon yöntemi ile yapılmıştır. Kırmızı kantaron bitkisinin GC/MS ile karakterizasyonu yapılan uçucu yağında 39 adet uçucu bileşen tespit edilmiştir. Bulundurduğu monoterpenler 51,63 %, 44,10% ve 53,69% oranları sırası ile vejetatif, çiçeklenme ve çiçeklenme sonrası aşamalarında tespit edilmiştir. Uçucu yağda mentol, karvakrol ve trikosan bileşiklerinin başrolde bulunduğu bildirilmiştir. Antioksidan aktiviteler ise DPPH, FRAP ve ABTS metotları ile tespit edilmiştir. Üç aşama için de antibakteriyel etkinin oldukça yüksek olduğu; ancak en yüksek antioksidan etkinin ve dermoprotektif etkinin ise çiçeklenme aşamasında olduğu bildirilmiştir. Antidiyabetik etkinin ise vejetatif aşamada en çok tespit edildiği bildirilmiştir.

Božunović ve arkadaşlarının 2018 yılında yapmış oldukları çalışmada amaç kırmızı kantaron hidrolize- metanollü ve hidrolize olmayan- metanollü özütlerinin metabolomik ve biyolojik karakterleri araştırılmıştır. Hidrolize- metanollü özüt eldesi için 100 mg bitki 1mL metanolle muamele edilmiş, oda sıcaklığında 10 dakika kadar sonikasyon cihazında tutulmuş, ardından 10 dakikalık bir santrifüj işlemine tabi tutulmuştur ve filtreden süzölmüştür, filtre üztü kısım liyofilize edilerek özüt elde edilmiştir. FRAP ve DPPH metodları ile toplam antioksidan aktivite bakılmıştır, 8 bakteri üzerinde antibakteriyel etki araştırılmıştır ve Espinel- İngroff metodu ile antifungal aktivite tespit edilmiştir.

Yine Bouyahya ve arkadaşlarının 2018 de yapmış olduğu bir çalışmada *Origanum compactum* Benth., *Cistus crispus* L., *Centaurium erythraea* Rafin., *Myrtus communis* L. ve *Arbutus unedo* L. bitkilerinin metanollü, etanollü ve n- hekzanlı özütlerinin toplam fenolik madde, toplam antioksidan madde, farmakolojik seçicilik indeksi karşılaştırmaları yapılmıştır. Kırmızı kantaron çiçeklerinin özütleri yukarıda sayılan özellikler açısından diğer rakipleri arasında dördüncü en iyi olurken, özütlerin cilt hastalıkları tedavisinde antibakteriyel, antioksidan ve antileişmanyal (*bir cilt hastalığına karşı tedavi edici özellik*) özellik gösterdiği çalışmada bildirilmiştir. Ayrıca kırmızı kantaron çiçeklerinin metanol, etanol ve n-hekzanlı özütler içerisinde en yüksek toplam fenolik madde içeriği bakımından

metnol ile özütlenme en iyi sonucu verirken; toplam antioksidan madde içeriği göstermesi açısından n-hekzan ile özütlenme daha iyi sonuçlar vermiştir.

Banjanac ve arkadaşları 2017 yılında yapmış oldukları çalışmada Gentianaceae *Centaurium erythraea* (kırmızı kantaron), *Centaurium littorale* ve *Centaurium pannonicum* bitkilerinin metanollü özütlerinin bileşen analizlerini yapmışlardır. Özütlenme işlemleri için üç bitki de kurutulup 100 mg kadar alınıp 5 mL %99,8 lik metanolde oda sıcaklığında gece boyunca özütlenme işlemi gerçekleştirilmiştir. Sonikasyon işleminden sonra 15 dakika boyunca santrifüjlme işlemi yapılmış ardından filtre ile süzme işlemi yapılmıştır. Filtre üstü kısım alınıp kullanılana kadar 4°C’de muhafaza edilmiştir. Üç tür için de sekoiridoid glikozitlerinden Swertiamarin, Gentiopirin, Sweroside yapılarından ve flavonoid olarak da luteolin, naringenin, apigenin, kaemferol, kuersetin, galangin varlığından bahsedilmiştir. *Centaurium erythraea* için ise ayrıntılı bileşen listesi çizelge 2.2. de verilmiştir.

Dorđević ve arkadaşları 2017 yılında yaptıkları çalışmada kırmızı kantaron bitkisinin çiçeklerinin metanolik özütlerinin, farelerde oksidatif strese bağlı gelişen diyabet üzerindeki etkisinin kırmızı kan hücrelerine yansımaları incelemişlerdir. Bitkinin çiçek kısımları kurutulduktan sonra 96% metanolde oda sıcaklığında bir gece bekletilmiştir (w: v=1:5). Ertesi gün 20 dakikalık bir sanitasyon işleminden sonra filtre edilip liyofilize edilerek özüt elde edilmiştir. Folin-Ciocalteu metoduna göre toplam fenolik karakterizasyonu yapılmış ve $25,13 \pm 0,45$ mg gallik asit/g bulunmuştur, DPPH metoduna göre toplam antioksidan madde tayini yapılmıştır ve ardından toplam flavonoid içeriği incelenip $67,86 \pm 2,10$ mg kuersetin / g kuru özüt olarak bulunmuştur. Rutin miktarı $0,0658 \pm 0,0046$ mg/g kuru özüt, kuersetin miktarı $0,0040 \pm 0,0001$ mg/g kuru özüt, kaemferol miktarı ise $0,0006 \pm 0,0001$ mg/g kuru özüt olarak belirtilmiştir. Kalitatif analizler UHPLC cihazı ile yapılmıştır. Sonuç olarak *Erythraea Centaurium* bitkisi özütünün diyabetli farelerin kan değerleri üzerinde kayda değer olumlu etkileri görüldüğü ve bu bitkinin diyabet rahatsızlığı tedavisinde kullanılması çalışmalarının denenmeye değer olduğu belirtilmiştir.

Stoyko ve Pokotilo 2017 de yapmış oldukları çalışmada kırmızı kantaron bitkisinin yapısındaki polisakkarit ve monosakkarit yapılarının tespitini GS-MS cihazı kullanarak yapmışlardır. Özütlenme işlemi için 500 mg çiçek alınıp 5 mL 2M trifluoroasetik asit

eklenerek özütleme işlemi yapılmıştır. Laksatif, antienflamatuvar, antiülser, antiviral etkileri olan polisakkarit ve monosakkaritlerden, rhamnoz, arabinoz, manoz, glikoz, galaktoz, pinitol, inositol, l-iditol, mannitol, sorbitol, früktoz ve sakkaroz varlığı tespit edilmiştir.

Jerković ve arkadaşlarına (2012) göre kırmızı kantaron bitkisinin hidrodistilasyon ile elde edilmiş uçucu yağı *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus* ve *Bacillus cereuse* karşı antimikrobiyal etki gösterirken; *Pseudomonas fluorescens* ve *Listeria monocytogenes* karşı da antibakteriyel etki gösterir.

3.2. Süperkritik Akışkan Özütlemesi Üzerine Yapılmış Çalışmalar

Bu bölümde ‘temiz’sloganıyla dikkat çeken ayırma metodu olan süperkritik akışkan özütlemesinin özellikle son yıllarda ne gibi alanlarda ne amaçlarla ve ne sonuçlarla kullanıldığının anlatılması açısından çeşitli çalışmalar özetlenmiştir.

Kavoura, Kyriakopoulou, Papaefstathiou, Spanidi, Gardikis, Loulia ve Magoulas’ın 2019 yılında yapmış olduğu çalışmada Yunan Adaçayı olarak bilinen *Salvia Fruticosa* bitkisinden süperkritik karbondioksit özütlemesi ile özüt elde edilmiştir. Değişken parametreler olarak basınç, sıcaklık ve çözücü akış hızının özüt verimi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Ayrıca çalışmada özüt veriminin karşılaştırılması için hidrodistilasyon metodu ile de yağ eldesi elde edilmiştir. Sıcaklık 40°C- 60°C arasında değişirken, basınç 100 bar- 280 bar arasında değişmiş ve CO₂ akış hızı 1 kg/h – 3 kg/h arasında değiştirilerek çalışılmıştır. Parçacık büyüklükleri ise 200 µm de sabit tutulmuştur. Design Expert 11.1.2.0 Trial programı kullanılarak deneysel model oluşturulmuştur. Özütlerin analizleri GC-MS ile yapılmıştır. Süperkritik karbondioksit özütlemesinin özüt verimi üzerindeki etkisinin, hidrodistilasyona nazaran daha yüksek olduğu sonucu verilmiştir. Basınç arttıkça özüt veriminin de arttığı gözlenmiştir, ayrıca sıcaklığın özüt verimi üzerindeki etkisinin de basınca bağlı olduğu belirtilmiştir. Maksimum özüt verimi 280 bar ve 60°C de gözlenmiştir. ANOVA’ ya göre özüt veriminde en önemli faktör özütleme basıncıdır.

Pimentel-Moral ve arkadaşlarının 2019 yılında yapmış olduğu çalışmada *Hibiscus sabdariffa* bitkisinin ‘yeşil özütleme tekniği’ süperkritik akışkan özütlemesi metodu ile özütleme işlemi yapılmış; sıcaklık, basınç ve kosolvent akış yüzdeleri değişken parametreler olarak Response Surface Methodology (RSM) (Yüzey cevap yöntemi) ile incelenmiştir. Kosolvent olarak etanol kullanılmıştır. Sıcaklık 40°C- 60°C arasında değişirken, basınç 150 bar- 391 bar arasında değişmiştir. Özüt analizleri ise HPLC-ESI-TOF-MS cihazında yapılmıştır. Tasarım, toplam fenolik madde ve organik asit miktarlarını belirleme olanağı sunmuştur. Tasarımda organik asit miktarı düzensiz bir trend çizerken; toplam fenolik madde miktarı kuadratik bir trend çizmiştir. 60°C sıcaklık, 350 bar basınç ve %15 ko-solvent akış oranı en uygun özütleme şartları olarak belirtilmiştir.

Barzotto ve arkadaşları 2019 yılında yapmış oldukları çalışmada *Eugenia involucrata* bitkisi yapraklarından süperkritik CO₂ özütlemesi metodu ile özütleme yapılmıştır. 150 bar, 175 bar ve 200 bar basınçlarında; 40 °C, 50 °C, 60 °C sıcaklıklarında ve 2 mL/min, 3 mL/min ve 4 mL/ min CO₂ akış hızları ile çalışılmıştır. Bir antioksidan olan alfa tokoferol maddesi tespiti ve antioksidan aktivitesi araştırılmıştır. Karşılaştırma olması açısından dastandart metod olarak Soxhlet özütlemesi metodu kullanılmıştır. Soxhlet özütlemesinde çözücü olarak n-hekzan kullanılmıştır. Karbondioksit gibi apolar bir çözücü olan n-hekzanın kullanımındaki amaç iki çözücünün özüt verimi anlamında karşılaştırılmasıdır. En yüksek verim ağırlıkça %1,73 olarak 200 bar, 40 °C ve 4 mL/min CO₂ şartlarında tespit edilmiştir. Özütleme kinetiği ise Sovova matematik modeli kullanılarak yorumlanmıştır. Özüt karakterizasyonları GC-MS ve FTIR cihazları kullanılarak yapılmıştır. Alfa tokoferol tespitinde UV-VIS Spektrofotometre kullanılırken, antioksidan aktivite tayininde ise DPPH metodundan yararlanılmıştır. Özüt verimini en çok etkileyen parametrenin basınç olduğu belirtilmiştir. Özüt verimi açısından karşılaştırıldığında en yüksekverimi n-hekzanlı soxhlet metodu vermiştir; ancak alfa tokoferol miktarı ve antioksdian aktivite olarak karşılaştırıldığında süperkritik CO₂ özütlemesi; n-hekzanlı soxhlet metodundan daha yüksek sonuçlar vermiştir.

Araus ve arkadaşları 2019 yılında yapmış oldukları çalışmada *Tagetes erecta* L. çiçeklerinden lutein özütlenmesinde, lutein maddesinin süper kritik karbondioksitte

çözünürlüğüne etanol olarak kosolventin etkisini incelemişlerdir. Sonuç olarak kosolvent kullanımının çözünürlüğü artırdığı bildirilmiştir.

2019 yılında Tirado ve Calvo yapmış oldukları çalışmada süperkritik CO₂ özütlemesi metodu ile *Dunaliella salina* bitkisinden beta karoten eldesinde çeşitli kosolventlerin etkisi incelemiş ve Hansen çözünürlük teoremini kullanarak bu proses için en uygun kosolventi belirlemeye çalışmışlardır. Bunun için kosolvent olarak etanol, metanol, aseton ve hekzan kullanmışlardır. Bu bitki ve bu etken madde için en yüksek özüt verimini sağlayan koşulların etanol kosolventi varlığında 20 MPa basınç ve 318,15 K sıcaklık olduğu bildirilmiştir.

Ara ve Raofie (2016) yapmış oldukları çalışmada nar meyvesi kabuğundan süperkritik CO₂ özütlemesi metodu ile özüt elde etmişlerdir. Standart metot olarak hidrodistilasyon ile özüt verimi karşılaştırması yapmışlardır. Bu bağlamda süperkritik özütlemeye özüt veriminde basınç, sıcaklık, özütleme süresi ve hacimsel olarak kosolvent parametrelerinin etkileri Design Expert 7.0.0 Trial yardımıyla incelenmiştir. Özütlerin analizleri GC-MS ile yapılmıştır. Optimum SC-CO₂ koşulları 55 °C, 350 atm, 30 min özütleme süresi ve 150 µL metanol olarak belirtilmiştir. Bu çalışma için SC-CO₂ özütlemesinde uçucu yağ veriminde en etkili parametreler sırası ile basınç, özütleme süresi, kosolvent miktarı ve sıcaklık olarak belirtilmiştir.

Çizelge 3.1.'de tez çalışmasına paralel, özellikle Yüzey Yanıt Yöntemi, SC-CO₂ özütlemesi konularında yapılmış olan örnek çalışmalara yer verilmiştir.

Çizelge 3.1. Tez çalışmasına benzer çalışmaların incelenmesi

Çalışma Bilgileri	Çalışılan Bitki	Deneysel Tasarım Metodu	Özütleme Metodu	Standart Özütleme Metot	Değişken Parametreler	Sabit Parametreler	Analiz Metodu	Analiz Edilen Bileşen	Optimum Koşullar
Bala ve diğerleri, 2016	Ayçiçek tohumları	-Design Expert 8.0.2 --RSM(YYM)	SC-CO ₂	Soxhlet (n-hekzan ile)	-P(bar) -T(°C) -t(min)	-Partikül büyüklüğü	GLC	-Palmitik asit -Stearik asit -Oleik asit -Linoleik asit	-P(bar)= 450 -T(°C)= 65 -t(min)= 75 -SC-CO ₂ özütleme
Ara ve Raofie, 2016	Nar meyvesi kabuğu	-Design Expert Trial 7.0.0 --RSM (YYM) ---Central Composite Design	SC-CO ₂	Hidrodistilasyon	-P(bar) -T(°C) -t(min) -Kosolvent hacimsel miktar (µL)	-Partikül büyüklüğü	GC-MS	-Oleik asit -Palmitik asit -Borneol	-P(atm)= 350 -T(°C)= 55 -t(min)= 30 -Kosolvent (µL)= 150 EtOH -SC-CO ₂ özütleme
Salleh ve diğerleri 2013	Strobilanthes crispus yaprakları	-Design Expert Trial V6 --RSM (YYM) ---Box Behnken Design (BBD)	SC-CO ₂	--	-P(bar) -T(°C) -Kosolvent akış hızı (g/min)	-t(min) -Partikül büyüklüğü	HPLC	-Katesin -Rutin -Mirisetin -Luteolin -Apigenin -Naringenin -Kaempferol	-P(bar)= 200 -T(°C)= 50 -t(min)= 90 -Kosolvent (g/min)= 5 EtOH -SC-CO ₂ özütleme
Özkal, 2009	Keten Tohumu	-Design Expert Trial --RSM (YYM) ---Box Behnken Design (BBD)	SC-CO ₂	Soxhlet (n-hekzan ile)	-P(bar) -T(°C) -CO ₂ akış hızı -Partikül büyüklüğü	-t (min)	Gravimetrik	-Özüt Miktarı	P(bar)= 500 -T(°C)= 70 -t(min)= 15 -CO ₂ akış hızı (g/min)=4 -Partikül büyüklüğü (nm) <0,850 -SC-CO ₂ özütleme

Çizelge 3.1. (devam) Tez çalışmasına benzer çalışmaların incelenmesi

Jiao ve diğerleri, 2008	Keten tohumu	-Design Expert Trial --RSM (YYM)	SC-CO ₂	-	-P(bar) -T(°C) -CO ₂ akış hızı	-t (min) -Partikül büyüklüğü	Gravimetrik Miktar	-Özüt -T(°C)= 56 -t(min)= 180 -CO ₂ akış hızı(L/min)=0,516 -Partikül büyüklüğü (nm)=0,45- 0,90 -SC-CO ₂ özütlemesi
Bınakır ve ark, 2011	Mentha spicata L. (Kıvrıcık nane)	-Design Expert Trial --RSM (YYM)	SC-CO ₂	-	-P(bar) -T(°C) -Kosolvent akış hızı (g/min)	-t (min) -Partikül büyüklüğü	HPLC	-P(bar)= 209,31 -T(°C)= 50 -t(min)= 90 -Kosolvent (mL/min)= 9,4 EtOH -SC-CO ₂ özütlemesi Partikül büyüklüğü (nm)=2

4. MATERYAL VE METOD

4.1. Kullanılan Materyaller



Kullanılan Cihazlar

- Süperkritik özütleme cihazı- Applied Seperation marka
- HPLC cihazı- Dionex marka UV dedektörlü HPLC cihazı ve bilgisayarı
- HPLC Kolonu 250*4,6 mm*5µ / İnertsil marka
- UV-VIS Spekrtofotometre- PG Instrument UK marka T80+
- Bitki değirmeni- Retsch marka bitki değirmeni
- Elek seti
- Hammadde-Kırmızı kantaron bitkisi çiçek kısmı
- Soxhlet analizi için- Cam soxhlet deney düzeneği



Kullanılan Kimyasallar

- Özütleyci süperkritik çözücü- Karbondioksit (%99,9 saflıkta)
- UV Spektrofotometresinde kullanılan standart maddeler- DPPH (2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil) standardı
- HPLC analizlerinde kullanılan standart maddeler- Quersetin, kaemferol, rutin, silibinin, taksifonin ve apigenin standartları
- Kimyasal maddeler- HPLC saflığında asetonytril
- HPLC saflığında etanol
- HPLC saflığında metanol
- Gallik asit
- BHA (Bütillenmiş Hidroksi Anisol), BHT (Bütillenmiş Hidroksi Toluen)
- Folin reaktifi
- %20'lik sodyum karbonat (Na_2CO_3)
- SGE marka uL 250'lik HPLC manuel sıvı enjektörü

Şekil 4.1. Deneysel çalışılmalarda kullanılan cihazlar ve kimyasallar

4.2. Süperkritik CO₂ Özütlenmesi

4.2.1. Süperkritik CO₂ özütlenmesi deney sistemi

Resim 4.1.a'da görülen öğütme cihazı ile *Erythraea Centaurium* bitkisinin kurutulmuş çiçekleri öğütüldü ve Resim 4.1.b'de görülen elek seti ile 250-355 µm aralığında kuru çiçek partikülleri analizler için hazırlandı.



