



**SÜPER KRİTİK KARBONDİOKSİT ÖZÜTLEME YÖNTEMİ İLE YAVŞAN
OTU (VERONİCA BECCABUNGA) BİTKİSİNDEN YAĞ İÇERİĞİ ELDESİ
VE BAZI FLAVONOİD İÇERİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

Ahmet Said YILDIZ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

AĞUSTOS 2019

Ahmet Said YILDIZ tarafından hazırlanan “SÜPER KRİTİK KARBONDİOKSİT ÖZÜTLEME YÖNTEMİ İLE YAVŞAN OTU (VERONİCA BECCABUNGA) BİTKİSİNDEN YAĞ İÇERİĞİ ELDESİ VE BAZI FLAVONOİD İÇERİKLERİNİN BELİRLENMESİ” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi Kimya Ana Bilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Servet ÇETE

Kimya Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

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

.....

Başkan: Prof. Dr. Mustafa KAVUTÇU

Biyokimya Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

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

.....

Üye: Doç. Dr. Gözde AYDOĞDU TIĞ

Biyokimya Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

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

.....

Tez Savunma Tarihi: 21/08/2019

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.

Ahmet Said YILDIZ

21/08/2019

SÜPER KRİTİK KARBONDİOKSİT ÖZÜTLEME YÖNTEMİ İLE YAVŞAN OTU
(VERONİCA BECCABUNGA) BİTKİSİNDEN YAĞ İÇERİĞİ ELDESİ VE BAZI
FLAVONOİD İÇERİKLERİNİN BELİRLENMESİ
(Yüksek Lisans Tezi)

Ahmet Said YILDIZ

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ağustos 2019

ÖZET

Yavşan otu (veronica beccabunga) bitkisi Asya, Avrupa ve Kuzey Amerika'nın killi, kireçli topraklarında ve güneşli yerlerde, ormanların seyrek kısımlarında, yol kenarları, çimenlikler ve meralarda yetişir. Sapı, yaprakları ve çiçekleri birçok hastalığa şifa olarak kullanılmaktadır. Geleneksel tıpta Yavşan otunun; grip-soğuk algınlığı tedavisi, boğaz ağrıları, yara iyileştirme, vücut ağrıları ve hazmı kolaylaştırma gibi birçok rahatsızlık için kullanıldığı bilinmektedir. Bu bitkinin bilinen özütleme işlemleri geleneksel yöntemler ve kanserojen riskler taşıyan çözücülerle yapılmaktadır. Bu çalışmada yeni ve güvenli bir yöntem olan süperkritik karbon dioksit özütleme yöntemi ile 35-75 °C aralığında, 160-260 bar basınç aralığında, 6 farklı parçacık boyutlarında ve 3-7 L/dak CO₂ akış hızı aralığında çalışılmıştır. Uygun parametrik optimizasyon çalışması sonrasında Yavşan otu (Veronica beccabunga) bitkisinde quercetin, rutin, kaempferol, apigenin miktarlarının sırasıyla 1,44, 5,40, 8,67, 1,43 µg/g değerine ulaştığı tespit edilmiştir. Özütün antioksidan aktivitesi DPPH ve Folin-Ciocalteu yöntemleri ile belirlenmiş olup, yağ asiti içerikleri nitel ve nicel olarak tayin edilmiş ve bazı bakteri, mayalara karşı da antimikrobiyal aktivitesi belirlenmiştir.

Bilim Kodu : 20104

Anahtar Kelimeler : Yavşan otu, flavonoidler, süperkritik CO₂, özütleme

Sayfa Adedi : 92

Danışman : Doç. Dr. Servet ÇETE

OBTAINING SOME FLAVONOID COMPOUNDS AND FATTY ACIDS FROM THE
HERBACEOUS (VERONICA BECCABUNGA) BY SUPERCRITICAL CO₂
EXTRACTION METHOD

(M. Sc. Thesis)