Resim 4.1.a) Bitki değirmeni b) Elek seti

Resim 4.2.a'da süperkritik akışkan özütleme sistemi, CO₂ tüpü, yüksek basınç pompası, kompresör, soğutma sistemi, kosolvent besleme sistemi bulunmaktadır.

Resim 4.2.b'de reaktörün bulunduğu fırın ve numune toplama haznesi görülmektedir, fırın içinde görünen reaktör 24 mL hacimli olup, sistem yarı kesiklidir ve iki ucundan vidalı kapaklıdır.



Resim 4.2.a) Süperkritik karbondioksit özütleme sistemi b) Fırın içi

4.2.2. Süperkritik CO₂ özütlenmesi deney yöntemi

Özütleme işlemi için değişken parametreler sıcaklık, basınç ve özütleme süresidir; sabit olan değerler ise CO₂ akış hızı (3 L/min) (oda sıcaklığı ve 1 atm basınç koşullarında), kosolvent etanolün akış hızı (süperkritik akışkan olan CO₂ 'in hacimsel olarak %2 si olacak şekilde; 0,14 mL/min) ve numune parçacık boyutudur (250-355 μ m). (*Bala ve diğerleri (2016) aynı sabit parametrelerde çalışmışlardır*).

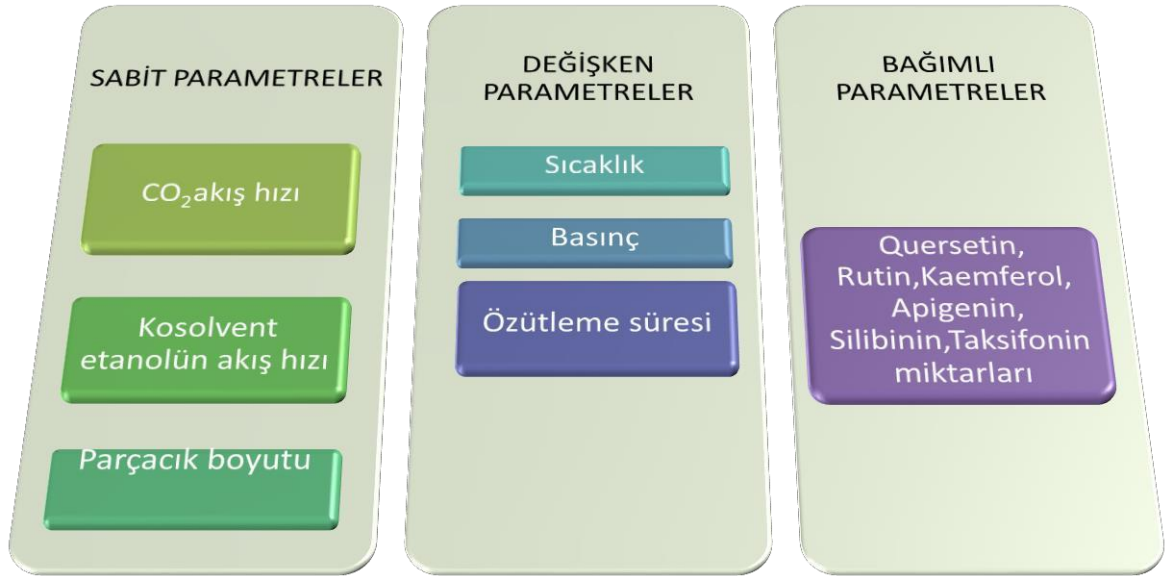
Design Expert 11.1.2.0 Trial programı tarafından belirlenen sıcaklık- basınç-özütleme süresi parametrelerin çalışma aralıkları aşağıda görülmektedir.

-P(bar) (72-357,9)

-T(°C)..... ..(31-86,9)

-t(min)..... (30-271,4)

Sabit, değişken parametreler ve bağımlı parametreler Şekil 4.2’de görölmektedir.



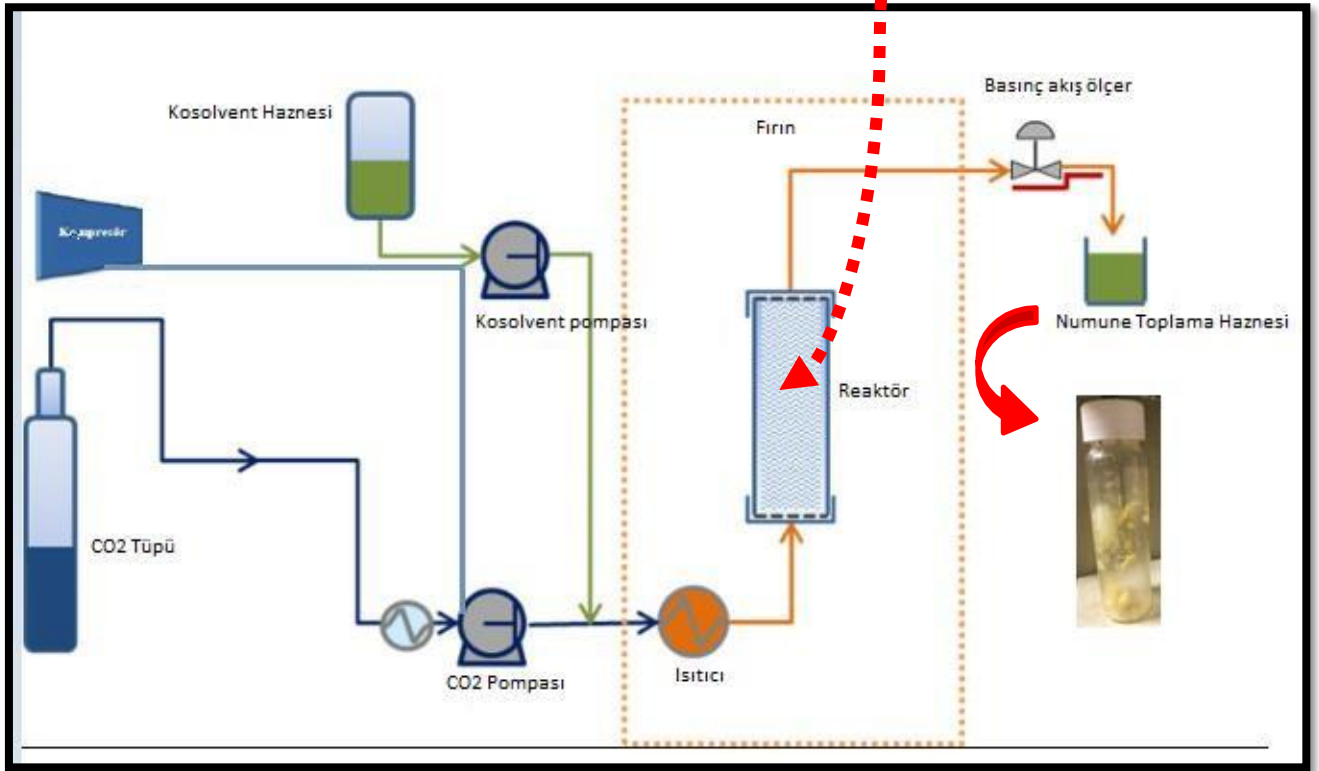
Şekil 4.2. Özütleme işleminin sabit, değişken ve bağımlı parametreleri

Özüt eldesi için 4 g numune reaktör içinde cam pamuklar arasına yerleştirilerek kapatılıp fırın ünitesine vidalarla yüklendi. Sırası ile kompresör, özütleme cihazı, CO₂ tüpü, soğutma sistemi açıldıktan sonra, kurallara uygun olarak doldurulmuş reaktör sisteme vidalar yardımıyla bağlandı. Daha sonra özütleme sisteminin sıcaklığı ve basıncı istenen değerlere ayarlandı. Kosolvent etanol cihazı açıldı. Numune toplama kabı sisteme takıldıktan sonra özütleme işlemleri başlatıldı. Sisteme bağlı akış ölçer numuneden geçen CO₂ debisini 3 L/min olarak sabit kaldığını kontrol etmek için kullanıldı. Çizelge 4.1’de Design Expert 11.1.2.0 Trial programı tarafından belirlenen özütleme çalışma koşulları verilmiştir.

Çizelge 4.1. Design Expert 11.1.2.0 Trial programı tarafından belirlenen özütleme çalışma koşulları

Standart No	Sıcaklık (°C)	Basınç (bar)	Özütleme Süresi (min)	CO ₂ Akış Hızı (L/ min)	Kosolvent Akış Hızı (mL/min)
1	40,0	130,0	30,0	3	0,14
2	75,0	130,0	30,0	3	0,14
3	40,0	300,0	30,0	3	0,14
4	75,0	300,0	30,0	3	0,14
5	40,0	130,0	210,0	3	0,14
6	75,0	130,0	210,0	3	0,14
7	40,0	300,0	210,0	3	0,14
8	75,0	300,0	210,0	3	0,14
9	31,0	215,0	120,0	3	0,14
10	86,9	215,0	120,0	3	0,14
11	57,5	72,0	120,0	3	0,14
12	57,5	357,9	120,0	3	0,14
13	57,5	215,0	31,0	3	0,14
14	57,5	215,0	271,4	3	0,14
15	57,5	215,0	120,0	3	0,14
16	57,5	215,0	120,0	3	0,14
17	57,5	215,0	120,0	3	0,14
18	57,5	215,0	120,0	3	0,14
19	57,5	215,0	120,0	3	0,14
20	57,5	215,0	120,0	3	0,14

Design Expert 11.1.2.0 Trial programı tarafından belirlenen süreler her bir numune için tamamlandığında özüt toplama kaplarında biriken özütler, 3 mL etanol ile çözülerek ve 1 den 20 ye kadar numaralandırılarak HPLC metodu ile analiz edilmek üzere derin dondurucuya kaldırıldı. Şekil 4.3’de süperkritik CO₂ özütleme sistemi akım şeması çizimi görülmektedir.



Şekil 4.3.Süperkritik CO2 özütleme sistemi akım şeması

4.3. Erythraea Centaurium Bitkisinin Fenolik Bileşenlerinin Analiz Yöntemi

4.3.1. HPLC yöntemi

Özütler ilk numune toplama kaplarında kalıntı bırakmayacak şekilde ardışık olarak 1 mL etanolle üç kere çalkalanıp toplamda 3 mL etanolde çözüldükten sonra içeriklerindeki flavonoidlerin varlığının ve miktarının tayini için HPLC sistemine alındı. Çözeltiler HPLC kolonunda tıkanmaya sebebiyet vermemesi ve berrak olmaları için santrifüjleme işlemine tabi tutuldu. Analize başlanmadan kuersetin, rutin, kaemferol ve apigenin standartları

etanolda çözölerek 10 ppm, 20 ppm, 50 ppm ve 100 ppm derişimlerde standart çözelti ler hazırlandı. Kalibrasyon grafiği oluşturuldu. Standart çözelti lerin hazırlanma hesaplamaları Ek 1’de verilmiştir.

HPLC sisteminde hali hazırda bulunan kolona (250*4,6 mm*5µ) ilk önce standart çözelti ler verilerek analizler yapıldı, böylece aranan flavonoidlerin sistemde nasıl pikler vereceği ve derişimleri ile orantılı olarak bu piklerin alanları belirlendi. Ardından numuneler sırası ile kolona verilerek analizler yapıldı, analizlerin doğruya en yakın sonucu vermesi ačíısından her analiz iki kere takrarlanıp ortalama değer alındı. Resim 4.3’de UV dedektörlü HPLC cihazı ve bilgisayarı görölmektedir.

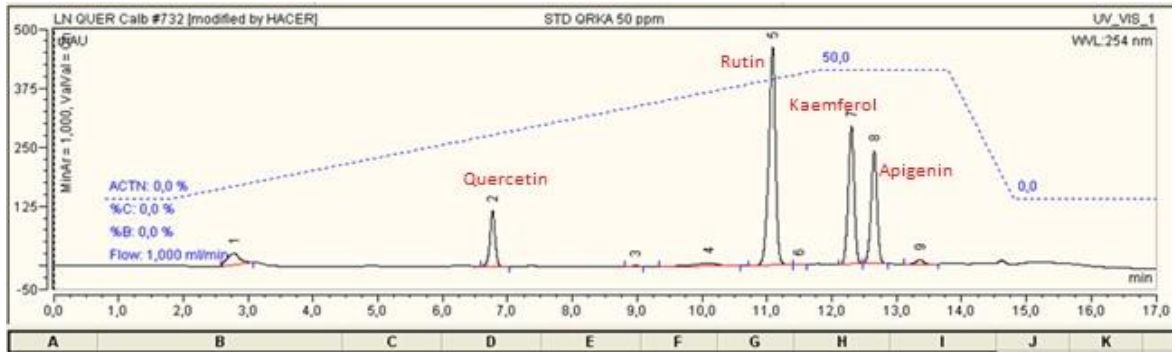


Resim 4.3. UV dedektörlü HPLC cihazı ve bilgisayar

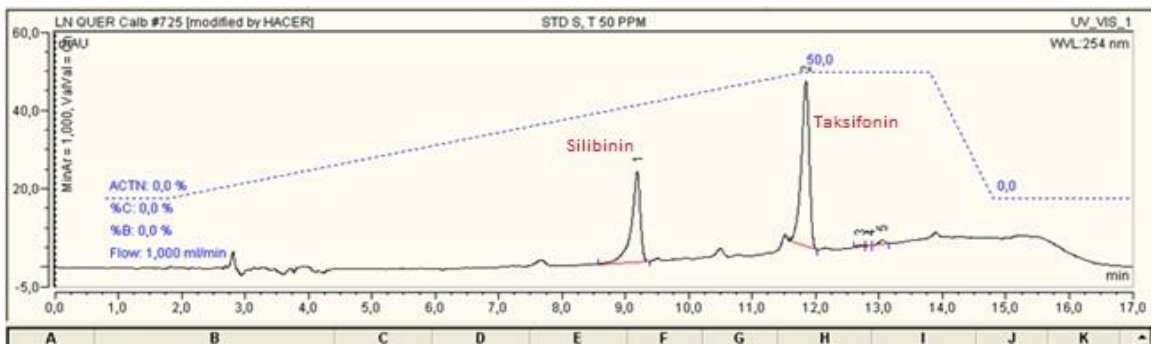
Çizelge 4.2. HPLC çalışma koşulları

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

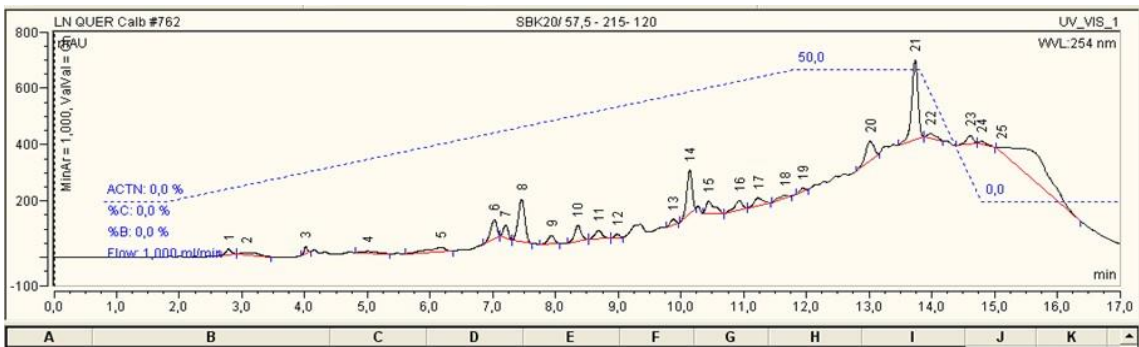
Şekil 4.4, şekil 4.5, şekil 4.6 ve şekil 4.7’de sırasıyla flavonoidlerin 50 ppm standartlarının kromatogramı, optimum çalışma koşuluna ait 20 no’lu numunenin kromatogramı ve soxhlet çalışmasına ait kromatogram verilmiştir.



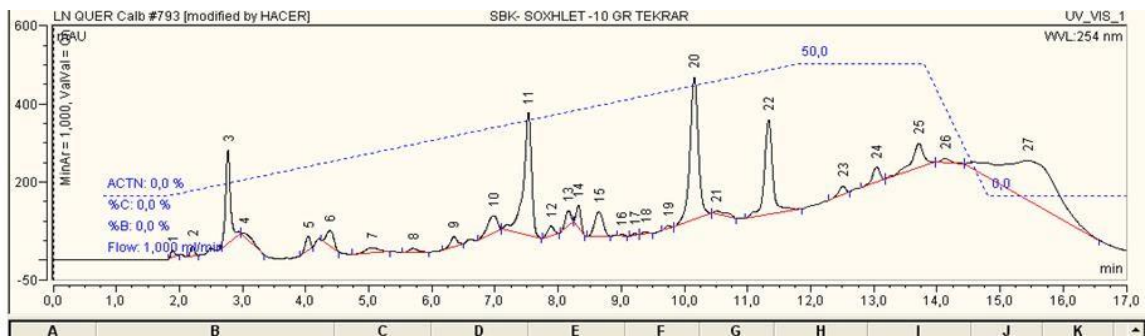
Şekil 4.4. Kuersetin (50 ppm), Rutin (50 ppm), Kaemferol (50 ppm) ve Apigenin (50 ppm) standartlarına ait kromatogram



Şekil 4.5. Silibinin (50 ppm) ve Taksifonin (50 ppm standartlarına ait kromatogram



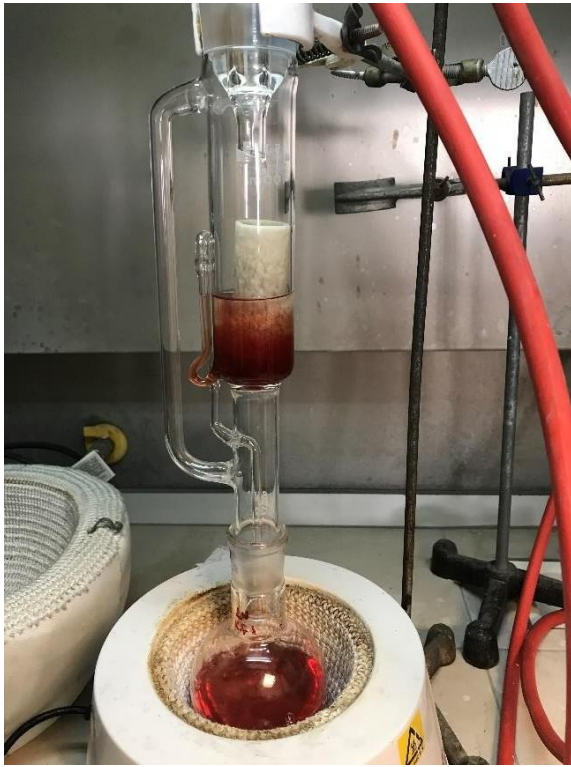
Şekil 4.6. 57,5°C, 215 bar ve 120 min çalışmasına ait kromatogram (Numune no: 20)



Şekil 4.7. Soxhlet özütlemesine ait kromatogram

4.3.2. Soxhlet yöntemi

Deneysel olarak çalışılan kırmızı kantaron bitkisi çiçeklerinden etanol kosolventli süperkritik karbondioksit özütlemesi metoduna referans metot olarak soxhlet özütlemesi gerçekleştirildi, amaç HPLC metodu yardımıyla kuersetin, rutin, apigenin ve kaemferol flavonoidlerinin miktarlarını ve UV-VIS spektrofotometresi yardımıyla toplam antioksidan ve toplam fenolik madde miktarlarını iki özütleme metodu için karşılaştırmaktı. Resim 4.4’de çalışılan soxhlet sistemi görülmektedir.



Resim 4.4.Soxhlet özütleme sistemi

Soxhlet metodu ile kırmızı kantaron bitkisi çiçeklerinden özüt elde etme işlemi basamakları aşağıda özetlenmiştir;

- Kırmızı kantaron bitkisi çiçekleri kurutulup öğütüldü. Ardından 250-355 μm aralığında kalacak şekilde elek seti ile elendi.
- Hazırlanan numuneden 10 g kadar tartılıp filtre kartuşun içerisine alındı.

- Cam soxhlet düzeneği kurulduktan sonra ısıtıcının içerisine yerleştirildi. Geri soğutucu düzeneği de soxhlet cihazının gerekli kısımlarına yerleştirilip su musluğu da açıldıktan sonra sistem hazır hale geldi.
- Resim 4.4. de görülen cam balon joje içerisine 120 mL etanol ve numuneyi içinde barındıran kartuşun kenar kısımlarına da 50 mL etanol koyuldu.
- Isıtıcı 120° C ye ayarlandı.
- Damlama hızı 1 damla/s olacak şekilde ısıtıcı derecesi optimize edildi.
- 8 saat süre ile özütleme işlemine devam edildi.
- 8 saat sonunda sistem kapatıldı, balon jojede kalan sıvı hacmi ölçüldü. HPLC sistemi ile bileşen analizi yapıldı. Ardından UV-VIS spektrofotometresi yardımıyla toplam antioksidan ve toplam fenolik madde miktar analizi yapıldı.

4.3.3. UV-VIS spektrofotometrik yöntemi

Bu kısımda toplam fenolik madde tayini ve toplam antioksidan madde tayini için yapılan analizler açıklanmıştır. Analizlerde kullanılan çift ışın yollu UV-VIS spektrofotometre Resim 4.5. de verilmiştir.



Resim 4.5.UV-VIS Spektrofotometre Cihazı

DPPH yöntemi- toplam antioksidan tayini

DPPH kalibrasyon çözeltisinin hazırlanması

24 mg DPPH (394,32 g/mol) alınıp 1 L metanolde çözünerek stok çözelti hazırlandı (A). Molaritesi $6 \cdot 10^{-5}$ M olan DPPH'in molekül ağırlığı 394 g/mol'dür. Bu stok çözeltiden seyreltme yoluyla 12 mg/L, 6 mg/L, 3 mg/L ve 1,5 mg/L çözelti hazırlandı. Sırası ile her bir çözeltinin absorbans değerleri UV-VIS spektrofotometrede 517 nm de metanol standart körüne karşı okundu. Elde edilen absorbans değerleri ile bir kalibrasyon grafiği oluşturuldu.

Numune çözeltilerinin hazırlanması

Kırmızı kantaron özüt numunelerinden sırası ile her birinden 1 mL alınıp 4 mL metanolde çözöldü (B₁₋₂₀). Toplam 5 mL'lik stok numune çözeltisinden 100 µL alındı ve 1 mL ye metanol ile tamamlandı (C₁₋₂₀). C çözeltilerinin her birinden 0,2 mL alınarak buna, 3,8 mL A çözeltisi ilave edildi (D₁₋₂₀). 30 dakika karanlık odada bekletildikten sonra absorbans değeleri okundu. Doğruya en yakın sonucu elde etmek için her bir okuma 3 kere yapıp ortalama değeri alındı.

BHA (Bütilllenmiş hidroksi anisol) ve BHT (Bütilllenmiş hidroksi tolüen) standartlarının hazırlanması

BHA hazırlanması; BHA standardından 0,01 g tartılır ve 10 mL metanolde çözöldü (E). E stok çözeltisinden 100 µL alınıp 1 mL metanole tamamlandı (F). Aynı işlem BHT için de uygulandı (G).

F ve G stok çözeltielerinden ayrı ayrı 0,2 mL alınarak 3,8 mL A çözeltisine eklendi, karanlık odada 30 dakika bekletildi (H ve I), 517 nm de absorbans değeri okundu. Doğruya en yakın sonucu elde etmek için her bir okuma 3 kere yapıp ortalama değeri alındı.

Folin-Ciocalteu yöntemi ile toplam fenolik tayini

Kalibrasyon çözeltileri ve grafiğinin hazırlanması

Gallik asit standardından 10 mg alınıp, 10mL %70 lik metanolde çözüldü (J). J çözeltisinden 1 mL alındı ve 10 mL ye %70 lik metanol ile seyreltildi (K). K çözeltisinden de 1 ml alınıp 100 mL ye %70 lik metanol ile tekrar seyreltildi (L). L stok çözeltisinden sırasıyla 20 µL, 40 µL, 60 µL, 80 µL ve 100 µL alınıp üzerlerine hepsini eşit hazimli yapmak amacıyla sırasıyla 2420 µL, 2400 µL, 2380 µL, 2360 µL ve 2340 µL saf su eklendi. Sonra üzerlerine 0,2 mL seyreltilmememiş Folin reaktifi eklendi ve 3 dakika beklendi. Daha sonra tekrar her bir çözelti üzerine 0,6 mL %20 lik Na_2CO_3 ilave edildi. Oda sıcaklığında ve karanlıkta 2 saat inkübe edildi. Ardından her bir kalibrasyon çözeltisinin absorbens değerleri UV-VIS spektrofotometrede 765 nm de okundu ve kalibrasyon grafiği oluşturuldu. Kırmızı kantaron özütlelerinin absorbens değerleri kalibrasyon grafiği kullanılarak gallik asit eşdeğerliği cinsinden hesaplandı.

Numunelerin çözeltilerinin hazırlanması

Yukarıda bahsi geçen $B_{(1-20)}$ stok çözeltilerinin herbirinden 100 µL alınıp her biri metanol (%100) ile 1 mL ye tamamlandı (M_{1-20}). M çözeltilerinden 40 µL alınıp üzerlerine 2,4 mL saf su, 0,2 mL seyreltilmememiş Folin reaktifi eklenip, 3 dakika bekletildi (N_{1-20}). Daha sonra her bir N çözeltisi üzerine 0,6 mL %20 lik Na_2CO_3 ilave edildi ve oda sıcaklığında ve karanlıkta 2 saat inkübe edildi. Ardından her bir çözeltinin absorbens değerleri 765 nm de okundu.

4.4. Deneysel Tasarım Yöntemi

Deney tasarımıyla ilgilenilen koşullar faktör (factor) olarak adlandırılmaktadır. Faktörler iki ya da daha fazla düzeye sahip olabilirler. Düzey sayıları deneyi yapan kişinin kontrolü altında olabileceği gibi kontrolü dışında da olabilir. Deney birimlerinden elde edilen gözlem değerlerine Ronald Aylmer Fisher tarafından geliştirilen ve oldukça popüler bir teknik olan Varyans Analizi (ANalysis Of VARIance-ANOVA) uygulanarak araştırma konusu olan faktör veya faktörlerin istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığı belirlenmeye çalışılır (Cvjetko ve diğerleri, 2012). Deney birimlerinin, hakkında bilgi elde edilmek istenen karakteristik özelliklerine yanıt (response) veya bağımlı (dependent) değişken adı verilir. Bağımlı değişken nitel olabileceği gibi nicel de olabilir. Bağımlı değişkenin alacağı değerleri etkileyen kontrol edilebilir deneysel değişkenlere bağımsız (independent) değişken ya da faktör denir (Hicks ve Turner, 1999).

Yapılan deneysel çalışmalar sonucunda incelenen parametreler ve elde edilen verim değerleri ile sürecin Yüzey Yanıt Metoduna (Response Surface Methodology) (RSM) göre optimizasyonu yapılmıştır. Bu metodun avantajı çalışma verimini etkileyen parametreleri teker teker incelenin yanı sıra; ikili etkileşimlerini de inceleme olanağı sunmasıdır (Bala ve diğerleri, 2016). RSM veri eldesi için hızlı ve ekonomik bir yöntemdir (Bimacr ve diğerleri, 2011).

Optimizasyon için Design Expert 11.1.2.0 Trial programında; RSM metodu; Central Composite dizaynı kullanılmıştır. Elde edilen model ve sonuçları aşağıda ayrıntılı olarak verilmektedir. Deneysel Tasarım Yöntemi, süreçlere kolaylıkla uygulanabilen istatistiksel ve matematiksel bir optimizasyon yöntemidir. Özütleme sürecine etki eden parametrelerin etkisi literatür çalışmaları yardımı ile araştırılmıştır. Çalışmada, sıcaklık, basınç ve özütleme süresi özütleme sistemine en fazla etki eden parametreler olarak belirlenmiştir. Bu amaçla Deneysel Tasarım Yönteminde bu parametreler bağımsız değişkenler olarak seçilmiştir. Yanıt fonksiyonu olan bağımlı değişken ise özütleme sürecinin verimi (μg flavonoid / g bitki) olarak belirlemiştir.

5. DENEY SONUÇLARI VE TARTIŞMA

5.1. Yüzey Cevap Yöntemi ile Matematiksel Modelleme

Deneysel Tasarım Yöntemi kapsamında bağımsız değişkenler ($k=3$) için $2k$ “Merkezi Kompozit Tasarımı (Central Composite Design)” uygulanmıştır. Bağımsız değişkenler basınç, sıcaklık ve özütleme süresidir. Deney tasarımı; merkezde 6 nokta, merkez dışında 14 nokta olmak üzere toplamda 20 noktadan oluşmaktadır. Çizelge 5.1’de deneysel tasarım yöntemi için seçilen parametreler verilmiştir.

Çizelge 5.1. Deneysel tasarım yöntemi için seçilen parametreler

Bağımsız değişken	Sıcaklık (°C)	Basınç (bar)	Özütleme Süresi (min)
Tasarım Değişkeni	A	B	C

Sıcaklık, basınç ve özütleme süresi olarak seçilen tasarım değişkenlerinin aralığı Çizelge 5.2’de verilmiştir.

Çizelge 5.2. Sıcaklık, basınç ve özütleme süresi olarak seçilen tasarım değişkenlerinin aralığı

Bağımsız Değişken	Tasarım Değişkeni	-1,68	-1	0	1	+1,68
Sıcaklık	A	28,07	40	57,5	75	86,93
Basınç	B	72,05	130	215	300	357,95
Özütleme Süresi	C	18,64	30	120	210	221,36

5.2. Kırmızı Kantaron Çiçeğinden Süperkritik CO₂ ile Kuersetin Özütlemeye Verimine İşletim Parametrelerin Etkisi

Kırmızı kantaron çiçeğinden süperkritik CO₂ özütlemesi elde edilen verilerle oluşturulan programın önerdiği deneysel algoritma ve kuersetin özütlemeye çıktıları Çizelge 5.3'te sunulmuştur.

Çizelge 5.3. Deneysel algoritma ve kuersetin özütlemeye çıktıları

Deney No	A	B	C	Sıcaklık (°C)	Basınç (bar)	Özütleme süresi (min)	% verim (µg kuersetin /g bitki)
1	0,00	0,00	0,00	40,00	130,0	30,0	2,74
2	1,00	1,00	1,00	75,00	130,0	30,0	0,00
3	-1,68	0,00	0,00	40,00	300,0	30,0	0,80
4	0,00	-1,00	1,00	75,00	300,0	30,0	9,66
5	0,00	0,00	1,68	40,00	130,0	210,0	5,76
6	0,00	0,00	-1,68	75,00	130,0	210,0	2,74
7	0,00	0,00	0,00	40,00	300,0	210,0	1,12
8	0,00	0,00	0,00	75,00	300,0	210,0	9,29
9	0,00	0,00	0,00	31,00	215,0	120,0	5,68
10	0,00	0,00	0,00	86,90	215,0	120,0	2,28
11	0,00	0,00	0,00	57,50	72,0	120,0	7,43
12	1,00	-1,00	-1,00	57,50	357,9	120,0	0,98
13	-1,00	1,00	1,00	57,50	215,0	31,0	0,86
14	1,00	-1,00	1,00	57,50	215,0	271,4	8,17
15	0,00	0,00	0,00	57,50	215,0	120,0	10,99
16	-1,00	-1,00	-1,00	57,50	215,0	120,0	11,89
17	-1,00	1,00	-1,00	57,50	215,0	120,0	11,94
18	1,00	1,00	-1,00	57,50	215,0	120,0	12,32
19	0,00	1,68	0,00	57,50	215,0	120,0	12,15
20	1,68	0,00	0,00	57,50	215,0	120,0	12,83

Çizelge 5.3'ten de görüldüğü gibi kırmızı kantaron çiçeklerinin etanol kosolventli süperkritik karbondioksit özütlemesi çalışmasında Design Expert Trial 11.1.2.0 programının öngördüğü optimum değer T= 57,5 °C, P= 215 bar, t=120 min noktasıdır; yapılmış olan

deneysel çalışmalarda da kuersetin % verimi 12,83 µg kuersetin/ g bitki en yüksek değer olarak bulunmuştur.

Programdan elde edilen modelin varyans analizi (ANOVA testi) sonuçları Çizelge 5.4'te verilmiştir.

Çizelge 5.4. Kuersetin deneyleri için kullanılan modelin tutarlılığı ve parametreler arası ilişkilerin anlamlılığı

	F değeri	P değeri	Anlamlılık Durumu
Model	6,55	0,0035	Anlamlı
A (Sıcaklık)	0,37	0,5567	Anlamsız
B (Basınç)	0,02	0,8958	Anlamsız
C (Özütleme süresi)	3,90	0,0765	Anlamsız
AB	10,68	0,0085	Anlamlı
AC	0,02	0,8917	Anlamsız
BC	0,70	0,4230	Anlamsız
A ²	18,43	0,0016	Anlamlı
B ²	17,41	0,0019	Anlamlı
C ²	16,00	0,0025	Anlamlı
Uyum eksikliği (Lack of fit)	32,39	0,0008	Anlamlı

Modelin geçerliliğinin göstergesi olan f-değeri 6,55 olarak hesaplanmış olup, bu değer modelin anlamlı olduğunu vurgulamaktadır. p=0,0035 değeri % 0,35'lik bir değişimi gösterir ve bunun gürültüden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Model incelendiğinde p-değerleri modeldeki terimlerin önemli olup olmadıklarını ifade eder. 0,05'ten büyük olan değerler ihmal edilir (Bimakr ve diğerleri, 2011). Dolayısıyla modelde AB (sıcaklık-basınç ikili etkileşimi) değeri model için en önemli parametredir. Bunun yanı sıra A², B², C² değerleri de modelin öngördüğü önemli parametrelerdir.