Ahmet Said YILDIZ

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

August 2019

ABSTRACT

The herbaceous (*veronica beccabunga*) plant grows in calcareous soils of Asia, Europe and North America and in sparse parts of forests, road edges, lawns and pastures. Stalk, leaves and flowers are used for healing for many diseases. In traditional medicine; It is known to be used for many disorders such as flu-cold treatment, sore throat, wound healing. The known extraction processes of this plant are carried out by conventional methods and solvents carrying carcinogenic risks. In this study, a new and safe method of supercritical carbon dioxide extraction method in the range of 35-75 ° C, 160-260 bar pressure range, six different particle sizes and 3-7 L / min CO₂ flow rate was studied in the range. At the end of experimental studies, the amount of Kaempferol in the herbaceous (*veronica beccabunga*) was 8.67 µg / g. In addition to, the antioxidant activity of the extract was determined by DPPH and Folin- Ciocalteu methods. Fatty acid contents were determined qualitatively and quantitatively. Antimicrobial activity against some bacteria and yeasts was determined.

Science Code : 20104

Key Words : Veronica beccabunga, flavonoids, supercritical CO₂ extraction,

Page Number : 92

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Servet ÇETE

TEŞEKKÜR

Bu tezin yazımında emeği geçen danışmanım ve çok değerli hocam Doç. Dr. Servet ÇETE'ye, laboratuvarını çalışmalarım için kullanmama izin veren Prof. Dr. Metin GÜRÜ'ye, laboratuvarında her zaman bana yardımcı olan ve sorunları çözmemde büyük emeği olan Uzman Dr. Levent NURALIN'a, yine laboratuvarında çalışmalarımda destek olan Arş Grv. Deniz AKIN'a ve bana maddi-manevi desteğini esirgemeyen aileme teşekkürü bir borç bilirim.



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xii
RESİMLERİN LİSTESİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Yavşan Otu	3
2.2. Yavşan Otunun Besin Değeri	4
2.3. Yavşan Otunun Farmakolojik Özellikleri.....	5
2.4. Antioksidan Maddeler	5
2.4.1. Doğal Antioksidanlar.....	6
2.4.2. Yapay Antioksidanlar	8
2.4.3. Flavonoidler.....	9
2.5. Süperkritik Akışkan ve Özütleme Sistemi.....	13
2.5.1. Süperkritik akışkan	13
2.5.2. Süperkritik akışkanların seçimi	17
2.5.3. Süperkritik akışkanların çözme gücü.....	18
2.5.4. Süperkritik akışkan teknolojisi uygulamaları	22
2.5.5. SCCO ₂ işleminde nem miktarının etkisi	23
2.5.6. SCCO ₂ işleminde parçacık büyüklüğünün etkisi	23

	Sayfa
2.5.7. SCCO ₂ işleminde özütleme süresinin etkisi.....	24
2.5.8. SCCO ₂ işleminde sıcaklığın etkisi	24
2.5.9. SCCO ₂ işleminde basıncın etkisi	25
2.5.10. Süperkritik akışkan ile özütlemenin avantajları	25
2.5.11. Süperkritik akışkan ile özütlemenin dezavantajları	26
3. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI	27
4. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	33
4.1. Kullanılan Malzemeler, Kimyasallar ve Kullanım Amaçları	33
4.2. Kullanılan Cihazlar	34
4.3. SCCO ₂ Özütleme Yöntemi ile Çalışılan Değişkenler.....	39
4.4. SCCO ₂ Özütleme Yöntemi ile Çalışılan Sıcaklık ve Basınç Aralıklarının Planlaması	39
4.5. Yavşan Otu Örneklerinin Hazırlanması.....	40
4.6. SCCO ₂ Özütleme Yöntemi ile Özütün Elde Edilmesi	40
4.7. SCCO ₂ Özütlenmesi Sonrası Örneklerin Çözülerek Alınması	41
4.8. Elde Edilen Özütlerin Analiz Yönteminin Belirlenmesi	42
4.9. SCCO ₂ Özütleme Yöntemi ile Elde Edilen Özütün Analiz Edilmesi.....	43
4.10. Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri	43
4.10.1. DPPH (1,1-Difenil–2-pikrilhidrazil) radikali giderme aktivitesi tayini yöntemi	43
4.10.2. Toplam fenolik madde tayini (Folin-Ciocalteu) yöntemi	45
4.11. Antimikrobiyal Aktivite Tayinleri.....	46
4.11.1. Bileşiklerin antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi	46
4.12. Yağ Asidi İçeriği Çalışma Şartları ve Tayin Yöntemi	47
4.12.1. Gaz kromatografi cihazı çalışma şartları.....	47
4.12.2. Yağ asidi içeriği tayin yöntemi	47

Sayfa

5. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA	49
5.1. SCCO ₂ Özütleme Yöntemi ile Yavşan Otu Çalışmaları	49
5.1.1. Yavşan otunun SCCO ₂ özütleme yöntemi ile elde edilen özüt miktarı için en iyi sonucu elde etme çalışmaları	49
5.1.2. Yavşan otunun SCCO ₂ özütleme yöntemi ile elde edilen toplam özüt miktarı ve QRKA veriminin farklı parametrelere göre incelenmesi.....	52
5.2. Antioksidan Aktivite Tayini Yöntemleri Sonuçları.....	59
5.2.1. DPPH (1,1-Diphenyl–2-picrylhydrazyl) radikal süpürme etkisi deney sonuçları	59
5.2.2. Toplam fenolik madde tayini (Folin-Ciocalteu) yöntemi deney sonuçları.....	62
5.3. Antimikrobiyal Aktivite Tayini Sonuçları	69
5.4. Yavşan Otu Özütlerinin Yağ Asidi İçeriklerinin Gaz Kromatografisi Sonuçları	73
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	77
KAYNAKLAR	81
EKLER.....	87
EK-1. Yavşan otuna ait örnek kromatogramlar	88
EK-2. Yavşan otu örneklerinin yağ asidi içerikleri örnekleri	91
ÖZGEÇMİŞ	92

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Gıdalardaki doğal antioksidanlar ve hastalıkların önlenmesi ve tedavisindeki rolleri	8
Çizelge 2.2. Bir akışkanın sıvı, gaz ve süperkritik bölgedeki fizikokimyasal özellikleri	15
Çizelge 2.3. Süperkritik teknolojisinde kullanılan bazı akışkanların kritik noktaları.....	17
Çizelge 2.4. Süperkritik CO ₂ 'in çeşitli sıcaklık ve basınçtaki fiziksel özellikleri	20
Çizelge 2.5. Süperkritik akışkan ortamında gerçekleştirilen uygulamalar	22
Çizelge 5.1. Yavşan otu örnekleri için farklı parametrelere göre en iyi özüt elde etme çalışmaları.....	50
Çizelge 5.2. Yavşan otu örnekleri için farklı parametrelere göre en yüksek toplam QRKA elde etme çalışmaları	51
Çizelge 5.3. Yavşan otundan elde edilen özüt miktarı ve toplam QRKA miktarına basınç etkisi verileri.....	52
Çizelge 5.4. Yavşan otundan elde edilen özüt miktarı ve toplam QRKA miktarına sıcaklık etkisi verileri.....	53
Çizelge 5.5. Yavşan otundan elde edilen özüt miktarı ve toplam QRKA miktarına parçacık boyutu etkisi verileri	55
Çizelge 5.6. Yavşan otundan elde edilen özüt miktarı ve toplam QRKA miktarına CO ₂ akış hızı etkisi	57
Çizelge 5.7. Örnek, BHA, BHT ve DPPH radikallerinin absorbands değerleri	59
Çizelge 5.8. Örnek, BHA, BHT için ortamdaki DPPH serbest radikallerinin inhibe edilen yüzde miktarları	60
Çizelge 5.9. Standart gallik asidin derişim absorbands verileri.....	62
Çizelge 5.10. Yavşan otundan elde edilen özütler ve soxhleth cihazından geçirilen özütün gallik asit cinsinden fenolik madde miktarı değerleri	63
Çizelge 5.11. Yavşan otu özütlerinin minimum inhibisyon konsantrasyonu (MIC) değerleri (µg/ml)	71
Çizelge 5.12. Yavşan otu özütlerinin minimum bakteri konsantrasyonu (MBC) ve minimum fungus konsantrasyonu (MFC) değerleri (µg/ml).....	71