Bağımlı değişken (özütleme verimi) ile bağımsız değişkenler olan (sıcaklık, basınç ve özütleme süresi) arasındaki uyumu gösteren diğer bir parametre ise R²'dir. Çizelge 5.5'te model için hesaplanan R², standart sapma ve varyasyon katsayısı değerleri verilmiştir.

Çizelge 5.5. Kuersetin için hesaplanan model istatistikleri

Standart sapma	2,47
C.V.% (Varyasyon katsayısı)	38,05
R ²	0,86

Eş. 5.1’de kuersetin % verimini ifade eden denklem verilmiştir, Çizelge 5.1.’den de görüleceği üzere sıcaklık(A); basınç(B); süre(C) değişkenlerinin tek başına ve birbirleri ile olan ilişkilerini ifade eden denklemdir.

$$\% \text{ kuersetin verimi} = x_0 + x_1*A + x_2*B + x_3*C + x_4*AB + x_5*AC + x_6*BC + x_7*A^2 + x_8*B^2 + x_9*C^2 \quad (5.1)$$

Kırmızı kantaron bitkisinden süperkritik CO₂ ile kuersetin özütlemesi Design Expert 11.1.2.0 programı ile x katsayıları hesaplanmış ve yerlerine konulduğunda Eş.2 elde edilmiştir.

$$\% \text{ kuersetin verimi} = 12,01 - 0,41*A + 0,09*B + 1,32*C + 2,85*AB - 0,12*AC - 0,73*BC - 2,79*A^2 - 2,71*B^2 - 2,60*C^2 \quad (5.2)$$

Eş. 5.2’ye göre her bir parametrenin kuersetin özütleme sürecine etkisi ayrı ayrı incelenmiştir. Eş. 5.2 incelendiğinde sıcaklık teriminin (A) önünde bulunan katsayının negatif olması sıcaklık parametresinin azalması kuersetin özütleme verimini olumlu etkilediği anlamına gelir. Basınç teriminin (B) önünde bulunan katsayının pozitif olması, basınç parametresinin artması kuersetin özütleme verimini olumlu etkilediği anlamına gelir.

5.2.1. Kuersetin özüt verimine sıcaklık-basınç; sıcaklık-zaman; basınç-zaman parametrelerinin etkisi

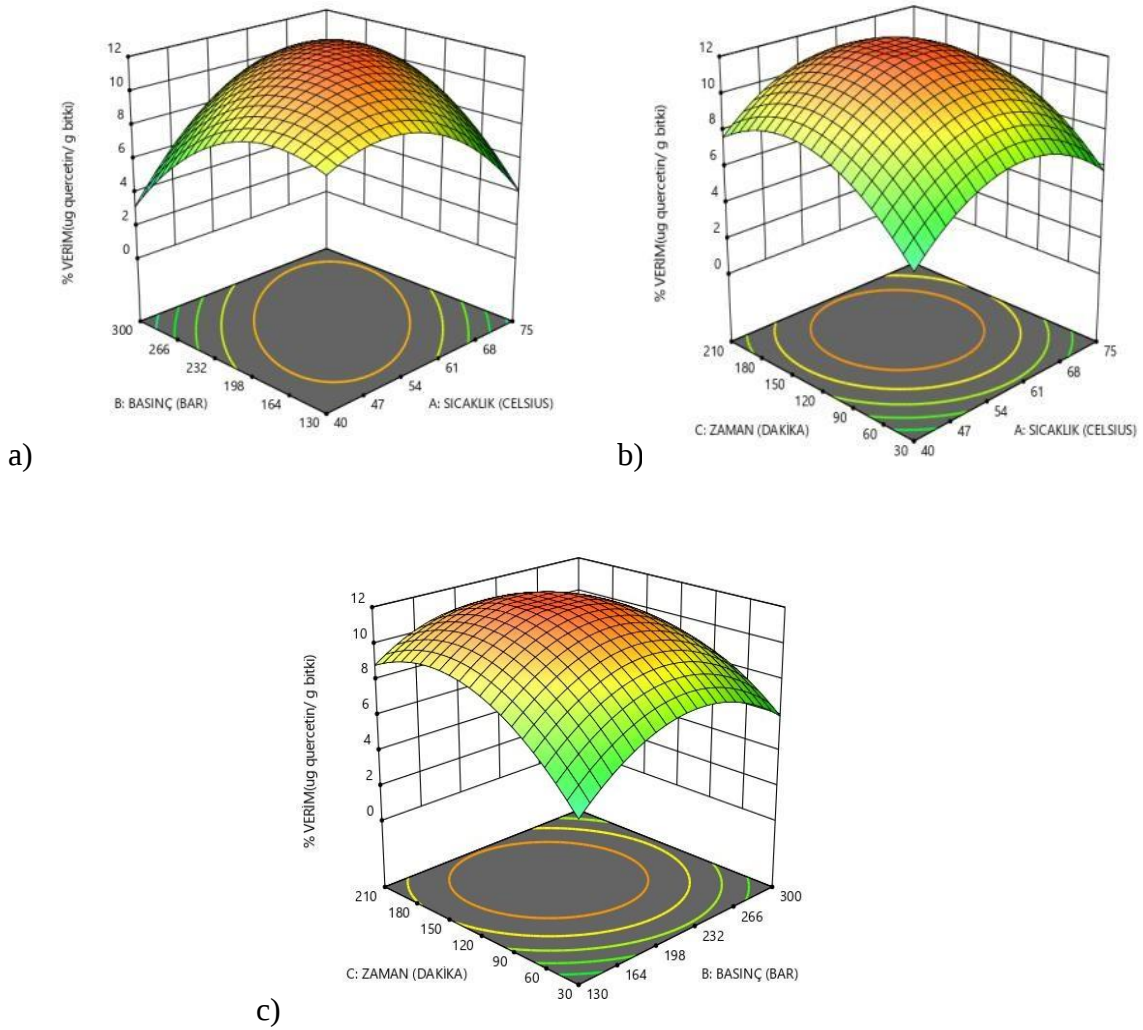
Kırmızı kantaron bitkisinden süperkritik CO₂ ile kuersetin özütlemesi sürecine sıcaklık-basınç ikili etkisini irdelemek için diğer bir parametre olan özütleme süresi C=0 olarak alınmıştır. Eş. 5.2 tekrar düzenlenerek Eş. 5.3 elde edilmiştir.

$$\% \text{ kuersetin verimi} = 12,01 - 0,41 \cdot A + 0,09 \cdot B - 2,85 \cdot AB - 2,79 \cdot A^2 - 2,71 \cdot B^2 \quad (5.3)$$

Eş. 5.3 incelendiğinde sıcaklık teriminin (A) önünde bulunan katsayının negatif (-0,41<0) olması sıcaklık parametresinin azalması kuersetin özütleme verimini olumlu etkilediği anlamına gelir. Basınç teriminin (B) önünde bulunan katsayının pozitif olması (0,09>0), basınç parametresinin artması kuersetin özütleme verimini olumlu etkilediği anlamına gelir. Zira Bala ve arkadaşları 2016 yılında yapmış oldukları çalışmada basıncın artmasıyla süperkritik akışkanın yoğunluğunun ve dolayısı ile çözme gücünün arttığını belirtmişlerdir,

Sıcaklık-basınç ikili etkileşimine (AB) bakıldığında ise bu terimin önünde bulunan katsayının negatif olması (-2,85<0) kuersetin özütleme verimini düşürdüğü anlamına gelir.

Basınç- sıcaklık; zaman- sıcaklık; zaman- basınç etkileşimlerinin kuersetin verimine etkisi Şekil 5.1’de verilmiştir.



Şekil 5.1. Kuersetin verimine a) basınç- sıcaklık; b) zaman- sıcaklık; c) zaman- basınç ikili etkileşimlerinin etkisi

Şekil 5.1.a incelendiğinde kırmızı kantaron çiçeğinin SC-CO₂ özütlemesi sürecinde basıncın düşük değerinde (130 bar); sıcaklık 40°C'dan 75°C'a doğru arttıkça özütleme veriminin azaldığı görülmüştür. Yüksek basınç değerinde de (300 bar) sıcaklık 40°C'dan 75°C'a doğru arttıkça özütleme veriminin azaldığı gözlenmiştir. Yüksek sıcaklıklarda sıcaklık arttıkça özüt veriminin azalmasını Bimacr ve arkadaşları (2012) sıcaklık arttıkça özüt içindeki termo-hassasiyete sahip flavonoidlerin bozunması olarak açıklamışlardır. Şekil 5.a ve 5.b deki gibi düşük sıcaklıklarda sıcaklık arttıkça özüt veriminin artması ise sıcaklığın artmasının kütle transferini desteklemesi ve süperkritik akışkanın buhar basıncını artırarak özüt verimini artırması olarak yorumlanmıştır. Tez çalışması bu yorumları destekler niteliktedir.

Grafiğe genel olarak bakılırsa farklı basınç değerlerinde sıcaklık değerleri yükseldikçe kuersetin verimi önce artıp sonra azalmıştır. Benzer şekilde farklı sıcaklık değerlerinde basınç değerleri yükseldikçe kuersetin verimi önce artıp sonra azalmıştır. Özütleme verimine sadece sıcaklığın negatif, sadece basıncın ise pozitif etki gösterdiği bilinmektedir. Ancak ikili etkileşim söz konusu olduğunda, her deney kendi içinde farklılık gösterebilir. Bala ve arkadaşlarının (2016) yapmış olduğu çalışmada da bu yorum desteklenmiştir.

Kırmızı kantaron bitkisinden süperkritik CO₂ ile kuersetin özütlemesi sürecine sıcaklık-zaman ikili etkisini irdelemek için diğer bir parametre olan basınç terimi B=0 olarak alınmıştır. Eş.5.2 tekrar düzenlenerek Eş. 5.4 elde edilmiştir.

$$\% \text{kuersetin verimi} = 12,01 - 0,41 * A + 1,32 * C - 0,12 * AC - 2,79 * A^2 - 2,60 * C^2 \quad (5.4)$$

Eş. 5.4 incelendiğinde sıcaklık teriminin (A) önünde bulunan katsayının negatif (-0,41<0) olması sıcaklığı düşüreceği için kuersetin özütleme verimini olumsuz etkilemektedir. Özütleme süresi teriminin (C) önünde bulunan katsayının pozitif olması (1,32>0), zaman parametresinin artması kuersetin özütleme verimini olumlu etkilemektedir. Sıcaklık-zaman ikili etkileşimine (AC) bakıldığında ise bu terimin önünde bulunan katsayının negatif olması (-0,12<0) kuersetin özütleme verimini düşürmektedir.

Zaman- sıcaklık ikili etkileşiminin kuersetin verimine etkisi Şekil 5.1.b.'de verilmiştir. Şekil 5.1.b'ye genel olarak bakılırsa sıcaklık değerleri yükseldikçe kuersetin verimi önce artıp sonra azalmıştır. Farklı zaman değerlerinde özütleme süresi arttıkça kuersetin veriminin önce arttığı daha sonra kısmen de olsa azaldığı gözlenmiştir. Oysa ki özütleme verimine sadece sıcaklığın etkisi negatif, sadece özütleme süresinin ise pozitif etki gösterdiği bilinmektedir.

Kırmızı kantaron bitkisinden süperkritik CO₂ ile kuersetin özütlemesi sürecine basınç-zaman ikili etkisini irdelemek için diğer bir parametre olan sıcaklık A=0 olarak alınmıştır. Eş. 5.2 tekrar düzenlenerek Eş. 5.5 elde edilmiştir.

$$\% \text{ kuersetin verimi} = 12,01 + 0,09 * B + 1,32 * C - 0,73 * BC - 2,71 * B^2 - 2,60 * C^2 \quad (5.5)$$

Eş. 5.5 incelendiğinde basınç teriminin (B) önünde bulunan katsayının pozitif ($0,09 > 0$) olması basınç parametresinin artması kuersetin özütleme verimini olumlu etkilemektedir. Aynı şekilde özütleme süresi teriminin (C) önünde bulunan katsayının pozitif olması ($1,32 > 0$), zaman parametresinin artması kuersetin özütleme verimini olumlu etkilemektedir. Basınç-zaman ikili etkileşimine (BC) bakıldığında ise bu terimin önünde bulunan katsayının negatif olması ($-0,73 < 0$) kuersetin özütleme verimini düşürmektedir.

Zaman-basınç ikili etkileşiminin kuersetin verimine etkisi Şekil 5.1.c'de verilmiştir. Şekil 5.1.c'de görüldüğü gibi basınç değerleri yükseldikçe kuersetin verimi önce artıp sonra azalmıştır. Özütleme süresi yükseldikçe kuersetin veriminin önce arttığı daha sonra kısmen de olsa azaldığı gözlenmiştir. Parametreler ayrı ayrı incelendiğinde özütleme verimine hem basıncın hem özütleme süresinin etkisi pozitiftir. İkili etkileşim söz konusu olduğunda, her deney kendi içinde farklılık gösterdiği gözlenmiştir.

5.3. Kırmızı Kantaron Çiçeğinden Süperkritik CO₂ ile Rutin Özütleme Verimine İşletim Parametrelerin Etkisi

Kırmızı kantaron çiçeğinden süperkritik CO₂ özütlemesi ile elde edilen rutin özütleme verimleri ve deneysel işletim koşulları Çizelge 5.6'de sunulmuştur. Deneysel çalışmalar incelendiğinde rutin için maksimum verim 1 no'lu deney şartlarında elde edilmiştir.

Çizelge 5.6. Deneysel işletim şartları ve rutin özütleme çıktıları

Deney No	Sıcaklık (°C)	Basınç (bar)	Özütleme süresi (min)	% verim (µg rutin /g bitki)
1	40,0	130,0	30,0	7,86
2	75,0	130,0	30,0	1,79
3	40,0	300,0	30,0	2,43
4	75,0	300,0	30,0	1,54
5	40,0	130,0	210,0	0,00
6	75,0	130,0	210,0	7,86
7	40,0	300,0	210,0	0,00
8	75,0	300,0,	210,0	7,60
9	31,0	215,0	120,0	0,00
10	86,9	215,0	120,0	3,89
11	57,5	72,0	120,0	2,00
12	57,5	357,9	120,0	2,22
13	57,5	215,0	31,0	0,86
14	57,5	215,0	271,4	3,14
15	57,5	215,0	120,0	1,49
16	57,5	215,0	120,0	2,11
17	57,5	215,0	120,0	2,10
18	57,5	215,0	120,0	3,63
19	57,5	215,0	120,0	2,90
20	57,5	215,0	120,0	3,10

Programdan elde edilen modelin varyans analizi (ANOVA testi) sonuçları Çizelge 5.7.'de verilmiştir.

Çizelge 5.7. Rutin deneyleri için kullanılan modelin ANOVA testi verileri

	F değeri	P değeri	Anlamlılık Değeri
Model	9,3600	0,00008	
A (Sıcaklık)	12,6500	0,00520	Anlamlı
B (Basınç)	1,7400	0,21610	Anlamsız
C (Özütleme süresi)	4,2400	0,06640	Anlamsız
AB	2,3100	0,15970	Anlamsız
AC	47,9900	0,00010	Anlamlı
BC	2,8100	0,12450	Anlamsız
A ²	0,1218	0,73430	Anlamsız
B ²	0,0233	0,88170	Anlamsız
C ²	11,8600	0,00630	Anlamlı
Uyum eksikliği (Lack of fit)	3,2100	0,11290	Anlamsız

Modelin uyumlu olup olmadığını ifade eden P değerlerine bakıldığında 0,05'ten büyük olan terimler ihmal edilir. Dolayısıyla bu modelde önemli olan terimler A (sıcaklık) ve AC (sıcaklık-zaman ikili etkileşimi) olup, C² değeri de modelin öngördüğü önemli parametrelerdir.

Özütleme verimi ile bağımsız değişkenler olan (sıcaklık, basınç ve özütleme süresi) arasındaki uyumu gösteren R² değeri 1'e yakındır. Çizelge 5.8'da hesaplanan R², standart sapma ve varyasyon katsayısı değerleri verilmiştir.

Çizelge 5.8. Rutin için hesaplanan model istatistikleri

Standart sapma	1,14
C.V.% (Varyasyon katsayısı)	36,39
R ²	0,89

Eş.5.6.'da rutin % verimini ifade eden denklem verilmiştir.

$$\% \text{ rutin verimi} = x_0 + x_1 * A + x_2 * B + x_3 * C + x_4 * AB + x_5 * AC + x_6 * BC + x_7 * A^2 + x_8 * B^2 + x_9 * C^2 \quad (5.6)$$

Kırmızı kantaron bitkisinden süperkritik CO₂ ile rutin özütlemesi Design Expert 11.1.2.0 programı ile x katsayıları hesaplanmış ve yerlerine konulduğunda Eş.5.7 elde edilmiştir.

$$\% \text{ rutin verimi} = 2,54 - 1,10 * A + 0,41 * B + 0,64 * C - 0,61 * AB - 2,80 * AC - 0,68 * BC - 0,11 * A^2 - 0,05 * B^2 + 1,04 * C^2 \quad (5.7)$$

Eş.5.7'ye göre herbir parametrenin rutin özütleme sürecine etkisi ayrı ayrı incelenmiştir.

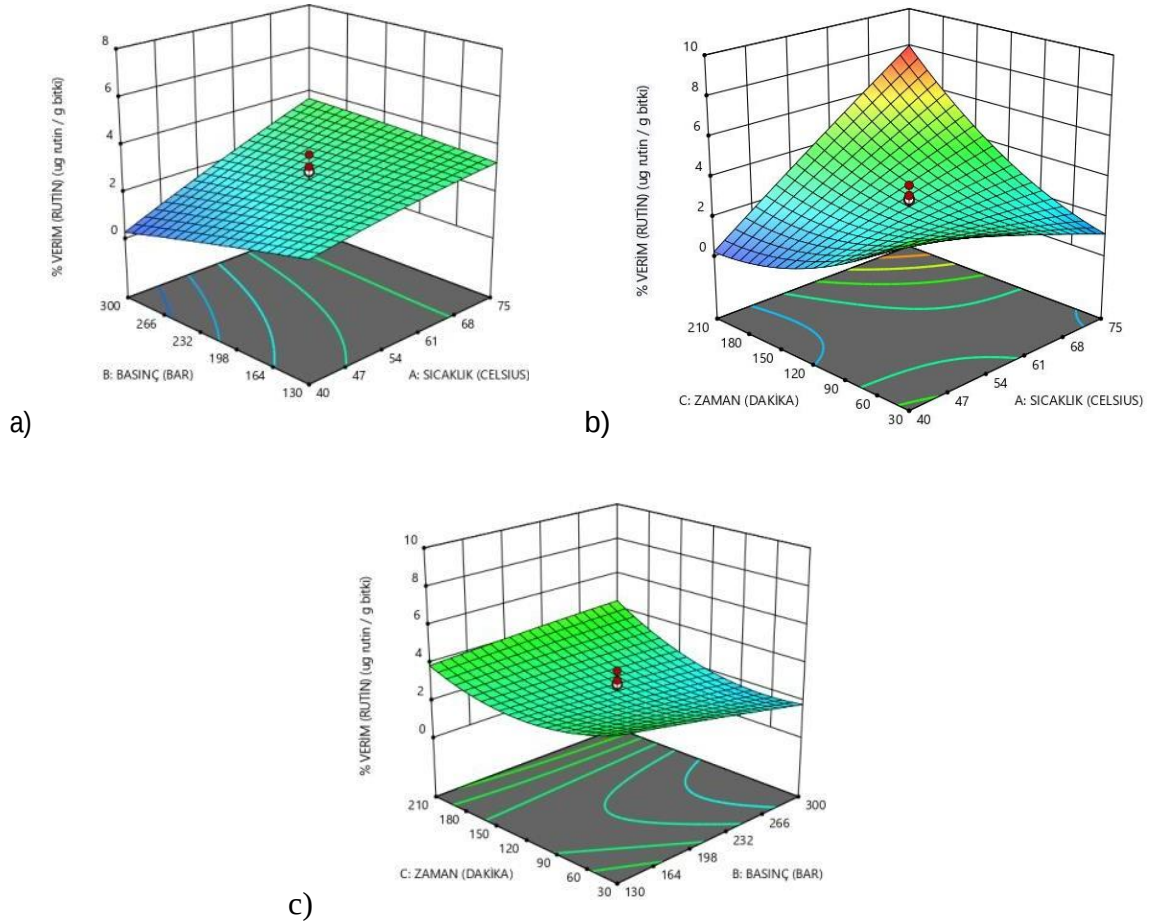
5.3.1. Rutin özüt verimine sıcaklık-basınç; sıcaklık-zaman; basınç-zaman parametrelerinin etkisi

Kırmızı kantaron bitkisinden süperkritik CO₂ ile rutin özütlemesi sürecine sıcaklık-basınç ikili etkisini irdelemek için diğer özütleme süresi C=0 olarak alınmıştır. Eş. 5.7 tekrar düzenlenerek Eş. 5.8 elde edilmiştir.

$$\% \text{ rutin verimi} = 2,54 - 1,10 * A + 0,41 * B - 0,61 * AB - 0,11 * A^2 + 0,05 * B^2 \quad (5.8)$$

Eş. 5.8 incelendiğinde sıcaklık terimi (A) katsayısının negatif (-1,10<0) olması sıcaklık parametresinin artması rutin özütleme verimini olumsuz etkilemesi beklenmektedir. Basınç terimi (B) katsayısının pozitif olması (0,41>0), basınç parametresinin artması rutin özütleme verimini olumlu etkilemesi beklenmektedir. Sıcaklık-basınç ikili etkileşimine (AB) bakıldığında ise bu terimin önünde bulunan katsayının negatif olması (-0,61<0) rutin özütleme verimini düşürmektedir.

Basınç- sıcaklık; zaman- basınç; zaman- sıcaklık etkileşimlerinin rutin verimine etkisi Şekil 5.2.'de verilmiştir



Şekil 5.2. Rutin verimine a) basınç- sıcaklık; b) zaman- basınç; c) zaman- sıcaklık zaman ikili etkileşiminin etkisi

Şekil 5.2.a incelendiğinde sıcaklık arttığında (40°C'dan 75°C'a) rutin özütleme veriminin arttığı görülmüştür. Basınç arttığında (130bar'dan 300bar'a) rutin özütleme veriminin azaldığı görülmüştür. Oysa ki normal şartlarda sıcaklık arttıkça özütleme veriminin azalması, basınç arttıkça özütleme veriminin artması beklenmektedir. Zira Eş.5.8.'deki denkleme göre sıcaklık ve basıncın % rutin verimi üzerindeki etkileri Şekil 5.2.a.'dan farklı olmalıydı ancak modelin öngördüğü yorum ile deneysel çalışmalar uyuşmamıştır ve ikili etkileşim altında özütleme sürecinin beklenenden farklı olabileceği yorumuna varılmıştır. Süperkritik CO₂ ile rutin özütlemesi sürecine sıcaklık-zaman ikili etkisini incelemek için basınç terimi B=0 olarak alınmıştır. Eş.5.7 tekrar düzenlenerek Eş.5.9 elde edilmiştir.

$$\% \text{ rutin verimi} = 2,54 - 1,10 * A + 0,64 * C - 2,80 * AC - 0,11 * A^2 + 1,04 * C^2 \quad (5.9)$$

Eş.5.9 incelendiğinde sıcaklık teriminin (A) negatif ($-1,10 < 0$) olması rutin özütleme verimini olumlu etkilemektedir. Özütleme süresi teriminin (C) önünde bulunan katsayının pozitif olması ($0,64 > 0$) , yani özütleme sürecini uzun tutmak rutin özütleme verimini olumlu etkilemektedir. Sıcaklık-zaman ikili etkileşimine (AC) bakıldığında ise bu terimin önünde bulunan katsayının negatif olması ($-2,80 < 0$) kuersetin özütleme verimini düşürmektedir.

Zaman-sıcaklık ikili etkileşiminin rutin verimine etkisi Şekil 5.2.b'de verilmiştir. Şekil 5.2.b'ye bakıldığında sıcaklık arttıkça özütleme veriminin azaldığı görülmektedir. Rutin verimi üzerinde sıcaklığın etkisi düşünüldüğünde bu beklenen bir durumdur. Sıcaklık artışı ekstraksiyon verimi üzerinde negatif etki oluşturmaktadır. Bimakr ve arkadaşları (2011) da benzer yorumda bulunmuşlardır.

Kırmızı kantaron bitkisinden süperkritik CO₂ ile rutin özütlemesi sürecine basınç-zaman ikili etkisini gözlemek için diğer bir parametre olan sıcaklık A=0 olarak alınmıştır. Eş.5.7 tekrar düzenlenerek Eş.5.10 elde edilmiştir.

$$\% \text{ rutin verimi} = 2,54 + 0,41*B + 0,64*C - 0,68*BC + 0,05*B^2 + 1,04*C^2 \quad (5.10)$$

Eş.5.10 incelendiğinde basınç teriminin (B) pozitif ($0,41 > 0$) olması yani basınç parametresinin artması rutin özütleme verimini olumlu etkilemektedir. Özütleme süresi teriminin (C) pozitif olması ($0,64 > 0$), zamanla rutin özütleme verimini olumlu etkilemektedir. Basınç-zaman ikili etkileşimine (BC) bakıldığında ise bu terimin negatif olması ($0,68 < 0$) rutin özütleme verimini düşürmektedir.

Zaman- basınç ikili etkileşiminin rutin verimine etkisi Şekil 5.2.c'de verilmiştir. Şekil 5.2.c incelendiğinde basıncın zamanla artışı rutin özütleme verimini düşürdüğü gözlenmiştir. Bu beklenenin aksine bir durum olup basıncın artmasıyla ekstraksiyon veriminin artması beklenmektedir.

5.4. Parametrelerin Kırmızı Kantaron Çiçeği Süperkritik CO₂ ile Kaemferol Özütlemeye Verimine Etkisi

Kırmızı kantaron çiçeğinden süperkritik CO₂ özütlemesi ile elde edilen kaemferol özütlemeye verimleri ve deneysel çalışma koşulları Çizelge 5.9’da verilmiştir.

Çizelge 5.9. Deneysel işletim şartları ve kaemferol özütlemeye çıktıları

Deney No	Sıcaklık (°C)	Basınç (Bar)	Özütlemeye süresi (min)	% verim (µg kaemferol /g bitki)
1	40,0	130,0	30,0	9,736002
2	75,0	130,0	30,0	0,000000
3	40,0	300,0	30,0	3,245965
4	75,0	300,0	30,0	3,372342
5	40,0	130,0	210,0	0,000000
6	75,0	130,0	210,0	5,619105
7	40,0	300,0	210,0	0,000000
8	75,0	300,0	210,0	5,422233
9	31,0	215,0	120,0	0,000000
10	86,9	215,0	120,0	3,448895
11	57,5	72,0	120,0	16,29313
12	57,5	357,9	120,0	4,975637
13	57,5	215,0	31,0	1,99083
14	57,5	215,0	271,4	2,045273
15	57,5	215,0	120,0	5,433591
16	57,5	215,0	120,0	9,630918
17	57,5	215,0	120,0	9,620302
18	57,5	215,0	120,0	7,941059
19	57,5	215,0	120,0	1,286256
20	57,5	215,0	120,0	16,59154

Programdan elde edilen modelin varyans analizi (ANOVA testi) sonuçları Çizelge 5.10.’da verilmiştir.

$$\% \text{ kaemferol verimi} = x_0 + x_1 * A + x_2 * B + x_3 * C + x_4 * AB + x_5 * AC + x_6 * BC + x_7 * A^2 + x_8 * B^2 + x_9 * C^2 \quad (5.11)$$

Çizelge 5.10. Kaemferol deneyleri için kullanılan modelin ANOVA testi verileri

	F değeri	P değeri	Anlamlılık Durumu
Model	5,900	0,0052	Anlamsız
A (Sıcaklık)	2,310	0,1591	Anlamsız
B (Basınç)	1,810	0,2083	Anlamsız
C (Özütleme süresi)	0,020	0,8852	Anlamsız
AB	0,940	0,3541	Anlamsız
AC	8,390	0,0159	Anlamlı
BC	0,043	0,8383	Anlamsız
A ²	22,560	0,0008	Anlamlı
B ²	0,200	0,6650	Anlamsız
C ²	20,740	0,0011	Anlamlı
Uyum eksikliği (Lack of fit)	1,000	0,4992	Anlamsız

Modelin uyumlu olup olmadığını ifade eden P değerlerine bakıldığında 0,05'ten büyük olan terimler ihmal edilir. Dolayısıyla model için dikkate alınması gereken terim AC (sıcaklık-zaman ikili etkileşimi) olup, A² ve C² değeri de modelin öngördüğü önemli parametrelerdir.

Özütleme verimi ile sıcaklık, basınç ve özütleme süresi arasındaki ilişkiyi gösteren R² değeri 1'e yakındır. Çizelge 5.11'de hesaplanan R², standart sapma ve varyasyon katsayısı değerleri verilmiştir.

Çizelge 5.11. Kaemferol için hesaplanan model istatistikleri

Standart sapma	2,02
C.V.% (Varyasyon katsayısı)	41,41
R ²	0,84

Kırmızı kantaron bitkisinden süperkritik CO₂ ile kaemferol özütlemesi Design Expert 11.1.2.0 programı ile elde edilen modelin kodlanmış değişkenler cinsinden eşitliği Eş.5.12'de verilmiştir.

$$\% \text{ kaemferol verimi} = 8,42 - 0,83*A + 0,73*B + 0,08*C - 0,69*AB - 2,07*AC - 0,15*BC - 2,53*A^2 - 0,24*B^2 - 2,42*C^2 \quad (5.12)$$

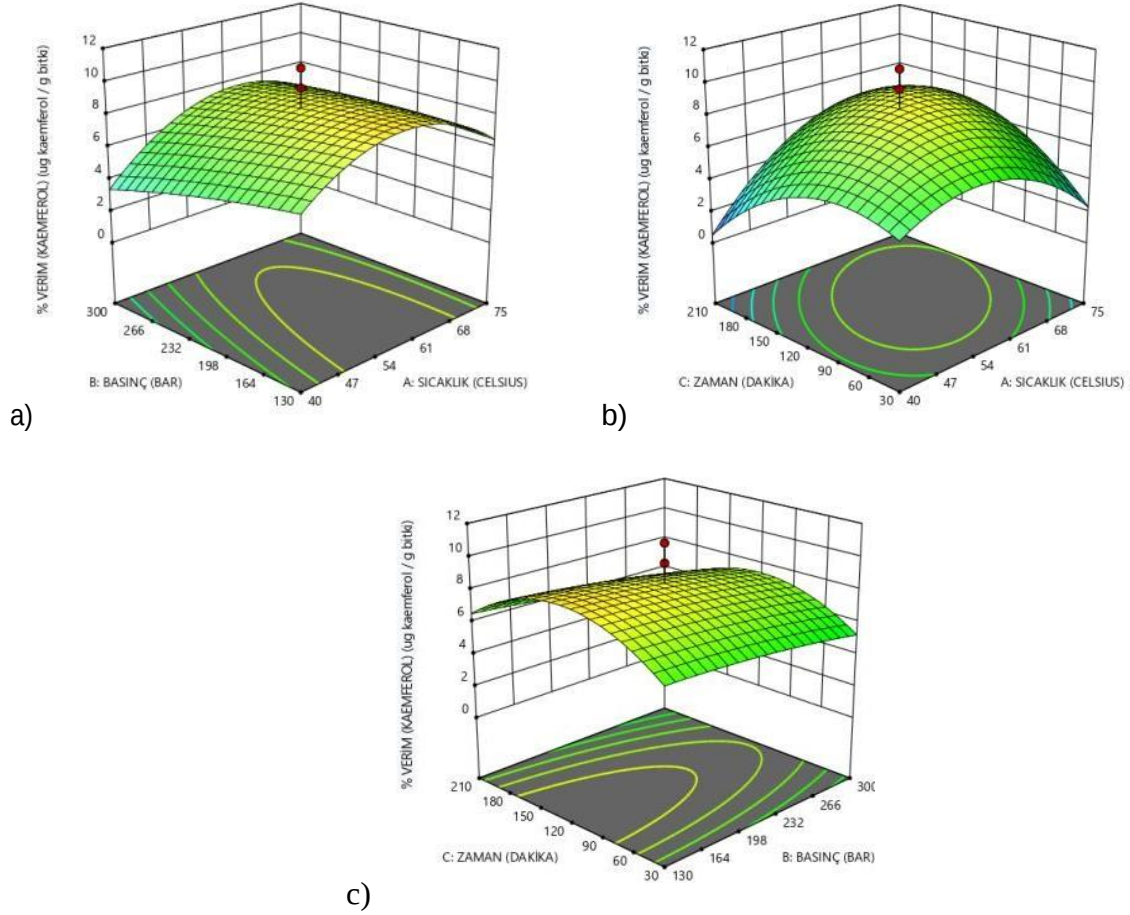
Eş.5.12'ye göre herbir parametrenin kaemferol özütleme sürecine etkisi ayrı ayrı incelenmiştir.

5.4.1. Kaemferol özüt verimine sıcaklık-basınç; sıcaklık-zaman; basınç-zaman parametrelerinin etkisi

Kırmızı kantaron bitkisinden süperkritik CO₂ ile kaemferol özütlemesi sürecine sıcaklık-basınç ikili etkisini hesaplamak için diğer özütleme süresi C=0 olarak alınmıştır. Eş.5.12 tekrar düzenlenerek Eş.5.13 elde edilmiştir.

$$\% \text{ kaemferol verimi} = 8,42 - 0,83*A + 0,73*B - 0,69*AB - 2,53*A^2 - 0,24*B^2 \quad (5.13)$$

Eş.5.13 incelendiğinde sıcaklık teriminin (A) negatif (-0,83<0) olması sıcaklık parametresinin artması kaemferol özütleme verimini olumsuz etkilemektedir. Basınç terimi (B) katsayısının pozitif olması (0,41>0), basınç parametresinin artması kaemferol özütleme verimini olumlu etkilemektedir. Sıcaklık-basınç ikili etkileşimine (AB) bakıldığında ise bu terimin önünde bulunan katsayının negatif olması (-0,61<0) kaemferol özütleme verimini düşürmektedir. Sıcaklık-basınç; sıcaklık-zaman; basınç-zaman ikili etkileşiminin rutin verimine etkisi Şekil 5.3'de verilmiştir.



Şekil 5.3. Kaemferol verimine a)basınç- sıcaklık; b)zaman- sıcaklık; c)zaman- basınç ikili etkileşiminin etkisi

Şekil 5.3.a incelendiğinde sıcaklık profili arttığında (40°C'dan 75°C'a) kaemferol özütleme veriminin arttığı daha sonra zamanla verimin düştüğü gözlenmiştir. Basınç arttığında (130bar'dan 300bar'a) kaemferol özütleme veriminin azaldığı görülmüştür. Basınç ile ilgili durum modelin vermiş olduğu Eş. 5.13 ile çelişmektedir. İkili etkileşim söz konusu olduğunda ekstraksiyon sistemi üzerinde basınç ve sıcaklık etkilerinin farklı sonuçlar gösterebilmektedir.