Çizelge	Sayfa
Çizelge 5.13. Yavşan otundan SCCO ₂ özütlemesi optimum örneğinin gaz kromatografisi ile elde edilen yağ asidi içerikleri	73
Çizelge 5.14. Yavşan otundan soxhleth özütlemesi örneğinin gaz kromatografisi ile elde edilen yağ asidi içerikleri.....	74



ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Gıdalarda kullanılan yapay fenolik antioksidan yapılar	9
Şekil 2.2. Flavonoid bileşiklerinin temel iskelet yapısı	10
Şekil 2.3. Dört temel flavonoid grubunun moleküler yapısı.....	12
Şekil 2.4. Karbondioksit basınç-sıcaklık faz diyagramı	14
Şekil 2.5. CO ₂ 'nin indirgenmiş yoğunluk değerinin indirgenmiş sıcaklık ve indirgenmiş basınçla değişimi.....	19
Şekil 4.1. Süperkritik özütleme cihazı sistemi.....	41
Şekil 5.1. Yavşan otundan elde edilen özüt miktarı ve toplam QRKA miktarına basınç etkisi	52
Şekil 5.2. Yavşan otundan elde edilen özüt miktarı ve toplam QRKA miktarına sıcaklık etkisi	54
Şekil 5.3. Yavşan otundan elde edilen özüt miktarı ve toplam QRKA miktarına parçacık boyutu etkisi	56
Şekil 5.4. Yavşan otundan elde edilen özüt miktarı ve toplam QRKA miktarına CO ₂ akış hızı etkisi.....	57
Şekil 5.5. Y10, Y21, Ysoxhleth, BHA ve BHT'nin DPPH serbest radikal üzerindeki süpürücü aktiviteleri.....	61
Şekil 5.6. Standart gallik asit derişim absorbands grafiğı.....	62
Şekil 5.7. Toplam fenolik madde içeriğı derişim grafiğı	64
Şekil 5.8. SCCO ₂ yönteminde basınç değışikliğı ile elde edilen özütlerin DPPH ve toplam fenolik değışimi çizgi grafiğı	64
Şekil 5.9. SCCO ₂ yönteminde basınç değışikliğı ile elde edilen özütlerin DPPH ve toplam fenolik değışimi sütun grafiğı	65
Şekil 5.10. SCCO ₂ yönteminde sıcaklık değışikliğı ile elde edilen özütlerin DPPH ve toplam fenolik değışimi çizgi grafiğı	65
Şekil 5.11. SCCO ₂ yönteminde sıcaklık değışikliğı ile elde edilen özütlerin DPPH ve toplam fenolik değışimi sütun grafiğı	66
Şekil 5.12. SCCO ₂ yönteminde parçacık büyüklüğü değışikliğı ile elde edilen özütlerin DPPH ve toplam fenolik değışimi çizgi grafiğı	66

Şekil	Sayfa
Şekil 5.13. SCCO ₂ yönteminde parçacık büyüklüğü değişikliği ile elde edilen özütlerin DPPH ve toplam fenolik değişimi sütun grafiği	67
Şekil 5.14. SCCO ₂ yönteminde CO ₂ akış hızı değişikliği ile elde edilen özütlerin DPPH ve toplam fenolik değişimi çizgi grafiği	67
Şekil 5.15. SCCO ₂ yönteminde CO ₂ akış hızı değişikliği ile elde edilen özütlerin DPPH ve toplam fenolik değişimi sütun grafiği	68
Şekil 5.16. SCCO ₂ özütlemesi sonucu elde edilen optimum örnek olan Y21'in MIC değerleri sütun grafiği	72
Şekil 5.17. SCCO ₂ özütlemesi sonucu elde edilen optimum örnek olan Y21'nin MBC VE MFC değerleri sütun grafiği	72