Süperkritik CO₂ ile kaemferol özütlemesi sürecine sıcaklık-zaman ikili etkisini incelemek için basınç terimi B=0 olarak alınmıştır. Eş. 5.12 tekrar düzenlenerek Eş. 5.14 elde edilmiştir.

$$\% \text{ kamferol verimi} = 8,42 - 0,83 \cdot A + 0,08 \cdot C - 2,07 \cdot AC - 2,53 \cdot A^2 - 2,42 \cdot C^2 \quad (5.14)$$

Eş.5.14 incelendiğinde sıcaklık teriminin (A) negatif ($-0,83 < 0$) olması sıcaklığın düşmesi sebebiyle kaemferol özütleme verimini olumlu etkilemektedir. Özütleme süresi teriminin (C) önünde bulunan katsayının pozitif olması ($0,08 > 0$), yani özütleme sürecini uzun tutmak kaemferol özütleme verimini olumlu etkilemektedir. Sıcaklık-zaman ikili etkileşimine (AC) bakıldığında ise bu terimin negatif olması ($-2,07 < 0$) kaemferol özütleme verimini düşürmektedir.

Zaman- sıcaklık ikili etkileşiminin kaemferol verimine etkisi Şekil 5.3.b’de verilmiştir. Şekil 5.3.b’ye bakıldığında sıcaklık arttıkça özütleme veriminin önce arttığı daha sonra zamanla azaldığı görülmektedir. Kaemferol verimi üzerinde sıcaklığın etkisi düşünüldüğünde bu beklenen bir durumdur. Sıcaklık artışı ekstraksiyon verimi üzerinde negatif etki göstermektedir.

Kırmızı kantaron bitkisinden süperkritik CO₂ ile kaemferol özütlemesi sürecine basınç-zaman ikili etkisini gözlemek için diğer bir parametre olan sıcaklık A=0 olarak alınmıştır. Eş.5.12 tekrar düzenlenerek Eş.5.15 elde edilmiştir.

$$\% \text{ kaemferol verimi} = 8,42 + 0,73*B + 0,08*C - 0,15*BC + 0,24*B^2 - 2,42*C^2 \quad (5.15)$$

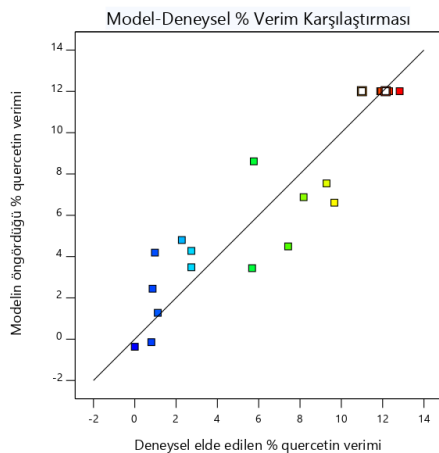
Eş.5.15 incelendiğinde basınç teriminin (B) pozitif ($0,73 > 0$) olması yani basınç parametresinin artması rutin özütleme verimini olumlu etkilemektedir. Özütleme süresi teriminin (C) pozitif olması ($0,08 > 0$), zamanla rutin özütleme verimini olumlu etkilemektedir. Basınç-zaman ikili etkileşimine (BC) bakıldığında ise bu terimin negatif olması ($-0,15 < 0$) rutin özütleme verimini düşürmektedir.

Zaman-basınç ikili etkileşiminin kaemferol verimine etkisi Şekil 5.3.c’de verilmiştir. Şekil 5.3.c’de görüldüğü gibi zamanla basıncın artması kaemferol özütleme verimini artırmaktadır. Fakat yüksek basınçta bu artışın düşük basınca nazaran daha az olduğu gözlenmiştir.

5.5. Kırmızı Kantaron Çiçeği Süperkritik CO₂ ile Özütleme Sürecinde Yüzey Cevap Analizi Optimizasyon Sonuçları

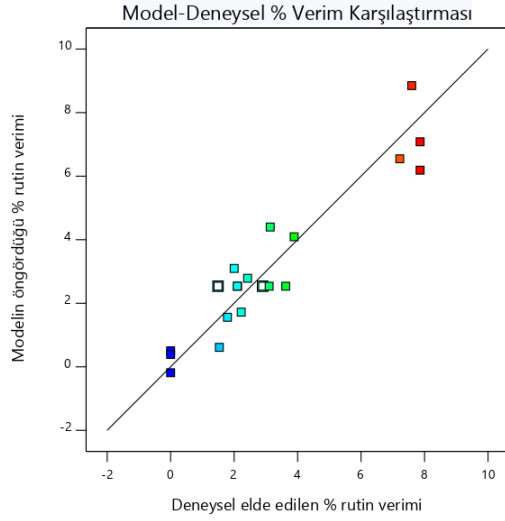
Yapılan deneysel çalışmalar ile aynı işletim koşulları için modelin öngördüğü veriler dikkate alınarak kuersetin, rutin ve kaemferol özütleri % verim değerleri sırasıyla Şekil 5.4-5.6 arasında sunulmuştur.

Deneysel tasarım programının önerdiği algoritma doğrultusunda yapılan 20 adet deneyin sonucunda elde edilen veriler ile oluşturulan modelin aynı koşullarda elde ettiği değerler arasındaki ilişki Şekil 5.4-5.6’da verilmiştir. Optimum koşullar düşük sıcaklık, yüksek basınç ve maksimum özütleme süresi olarak belirlendiğinde model ile deneysel verilerin uyumlu olduğu gözlenmiştir.



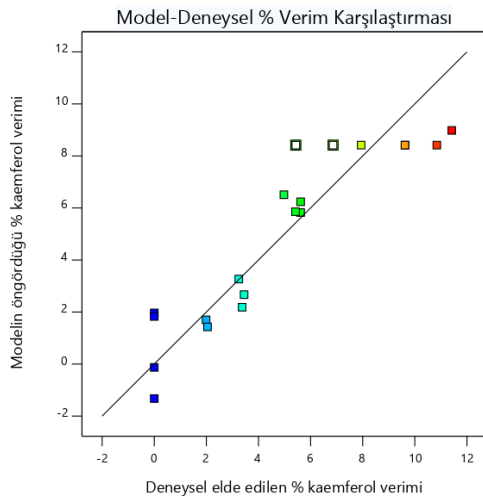
Şekil 5.4. Modelin öngördüğü ve deneylerden elde edilen kuersetinin % verim kıyaslaması

Kuersetin özütleme verimi için işletim koşulları maksimize edildiğinde optimum koşullar; 58,66 °C sıcaklık, 214,02 bar basınç ve 143,57 min özütleme süresi olarak bulunmuştur. Bu koşullardaki kuersetin özütleme verimi ise %14,21 bulunmuştur. Yapılan deneylerde ise maksimum özütleme verimi %12,83 bulunmuştur. Optimum koşullarda deneysel ve model verilerinin uyumlu olduğu görülmüştür.



Şekil 5.5. Modelin öngördüğü ve deneylerden elde edilen rutin % verim kıyaslaması

Rutin özütlemeye verimi için işletim koşulları maksimize edildiğinde optimum koşullar; 75 °C sıcaklık, 260,96 bar basınç ve 204,63 min özütlemeye süresi olarak bulunmuştur. Bu koşullardaki rutin özütlemeye verimi ise %8,54 bulunmuştur. Yapılan deneylerde ise maksimum özütlemeye verimi %7,86 bulunmuştur. Optimum koşullarda deneysel ve model verilerinin uyumlu olduğu görülmüştür.



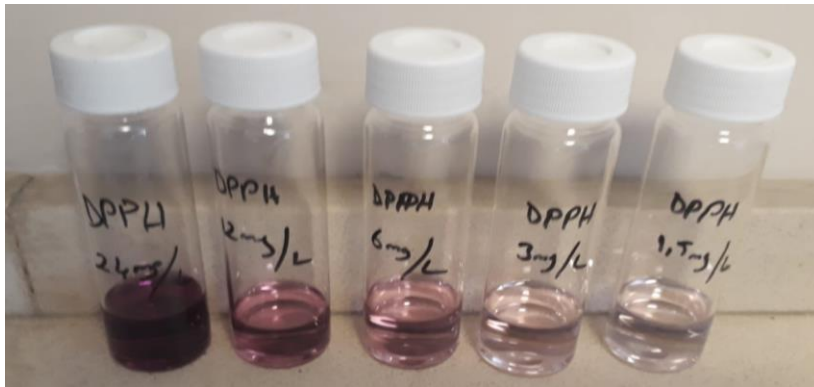
Şekil 5.6. Modelin öngördüğü ve deneylerden elde edilen kaempferol % verim kıyaslaması

Kaempferol özütlemeye verimi için işletim koşulları maksimize edildiğinde optimum koşullar; 58,21 °C sıcaklık, 220,72 bar basınç ve 134,68 min özütlemeye süresi olarak bulunmuştur. Bu

koşullardaki kuersetin özütlenme verimi ise %12,94 bulunmuştur. Yapılan deneylerde ise maksimum özütlenme verimi %11,42 bulunmuştur. Optimum koşullarda deneysel ve model verilerinin uyumlu olduğu görülmüştür.

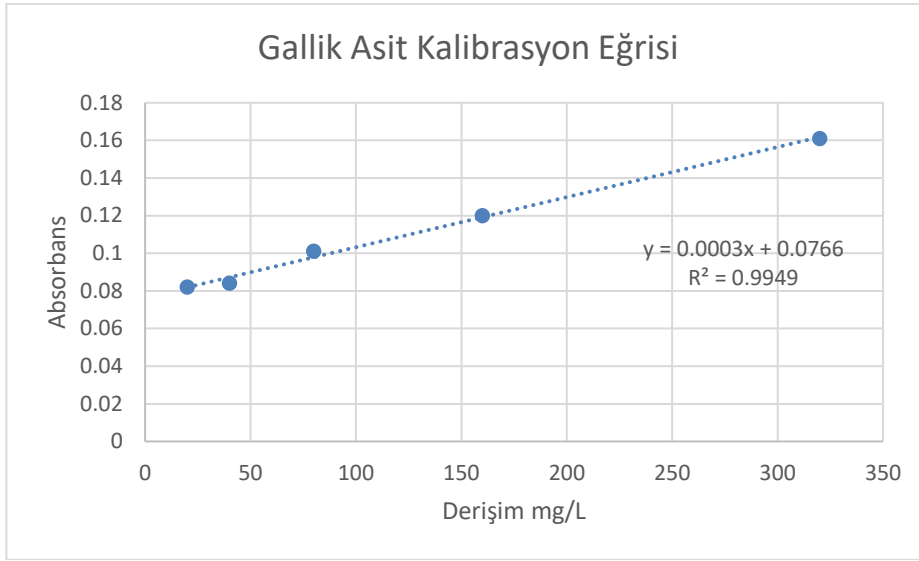
5.6. Kırmızı Kantaron Çiçeği Süperkritik CO₂ ile Özütlenme Sürecinde Elde Edilen Özütlerin Toplam Fenolik Madde Tayini Sonuçları

Toplam fenolik madde miktarı tayini Folin- Ciocalteu metodu ile yapılmıştır. Bu yöntemin ilkesi, fenolik bileşiklerin alkali ortamda Folin-Ciocalteu ayıracını indirgeyip, kendilerinin oksitlenmiş forma dönüştüğü bir redoks reaksiyonuna dayanmaktadır. Folin ayıracı ile muamele edildikten sonra oluşan mavi renk, spektrofotometrede 765 nm dalga boyunda referansa karşı okunmuştur. Örnekte ölçülen absorbans değerinin gallik asit cinsinden eş değeri olan fenolik bileşik miktarı, gallik asit ile hazırlanmış olan kalibrasyon eğrisi denkleminde hesaplanmıştır.



Resim 5.1. DPPH Kalibrasyonu için Hazırlanan Stok Çözeltiler

Örnekteki toplam fenolik bileşik miktarı "mg gallik asit/ L" cinsinden ifade edilmiştir. Deneysel çalışmalar sonucu elde edilen özütlerle ait bölüm 4.3.3.de bahsi geçen gallik asit kalibrasyon eğrisi grafiği Şekil 5.7. 'de verilmiştir.



Şekil 5.7. Gallik Asit Kalibrasyon Eğrisi Grafiği

Çizelge 5.12’ de süperkritik ve geleneksel soxhlet deneysel özütleme çalışmaları sonucunda elde edilen özütlerin (numunelerin) toplam fenolik madde miktarları gallik asit eşdeğeri (GAE) cinsinden verilmiştir. Süperkritik özütleme deneyleri (1-20) ile soxhlet özütleme deneyi toplam fenolik madde bakımından kıyaslandığında süperkritik özütleme numunelerinden elden edilen fenolik madde miktarları soxhlete göre oldukça fazladır. Bu sonuç literatür ile kıyaslandığında beklenen bir durumdur. Nitekim, Putra ve diğerleri (2018) yapmış oldukları çalışmada süperkritik özütleme soxhlet özütleme çalışmalarına kıyasla yüksek miktarda fenolik madde aktivitesine sahip olduğunu gözlemişlerdir.

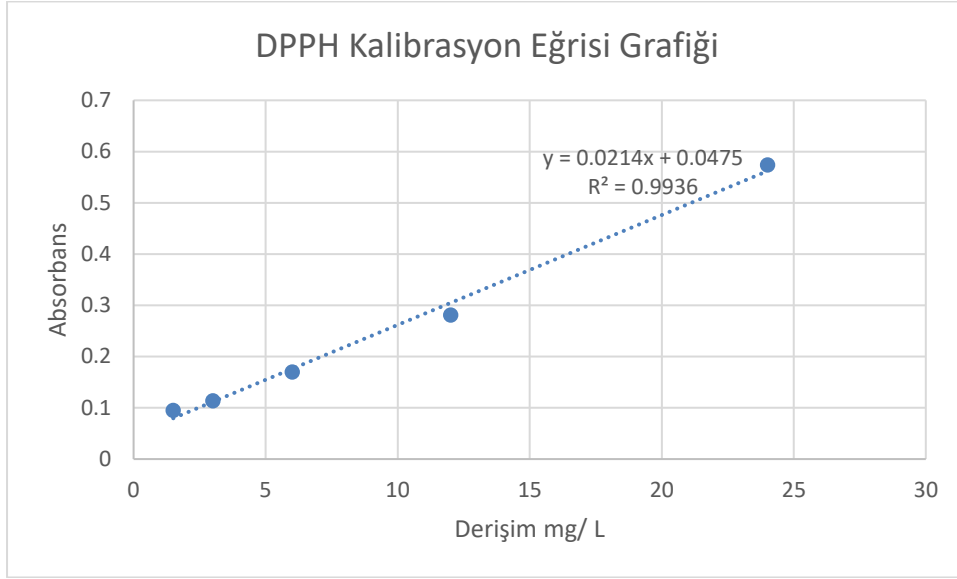
Çizelge 5.12. Süperkritik özütleme ve soxhlet deneyleri sonucu elde edilen özütlerin toplam fenolik madde miktarları

Numune No (std)	y=Abs	x=Derişim (µg/mL)	c*v=m	m (mg GAE)/ 100 g bitki
1	0,185	361,33	1084	27,10
2	0,166	298,00	894	22,35
3	0,408	1104,66	3314	82,85
4	0,247	568,00	1704	42,60
5	0,339	874,66	2624	65,60
6	0,241	548,00	1644	41,10
7	0,235	528,00	1584	39,60
8	0,358	938,00	2814	70,35
9	0,234	524,66	1574	39,35
10	0,408	1104,66	3314	82,85
11	0,106	98,00	1274	31,85
12	0,116	131,33	394	9,85
13	0,426	1164,66	3494	87,35
14	0,404	1091,33	3274	81,85
15	0,320	811,33	2434	60,85
16	0,426	1164,66	3494	87,35
17	0,385	1028,00	3084	77,10
18	0,198	404,66	1214	30,35
19	0,235	528,00	1584	39,60
20	0,505	1428,00	4284	107,10
Soxhlet	0,108	104,66	314	7,85

5.7. Kırmızı Kantaron Çiçeği Süperkritik CO₂ ile Özütleme Sürecinde Elde Edilen Özütlerin Toplam Antioksidan Madde Tayini Sonuçları

DPPH yöntemi ile toplam antioksidan miktarı Brand-Williams ve arkadaşları tarafından 1995 de geliştirilmiştir, bu tez çalışmasında çalışma koşulları metodun bir miktar revize edilmesi ile belirlenmiştir (Brand-Williams 1995). Kırmızı kantaron çiçeğinin süperkritik özütleme çalışmalarında antioksidan tayini yapmak için yararlanılan DPPH kalibrasyon

eğrisi grafiği Şekil 5.8.'de verilmiştir. Resim 5.1'de seyreltme yoluyla farklı derişimlerdeki stok çözeltiler hazırlanmıştır



Şekil 5.8. DPPH Kalibrasyon Eğrisi Grafiği

Çizelge 5.13'de süperkritik özütleme ve soxhlet deneyleri sonucu elde edilen özütlerin toplam antioksidan madde tayini sonuçları verilmiştir. Çizelge 5.13'te verilen analiz sonuçlarına göre 4 no'lu numune ile soxhlet IC50 derişimleri kıyaslandığında süperkritik özütleme deneyi sonucu elde edilen 4 no'lu verinin soxhlete göre çok daha iyi ($72,8 > 55,2$) sonuç verdiği gözlenmiştir

Çizelge 5.13. Süperkritik özütlemeye ve soxhlet deneyleri sonucu elde edilen özütlerin toplam antioksidan madde tayini sonuçları

Numune No (std)	y=Abs	x=Derişim (µg/mL)	IC50 (µg/mL)	%inhibisyon değerleri
1	0,511	17,88889	69,5	24,51994
2	0,466	16,16475	63,4	31,16691
3	0,313	10,30268	42,6	53,76662
4	0,535	18,80843	<u>72,8</u>	20,97489
5	0,225	6,931034	30,6	66,76514
6	0,377	12,75479	51,3	44,31315
7	0,369	12,44828	50,2	45,49483
8	0,250	7,888889	34,1	63,07238
9	0,263	8,386973	35,8	61,15214
10	0,354	11,87356	48,2	47,71049
11	0,221	6,777778	30,1	67,35598
12	0,495	17,27586	67,3	26,88331
13	0,249	7,850575	33,9	63,22009
14	0,214	6,509579	29,1	68,38996
15	0,341	11,37548	46,4	49,63072
16	0,364	12,25670	49,5	46,23338
17	0,424	14,55556	57,7	37,37075
18	0,395	13,44444	53,7	41,65436
19	0,486	16,93103	66,1	28,21270
20	0,297	9,689655	40,4	56,12999
Soxhlet	0,406	13,8659	<u>55,2</u>	40,02954
BHA	0,234	23,3838	23,4	74,36458
BHT	0,547	8,61547	63,7	30,45862

Çizelge 5.13 oluşturulurken kullanılan denklemler Eş. 5.16, Eş. 5.17 ve Eş. 5.18’de verilen denklemlerdenden elde edilmiştir.

$$\% \text{ inhibisyon} = [(A_r - A_{\text{num}}) / A_r] * 100 \quad (5.16)$$

$$\% \text{ inhibisyon BHA} = [(A_r - A_{\text{BHA}}) / A_r] * 100 \quad (5.17)$$

$$\% \text{ inhibisyon BHT} = [(A_r - A_{\text{BHT}}) / A_r] * 100 \quad (5.18)$$

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

A_{num} = Numune absorbans değeri

A_{BHA} = Bütillenmiş hidroksi anisol absorbans değeri

A_{BHT} = Bütillenmiş hidroksi toluen absorbans değeri

% antioksidan kapasiteleri BHA ve BHT metodları açısından göz önüne alındığında BHA ile elde edilen antioksidan aktivitesi DPPH yöntemine yakın, BHT ile elde edilen antioksidan aktivitesi ise daha düşüktür.

6. TARTIŞMA

Bu bölümde yapılan deneysel çalışmalar sonucunda tespit edilen optimum sonuçlar ve bunların literatürdeki çalışmalarla uyumluluğu incelenmiştir.

Çizelge 5.14’de tez çalışması kapsamında kırmızı kantaron çiçeklerinden SC-CO₂ ile özüt elde edilmesi şartları ile flavonoid, toplam antioksidan ve toplam fenolik madde tayinlerinde kullanılan analiz metotları kolay değerlendirilebilmesi açısından toplu halde verilmiştir.

Çizelge 5.14. Tez kapsamında Kırmızı Kantaron çiçeği ile yapılan çalışma koşulları

Deneyisel Tasarım Metodu	Özütleme Metodu	Değişken Parametreler	Sabit Parametreler	Analiz Metodu	Analiz Edilen Bileşen
-Design Expert Trial 11.1.2.0	SC-CO ₂	-P(bar) (72-357,9)	-Parçacık boyutu	-HPLC	-Kuersetin
--RSM (YYM)		-T(°C) (31-86,9)	(mm) (0,255-0,350)	-UV-VIS	-Rutin
---Central Composite Design		-t(min) (30-271,4)	-Kosolvent hacimsel miktarı(L/min) (0,14)	Spektro-fotometre	-Apigenin -Taksifolin -Kaemferol -Silibinin

Süperkritik özütlemeye deneylerinden elde edilen özütler (1-20) ve soxhlet özütlemeye yöntemi sonucunda hesaplanan % inhibisyon (antioksidan aktivitesi) değerleri Çizelge 5.17’de verilmiştir. Her iki özütlemeye yöntemi kıyaslandığında antioksidan aktiviteleri ve toplama fenolik bileşen miktarları soxhlet özütlemesinde daha düşük değerlerde bulunmuştur. Bunun nedeni soxhlet özütlemesinde solventin kaynama noktasında uzun süre beklenmesi ve termohassasiyete sahip antioksidanların ve fenolik maddelerin bu sıcaklıklarda bozunması olarak yorumlanabilir. Barzotto ve arkadaşlarının (2019) yapmış oldukları çalışma da bu yorumu desteklemektedir.

Çizelge 5.15. SC-CO₂ ve Soxhlet (EtOH ile) özütlemesi karşılaştırılması

	SC-CO ₂ için optimum şartlar bar; °C; min	R ² Değerleri	SC-CO ₂ için % verim (µg flavonoid /g bitki)	Soxhlet (EtOH ile) Özütlemesi için % verim (µg flavonoid /g bitki)
Kuersetin	57,5; 215; 120	0,86	12,8300	165,90
Rutin	75; 130; 210	0,89	7,8600	77,82
Kaemferol	57,5; 215; 120	0,84	16,5914	48,88
Toplam flavonid (KU+R+KA+A+S+T)	57,5; 215; 120	0,64	81,4679	270,14
Toplam fenolik madde	57,5; 215; 120	0,99	107,1 mg GAE/100 g bitki	7,85 mg GAE/100 g bitki
Toplam antioksidan madde	57,5; 215; 271,361	0,99	72,8 µg/mL	55,20 µg/mL

Çizelge 5.15’de SC-CO₂ ve soxhlet özütlemesi karşılaştırılması değerleri verilmiştir.

Apigenin, silibinin ve taksifolin flavonoidleri kendi optimum şartlarında yüksek değerlerde elde edilmiştir, ancak kırmızı kantaron çiçeğinde bahsi geçen flavonoidler Design Expert Trial 11.1.2.0 programında incelendiğinde modele uygun olmadığı ve quadratik bir maksimum değer vermediği için kayda değer grafikler oluşmamıştır ve bunlar ile ilgili grafiklere tez çalışmasında yer verilmemiştir.

Bimakr ve arkadaşları (2011) yapmış oldukları çalışmada SC-CO₂ metodu ile özüt elde etmiş ayrıca HPLC metodu ile de flavonoid verimini araştırmışlardır ve bu çalışmada etanol kosolvent kullanımının flavonoid verimini artırdığını belirtilmiştir (Bimakr ve diğerleri, 2011). Araştırılan flavonoidlerin polar yapıda olmasının ve kosolvent olarak polar bir yapıda olan etanol kullanımının (tez çalışmasındaki kırmızı kantaronun flavonoidleri gibi) bu durum üzerinde pozitif etkisi olmaktadır. Ayrıca Seal (2016) yapmış olduğu çalışmada bu yorumu desteklemiştir.

Çizelge 5.16’da ise yapılan çalışmalar sonucunda flavonoidlerin elde edildiği optimum koşullar ile toplam fenolik ve toplam antioksidan maddelerin elde edildiği optimum koşullar toplu halde verilmiştir. (CO₂ akış hızı 3 mL/ min için)

Çizelge 5.16. Tez kapsamında yapılan çalışmalar için SC-CO₂ optimum flavonoid eldesi

Şartları	Sıcaklık (°C)	Basınç (bar)	Özütleme süresi (min)	Kosolvent Akış hızı (mL/min)	% verim (µg flavonoid /g bitki)
Kuersetin	57,5	215	120	0,14	12,8300
Rutin	75	130	210	0,14	7,8600
Kaemferol	57,5	215	120	0,14	16,5914
Toplam flavonid	57,5	215	120	0,14	81,4679
Toplam fenolik madde	57,5	215	120	0,14	107,1000 mg GAE/100 g bitki
Toplam antioksidan madde	57,5	215	271,361	0,14	72,8000 µg/mL

Bouyahya ve arkadaşları (2017) yapmış oldukları çalışmada kırmızı kantaron çiçeklerinden maserasyon yöntemi ile etanol, metanol, etil asetat ve n-hekzanla özüt elde etmişlerdir. Folin-Coicalteu metodu ile toplam fenolik madde tayinlerine bakıldığında sırası ile $69,42 \pm 0,55$ mg GAE/ g bitki; $105,54 \pm 0,84$ mg GAE/ g bitki; $23,21 \pm 0,34$ mg GAE/ g bitki; $95,61 \pm 0,64$ mg GAE/ g bitki olarak verilmiştir (Bouyahya ve diğerleri, 2017). Çizelge 5.16’da görüleceği gibi kırmızı kantaron çiçeklerinden etanol kosolventi SC-CO₂ özütlemesinde optimum sonuç $107,1$ mg GAE/ g bitki bulunmuştur. SC-CO₂ ile özütleme metodunu toplam fenolik madde tayininde literatüre göre klasik maserasyon metodundan daha başarılı olduğu görülmektedir. Yapılan tez çalışması bu yorumları destekler niteliktedir.

Dorđević ve arkadaşları (2017) yaptıkları çalışmada kırmızı kantaron bitkisinin çiçeklerinin metanolik özütlerinde Folin-Ciocalteu metoduna göre toplam fenolik karakterizasyonu yapılmış ve $25,13 \pm 0,45$ mg gallik asit/g bulunmuştur, DPPH metoduna göre toplam antioksidan madde tayini yapılmıştır ve ardından toplam flavonoid içeriği incelenip $67,86 \pm 2,10$ mg kuersetin/ g kuru özüt olarak bulunmuştur. Rutin miktarı $65,8 \pm 4,6$ µg/ g kuru özüt, kuersetin miktarı 4 ± 1 µg/ g kuru özüt, apigenin miktarı $6,8 \pm 0,4$ µg/ g kuru özüt, kaemferol miktarı ise $0,6 \pm 0,1$ µg/ g kuru özüt olarak belirtilmiştir. Ancak tez çalışmasında bulunan verilerden (Çizelge 5.16) gerek toplam fenolik madde miktarının; gerek kuersetin, apigenin ve kaemferol verimlerinin; gerekse toplam antioksidan madde miktarlarının oldukça yüksek olması etanol kosolventli SC-CO₂ özütlemesi metodunun; metanol ile klasik özütleme metoduna göre oldukça başarılı olduğu anlamında gelmektedir. Bala ve arkadaşları (2016) yapmış oldukları çalışmada basıncın artmasıyla süperkritik akışkanın yoğunluğunun ve dolayısı ile çözme gücünün arttığını belirtmişlerdir, basıncın özüt verimini pozitif lineer şekilde etkilediğini belirtmişlerdir.

Düşük basınçta özütleme yapılırken basınçtaki artışın özüt verimini artırdığını; fakat yüksek basınçta çalışırken basınç ve sıcaklığın artmasının özüt verimini azalttığını belirtmişlerdir. Çok yüksek basınçta verim azalmasını yüksek oranda sıkıştırılmış CO₂ çözünen maddeler arası itici güçten kaynaklanabileceğini vurgulamışlardır.

Çizelge 3.1’de çalışma bilgileri verilen Jiao ve arkadaşlarının (2009) yapmış olduğu çalışmada keten tohumundan SC-CO₂ metodu ile özüt eldesi işlemi ile kırmızı kantaron bitkisi çiçeklerinden SC-CO₂ metodu ile özüt eldesi tez çalışması karşılaştırıldığında Jiao ve arkadaşlarına (2009) göre optimum çalışma değerleri P(bar)= 410; T(°C)= 56; t(min)= 180; CO₂ akış hızı (L/min)=0,516; partikül büyüklüğü (mm)=0,45- 0,90 olarak verilmiştir; tez çalışmasında ise daha düşük basınç (215 bar) (*daha düşük enerji ve maliyet*) ; hemen hemen aynı sıcaklık (57,5) ; daha kısa süre (210 min) (*daha düşük enerji ve maliyet*); daha düşük partikül büyüklüğü (0,255-0,350 mm) (*daha fazla kütle aktarım yüzeyi*); daha yüksek CO₂ akış hızı (3 L/min) olarak bulunmuştur. Tez çalışması söz konusu literatür çalışması ile kıyaslanmak istendiğinde tam olarak şartlar birebir kıyaslanamasa bile (*örneğin CO₂ akış hızları farkı dengeyi bozmaktadır*), tez çalışmasının daha verimli görünmesinin sebebi SC-CO₂ özütlemesinde ek olarak EtOH kosolvent kullanılması olduğu söylenebilir. Zira İçen 2008’de yayınlanan doktora tezi çalışmasında kosolvent EtOH kullanımının özüt verimini kullanılmayan duruma kıyasla 7,5 kat artırdığını belirtmiştir.

7. SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ VE ÖNERİLER

Yapılan literatür araştırması sonucu kosolvent etkili süperkritik özütleme ortamında kırmızı kantaron bitkisiyle ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu amaçla kırmızı kantaron bitkisi temin edildikten sonra istenilen partikül büyüklüğüne getirilmiş (250-355 µm) öğütme işlemi gerçekleştirilmiş, deneysel çalışmalar için hazır hale getirilmiştir. Çalışma şartları (basınç, sıcaklık ve özütleme süresi min ve max değerleri) belirlenmiş olup CO₂ akış hızı ve etanol kosolvent akış hızı sabit tutulmuştur. Deneysel tasarım programı ile deneysel çalışma şartları (basınç, sıcaklık ve özütleme süresi değişkenlerin Design Expert programı belirlemektedir) belirlenmiş 20 farklı deney farklı işletim şartlarında gerçekleştirilmiştir. Süperkritik özütleme deneyleri sonucunda elde edilen her bir özütün (numunenin) HPLC ile analizi yapılarak % verim değerleri hesaplanmıştır.

Yapılan deneysel çalışmalar sonucunda bitkinin kuersetin, rutin, kaemferol, apigenin, silibinin ve taksifolin flavonoidlerini ihtiva ettiği gözlenmiştir. Fakat apigenin, silibinin ve taksifolin kendi işletim şartlarında belli miktarlarda elde edilmesine rağmen programın öngördüğü modelle uyumlu olmadığı görülmüştür. Yapılan çalışmalarda deneysel tasarım programıyla yüzey cevap yöntemi kullanılmış kuersetin, rutin ve kaemferol için anlamlı quadratik modeller elde edilmiştir. Çalışmalar sonucunda sıcaklık-basınç, basınç-özütleme süresi ve sıcaklık-özütleme süresi profilleri elde edilerek yorumlanmıştır. Deneysel çalışma koşullarında maksimum kuersetin, rutin ve kaemferol verimleri sırasıyla 12,83 µg/g, 7,86 µg/g, 11,42 µg/g elde edilmiştir. Bu flavonoidlerin verimleri program tarafından optimize edildiğinde sırasıyla 14,21 µg/g, 8,54 µg/g, 12,94 µg/g sonuçları bulunmuştur. Deneysel tasarım programının öngördüğü modelsel veriler ile deneysel verilerin birbiriyle büyük oranda uyumlu olduğu sonucuna varılmıştır. Süperkritik ekstraksiyon çalışmalarında özütleme veriminin özütleme süresi ile doğru orantılı olarak arttığı gözlenmiş belli bir çalışma süresi sonunda verimin sabitlendiği ya da kısmen de olsa düştüğü gözlenmiştir. Sıcaklık arttığında özütleme verimi önce artmış daha sonra düşmeye başlamıştır. Bunun nedeni yüksek sıcaklıklarda karbon dioksit yoğunluğunun düşmesi olarak yorumlanmıştır. Basınç arttığında ise özütleme verimi artmış, karbon dioksit yoğunluğunun artmasıyla gazın numune içindeki gözeneklerden sürüklenmesi daha kolay olmuştur.

Toplam fenolik madde ve toplam antioksidan madde tayinleri için kırmızı kantaron bitkisinin hem süperkritik özütleme ortamında hem de klasik özütleme yöntemiyle (Soxhlet) elde edilen numunelerin analizinde Folin-Coicicaultu ve DPPH metodları kullanılmıştır.

UV- spektrofotometre yardımıyla absorbans değerleri okunmuştur. Toplam fenolik madde tayini gallik asit eşdeğeri cinsinden hesaplanmıştır. Kırmızı kantaron bitkisinden her iki özütlemeye yöntemleri ile elde edilen özütlerde antioksidan aktivitelerinin oldukça yüksek kapasitede olduğu gözlenmiştir. Süperkritik özütlemeye ve klasik özütlemeye (soxhlet) yöntemleri toplam fenolik madde tayini açısından kıyaslandığında süperkritik özütlerinin fenolik madde miktarları bakımından soxhlete göre daha az olduğu tespit edilmiştir. Toplam antioksidan aktiviteleri kıyaslandığında klasik yöntem ile süperkritik özütlemeye metodunun birbirine yakın antioksidan etki gösterdiği bulunmuştur. Bunun sebebi soxhlet özütlemesinde kaynama sıcaklığındaki etanolün termal olarak kararsız antioksidan maddelere zarar vermesi olabilir. Bu sonuçlar araştırma bulguları kısmında da detaylıca yorumlandığı gibi literatürde yapılan çalışmalarla paralellik göstermektedir. Soxhlet ekstraksiyonu flavonoid bazında daha yüksek verimli gibi görünse de SC-CO₂ özütlemesi ile karşılaştırıldığında en önemli dezavantajları, uzun zaman gerektirmesi ve büyük miktarda organik solvent kullanılmasıdır. Çok miktarda solventin zararsız hale getirilmesi pahalıdır ve çevreye zarar vermektedir.

Yapılan tez çalışmasının hem deneysel tasarım programının özütlemeye verimi sonuçlarının değerlendirilmesiyle detaylı çıkarımlar sağlaması açısından, hem de toplam fenolik madde-antioksidan madde tayinleri açısından dünya literatürüne önemli katkılar sağladığı düşünülmektedir. Endüstriyel boyutta özellikle kimya, kimya mühendisliği, eczacılık ve tıp alanlarında bitkilerden ilaç etken madde eldesi bakımından süperkritik ekstraksiyon yönteminin çevreci, yeşil, inovatif katkıları göz önünde bulundurulduğunda, tezde geliştirilen deneysel tasarım metodunun özütlemeye verimi sonuçlarının yorumlanmasında ve toplam fenolik madde-toplam antioksidan madde tayini metodlarının kullanılmasında özgün ve nitelikli bir çalışma olduğu düşünülmektedir. Akademik çalışmalar göz önüne alındığında bu tez çalışmasının bundan sonraki yüksek lisans, doktora ve literatür çalışmalarına ışık tutacağı öngörülmektedir.

KAYNAKLAR

- Ara, K.M., Raofie, F. (2019). Application of response surface methodology for the optimization of supercritical fluid extraction of essential oil from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, *Journal of Food Scientists & Technologists* 53(7), 3113–3121.
- Araus, A.K., Casado, V., del Valle, J.M., Robert, P.S., de la Fuented, J.C. (2019). Cosolvent effect of ethanol on the solubility of lutein in supercritical carbon dioxide, *The Journal of Supercritical Fluids* 14(3), 205–210
- Ariff, M.A.M., Yusri, A.M., Razak, N.A.A. and J. Jaapar, J. (2018). Effect of CO₂ flow rate, co-solvent and pressure behavior to yield by supercritical CO₂ extraction of Mariposa Christia Vespertilionis leaves. *AIP Conference Proceedings*.
- Atar, H. ve Çölgeçen, H. (2013). Bitki Doku Kültüründe İridoit Glikozitler. *Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 25(3), 115-133.
- Bala, M., Madhu, B., Tyagi, S.K., Gupta, R.K. (2016) Optimization of Supercritical CO₂ Extraction of Safflower Seed Oil Using Response Surface Methodology, *Asian Journal of Chemistry*, 28(7) , 1579-1583
- Ballesteros-Vivas, D., Mendiola, J.A., Ibanez, E. (2019). Extraction, Supercritical Fluid Extraction. *Encyclopedia of Analytical Science*, 2(3), 127-133.
- Banjanac, T., Dragicevic, M., Siler, B., Gasic, U., Bohanec, B., Jasmina Nestorovic Zivkovic, J. Misic, D. (2017). Chemodiversity of two closely related tetraploid Centaurium species and their hexaploid hybrid: Metabolomic search for high-resolution taxonomic classifiers. *Phytochemistry*, 2 (140), 27-44.
- Barzotto, I.L.M., Santos, K.A., Antonio da Silvaca, E., Sene, A.C., da Silva, N.S.,Vieira, L. (2019) Supercritical extraction of *Eugenia involucrata* leaves: Influence of operating conditions on yield and α -tocopherol content. *The Journal of Supercritical Fluids*, 143, 55–63.
- Bimakr, M., Rahman, R.A., Ganjloo, A., Taip, F.S., Salleh, L., Sarker, Z.I. (2012). Optimization of Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Bioactive Flavonoid Compounds from Spearmint (*Mentha spicata* L.) Leaves by Using Response Surface Methodology, *Food Bioprocess Technology*, 5, 912–920
- Bouyahya, A., Bakri, Y., Belmehdi, O., Et-Touys, A. (2017). Phenolic extracts of Centaurium erythraea with novel antiradical, antibacterial and antileishmanial activities. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 7(7), 433-439.
- Bouyahya, A., Bakri, Y., Et-Touys, A., Assemian, I.C.C., Abrini, J. ve Dakka, N. (2018). In vitro antiproliferative activity of selected medicinal plants from the North-West of Morocco on several cancer cell lines. *European Journal of Integrative Medicine*, 18, 23-29.
- Bouyahya, A., Belmehdi, O., El Jemli, M., Marmouzi, I., Bourais, I., Abrini, J. Bakri, Y. (2019). Chemical variability of *Centaurium erythraea* essential oils at three developmental stages and investigation of their *in vitro* antioxidant, antidiabetic, dermatoprotective and antibacterial activities. *Industrial Crops & Products*, 132, 11-117.

- Božunović, J., Živković, S., Gašić, U., Glamočlija, J., Ćirić, A., Matekalo, D. Danijela Mišić, D. (2018). In vitro and in vivo transformations of Centaurium erythraea secoiridoid glucosides alternate their antioxidant and antimicrobial capacity. *Industrial Crops & Products*, 111, 705–721.
- Budisa, N. and Schulze-Makuch, D. (2014). Supercritical carbon dioxide and its potential as a life-sustaining solvent in a planetary environment. *Life*, 4(3), 331-340.
- Calderón-Montaña, J.M., Burgos-Morón, E., Pérez-Guerrero, C. ve López-Lázaro, M. (2011). A review on the dietary flavonoid kaempferol. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 11, 298-344.
- Caleja, C., Ribeiro, A., Barreiro, A.F. and Ferreira, I.C.F.R. (2017). Phenolic compounds as nutraceuticals or functional food ingredients. *Current Pharmaceutical Design*, 23, 2787-2806.
- Chandramohan, G., Al-Numair, K.S., Alsaif, M.A. ve Veeramani, C. (2015). Antidiabetic effect of kaempferol a flavonoid compound, on streptozotocin-induced diabetic rats with special reference to glycoprotein components. *Progress in Nutrition*, 17 (1), 50-57.
- Cvjetko, M., Joki, S., Lepojevi, I., Vidovi, S., Mari, B., Redovnikovi, I.R. (2012) Optimization of the Supercritical CO₂ Extraction of Oil from Rapeseed Using Response Surface Methodology *Food Technology Biotechnology* 50 (2) 208–215.
- Dinda, B., Dinda, M., Kulsi, G., Chakraborty, A. ve Dinda, S. (2019). Therapeutic potentials of plant iridoids in alzheimer's and parkinson's diseases: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 169, 185-199.
- Dorđević, M., Mihailovića, M., Jovanović, J.A., Grdović, N., Uskoković, A., Tolić, A. Dinić, S. (2017). Centaurium erythraea methanol extract protects red blood cells from oxidative damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 202, 172-183.
- Doker, O., Salgin, U., Yildiz, N., Aydogmus, M. ve Calimli, A. (2010). Extraction of sesame seed oil using supercritical CO₂ and mathematical modeling. *Journal of Food Engineering*, 97, 360-366.
- Ganeshpurkar, A., Saluja, A.K. (2017). The Pharmacological Potential of Rutin. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 25, 149-164.
- Gjoshe, S., Biljana, M., Suzana, D.-K., Jasmina, P.S., Marina, S., Gordana, P. Svetlana, K. (2014). Chemical characterization of Centaurium erythraea L. and its effects on carbohydrate and lipid metabolism in experimental diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, 152, 71–77.
- Hicks C. R. Ve Turner K. V. (1999). Fundamental concepts of in the design of experiments, Oxford University Press.
- Jelena, B., Suzana, Z., Uros, G., Jasmina, G., Ana, C., Dragana, M. Danijela, M. (2018). In vitro and in vivo transformations of Centaurium erythraea secoiridoid glucosides alternate their antioxidant and antimicrobial capacity. *Industrial Crops & Products*, 111, 705–721.

- Jiao, S.S., Li D., Huang, Z.G., Zhang, Z.S., Bhandari, B., Chen, X.D., Mao, Z.H. (2008). Optimization of Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Flaxseed Oil Using Response Surface Methodology, *International Journal of Food Engineering*, 4 (4), 6-16.
- Johner, J.C.F. ve Meireles, M.A. (2016). Construction of a supercritical fluid extraction (SFE) equipment: validation using annatto and fennel and extract analysis by thin layer chromatography coupled to image. *Food Science and Technology*, 36 (2).
- İçen, H. (2008). *Süperkritik Karbondioksit Ekstraksiyon Metodu ile Atık Çay Lifleri ve Saplarından Kafein Eldesi*, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Kachmar, M.R., Oliveira, A.P., Valentão, P., Gil-Izquierdoc, A., Domínguez-Perlesc, R., Ouahbi, A. Federico Ferreres, F. (2019). HPLC-DAD-ESI/MS phenolic profile and in vitro biological potential of Centaurium erythraea Rafn aqueous extract. *Food Chemistry*, 278, 424-433.
- Kavoura, D., Kyriakopoulou, K., Papaefstathiou, G., Spanidi, E., Gardikis, K., Loulia, V. Magoulas, K. (2019). Supercritical CO₂ extraction of *Salvia fruticosa*. *The Journal of Supercritical Fluids*, 146, 159-164.
- Khaw, K.Y., Parat, M.O., Shaw, P.N. ve Falconer, J.R. (2017). Solvent Supercritical Fluid Technologies to extract bioactive compounds from natural sources: A review. *Molecules*, 22, 1186-1208.
- Kolaç, T., Gürbüz, P., ve Yetiş, G. (2017). Doğal ürünlerin fenolik içeriği ve antioksidan özellikleri. *Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Dergisi*, 5 (1), 26-42.
- Kumar, R., Vijayalakshmi, S., Nadanasabapathi, S. (2017). Health Benefits of Quercetin, *Defence Life Science Journal*, 2 (2), 142-151
- Lee, W. (1975). Experimental designs and analysis. San Francisco: W. H. Freeman and Company.
- Li, Y., Yao, J., Han, C., Yang, J., Chaudhry, M.T., Wang, S. Yin, Y. (2016). Kuersetin, Inflammation and Immunity. *Nutrients*, 8 (2), 167-181.
- Li, Y., Zhang, T. ve Chen, G.Y. (2018). Flavonoids and colorectal cancer prevention. *Antioxidants*, 7 (3), 187-214.
- Liliya, S., Iryna, D., Olena P., Svitlana, M. (2017). Polysaccharides in Centaurium Erythraea Rafn., *International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy*, 2 (5), 45-55.
- Lima, M.C., Paiva de Sousa, C., Fernandez-Prada, C., Harel, J., Dubreuil, J.D., de Souza, E.L. (2019). A review of the current evidence of fruit phenolic compounds as potential antimicrobials against pathogenic bacteria. *Microbial Pathogenesis*, 130, 259-270.
- Liu, J., Ji F., Chen, F., Guo, W., Yang, M., Huang, S., Zhang, F., Liu, Y. (2018). Determination of garlic phenolic compounds using supercritical fluid extraction coupled to supercritical fluid chromatography/tandem mass spectrometry, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 159, 513–523.

- Madunic, J., Madunic, I.V., Gajski, V., Popic, J., Garaj-Vrhovac, V. (2018) Apigenin: A dietary flavonoid with diverse anticancer properties , *Cancer Letters*, 6 (5),413-428.
- Matekaloa, D., Skorić M., Nikolić, T., Novaković, N., Lukić, M., Jelena Božunović, J. Mišić, D. (2018). Organ-specific and genotype-dependent constitutive biosynthesis of secoiridoid glucosides in *Centaurea erythraea* Rafn, and its elicitation with methyl jasmonate. *Phytochemistry*. 155, 69–82.
- Milan, D., Branislav, S., Uros, G., Borut, B., Jasmina, N.Z., Snezana, T. Danijela, M. (2017). Chemodiversity of two closely related tetraploid *Centaurea* species and their hexaploid hybrid: Metabolomic search for high-resolution taxonomic classifiers. *Phytochemistry*, 140, 27-44.
- Nugent, M.D. (2019). Oxidative stress. *The Southwest Respiratory and Critical Care Chronicles*, 27, 1-3.
- Nuralın, L. (2018). *Yağlı tohumlardan süperkritik karbon dioksit yöntemiyle ilaç etken bileşenlerinin özütlenmesi*, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Özcan, O., Erdal, H., Çakırca, G. ve Yönden, (2015). Oksidatif stres ve hücre içi lipid, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 6 (3), 331-336.
- Özkal, S.G. (2009). Response Surface Analysis and Modeling of Flaxseed Oil Yield in Supercritical Carbon Dioxide, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 86, 1129–1135.
- Pal, M., Misra, K., Dhillon, G. ve VerMa, M. (2014). Antioxidants. *Springer Science-Business Media New York*, 3 (4), 56-63..
- Parhi, R. And Suresh, P. (2013). Supercritical fluid technology: A review. *Advanced Pharmaceutical Science And Technology*, 1 (1), 28-37.
- Pimentel-Moral, S., Borrás-Linares, I., Lozano-Sanchez, J., Arraez-Roman, D., Martínez-Ferez, A. ve Segura-Carretero, A. (2019). Supercritical CO₂ extraction of bioactive compounds from *Hibiscus sabdariffa*. *The Journal of Supercritical Fluids*, 147, 213-221.
- Putra, N.R., Abdul-Aziz, A.H., Yian, L.N., Ramli, W.D. ve Yunus, M.A.C. (2018). Optimization of supercritical carbon dioxide and co-solvent ethanol extraction of wasted peanut skin using response surface methodology. *MATEC Web of Conferences*, 6 (8), 84-96.
- Rafaely, N. L., Adauto, S. R., Lucio, C.F., Diógenes, V. and Pericles, B. A. (2019). Extraction from leaves of *piper klotzschianum* using supercritical carbon dioxide and co-solvent. *The Journal of Supercritical Fluids*, 147, 205–212.
- Roj, E.(2014). Plant material extraction using supercritical CO₂. *Polish Foundations of the Opportunities Industrialization Centers*, 5 (1), 62-74.

- Salleh, L., Rahman, R.A., Selamat, J., Hamid, A., Sarker Z.I. (2013) Optimization of Extraction Condition for Supercritical Carbon Dioxide (SCCO₂) Extraction of *Strobilantes crispus* (Pecah Kaca) Leaves by Response Surface Methodology, *Journal of Food Processing & Technology*, 4(1), 36-45.
- Seal, T. (2016) Quantitative HPLC analysis of phenolic acids, flavonoids and ascorbic acid in four different solvent extracts of two wild edible leaves, *Sonchus arvensis* and *Oenanthe linearis* of North-Eastern region in India, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 6 (2), 157-166.
- Sefi, M., Fetoui, H., Lachkar, N., Tahraoui, A., Lyoussi, B., Boudawara, T. Zeghala, N. (2011). *Centaurium erythraea* (Gentianaceae) leaf extract alleviates streptozotocin-induced oxidative stress and-cell damage in rat pancreas. *Journal of Ethnopharmacology*, 135(2), 243–250.
- Stefkov, G., Miov, B., Dinevska-Kjovkarovska S., Petreska Stanoeva, J., Stefova, M., Petrusevska, G., Kulevanova S. (2014), Chemical characterization of *Centaurium erythraea* L. and its effects on carbohydrate and lipid metabolism in experimental diabetes, *Journal of Ethnopharmacology*, 152 71–77
- Stoiko, L., Iryna, D., Olena, P. ve Svitlana, M. (2017). Polysaccharides in *centaurium erythraea* rafn. *Int. J. Res. Ayurveda Pharm.*, 8(2), 45-54.
- Stoiko, L. ve Kurylo, K. (2018). Development of optimal technology of alcohol extract *centaurium erythraea* rafn. *Herb. Archives of the Balkan Medical Union*, 53(4), 523-528.
- Sür, A. (2017). Süperkritik karbondioksit ekstraksiyonu ile ekstrakte edilen menengiç (*pistacia terebinthus* l.) ekstraktının ve yağının incelenmesi. (Yayınlanmamış yüksek lisans tezi). *Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı*, Ankara.
- Tirado, D.F., Tenorio, M.J., Cabañas, A. ve Calvo, L. (2018). Prediction of the best cosolvents to solubilise fatty acids in supercritical CO₂ using the Hansen solubility theory. *Chemical Engineering Science*, 190, 14-20.
- Tonato, D., Luft, L., Confortin, T.C., Zabet, G.L. ve Mazutti, M.A. (2019). Enhancement of fatty acids in the oil extracted from the fungus *Nigrospora* sp. by supercritical CO₂ with ethanol as a cosolvent. *The Journal of Supercritical Fluids*, 146, 180-188.
- Tuna, Ş. (2006). *Süperkritik akışkan ortamında farmasötik maddelerin tanecik oluşumunun incelenmesi*. Yüksek lisans tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Raofie1, F. (2016). Application of response surface methodology for the optimization of supercritical fluid extraction of essential oil from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel Katayoun Mahdavi Ara1, *Journal Food Science Technology* 53(7), 3113–3121.
- Yadav, A., Kumari, R., Yadav, A., Mishra, J.P., Srivastva, S., Prabha, S. (2016). Antioxidants and its functions in human body - A Review, *Research in Environment and Life Sciences*, 9(11), 1328-1331.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : BAYRAM, Sima
 Uyuğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 06.06.1991, SİVAS
 Medeni hali : Evli
 Telefon : 0 (554)695 75 59
 e-mail : simabayrak@msn.com



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi / Kimya Mühendisliği	Devam ediyor
Lisans	Ankara Üniversitesi / Kimya Mühendisliği	2014
Lise	Ankara Anadolu Lisesi	2008

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2016-Halen	ARI MÜHENDİSLİK	Kalite Kontrol ve AR-GE Müdürü

Yabancı Dil

İngilizce
 Almanca

Yayınlar

Nuralın, L., Bayrak, S., Tosun, A. ve Gürü, M. (2016). Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu İle Karabuğdayın (*Fagopyrum Esculentum Moench*) Özütlenmesi, 12. Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi, İzmir.

Bayram, S. ve Gürü, M. (2019). Deneysel Tasarım Yöntemi İle Süperkritik Şartlarda Kırmızı Kantaron (*Ertrea Centaurium*) Çiçeğinden Kuersetin Özütlenmesi. UBAK (Uluslararası Bilimsel Araştırmalar Kongresi), Yalova.

Hobiler

Farmakovijilans, fitoterapi, yan flüt çalmak, takı tasarımı



GAZİ GELECEKTİR...