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. Yavşan otu	4
Resim 2.2. Süperkritik faza geçerken bir akışkanın görünümü	21
Resim 4.1. Retsch marka bitki değirmeni	34
Resim 4.2. Kompresör, CO2 tüpü, soğutucu, fırın ve pompalı süperkritik sistemi	35
Resim 4.3. Dionex marka UV dedektörlü HPLC cihazı ve bilgisayarı	36
Resim 4.4. PG T80/T80+ model UV-GB spektrofotometre cihazı	37
Resim 4.5. Mc Farland analiz cihazı	38
Resim 4.6. Agilent HP GC 6890 gaz kromatografi cihazı	38
Resim 4.7. Antioksidan etki mekanizması	45

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler

Açıklamalar

µg	Mikrogram
cfu	Koloni oluşturan birim
m³	Metre küp
ml	Mililitre
°C	Santigrat derece
P	Basınç (bar, MPa)
Pr	İndirgenmiş basınç
pr	İndirgenmiş yoğunluk
Tr	Kritik sıcaklık

Kısaltmalar

Açıklamalar

Amp	Ampisilin
BF3	Bor triflorür metanol
BHA	Bütillenmiş hidroksi anisol
BHT	Bütillenmiş hidroksi toluen
Clf	Kloramfenikol
GAE	Gallik asit eşdeğeri
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
Keto	Ketokonazol
MBC	Minimum bakterisidal konsantrasyon
MFC	Minimum fungusidal konsantrasyon
MIC	Minimum inhibisyon konsantrasyonu
QRKA	Quercetin, Rutin, Kaempferol, Apigenin

Kısaltmalar**Açıklamalar****SCCO₂**

Süperkritik karbon dioksit

SCF

Süperkritik akışkan

SFE

Süperkritik akışkan ekstraksiyonu



1. GİRİŞ

Flavonoidler üzerindeki çalışmalar yıllar boyunca hızla çoğalmıştır. Hatta gıda bileşenlerini oluşturan diğer yapılardan bile daha fazla artış göstermiştir. Bu hızlı artışın nedeninin sağlıklı beslenmeye yönelik ilgiden kaynaklandığını söyleyebiliriz. Bütün bunlar sebze ve meyveler üzerindeki flavonoidlerin, koroner kalp hastalığı, kanser ve inmeye olan insidansı üzerine yapılan epidemiyolojik çalışmalarla tetiklenmiştir. Bir flavonoid türevi olan izoflavonlar ile ilgili çalışmalar 1990'lı yıllarda hızla ortaya çıkmaya başladı, fakat asıl olarak 2000 yıllarında keşfedildi. 1990'lı yıllarda flavonoidler ekseriyetle şifalı özelliği için kullanılan bitkilerin aktif maddeleri olarak kabul edilmiştir. Biyoaktif gıda maddeleri olarak kabul edilmeleri ise 2000'li yıllardan sonra başlamıştır [1].

DNA'da hasar oluşumuna neden olan serbest radikallerin etkisiz hale getirilmesi antioksidanlar aracılığıyla gerçekleşir. Serbest radikaller, organizmada hızlı yaşlanma, DNA'da hasar oluşumu, oksidatif stres, kanser gibi birçok hastalığa sebep olmaktadır [2].

Çalışmamızda üzerinde durduğumuz esas bileşik olan ve flavonoidlerin de en bilinenlerinden biri olan kaempferol, kronik hale gelen zor hastalıklarda ve özellikle kanserde faydalı etkisi olduğu bulunmuştur. Kaempferol kanser gelişiminde etkili olan serbest radikalleri baskılayıp etkisiz hale getirerek vücudun savunmasını kuvvetlendirdiği bilinmektedir [3].

Tez çalışması yapılan bitki, Scrophulariaceae familyasına ait olup tür olarak *Veronica beccabunga* L.'dir. Alt tür olarak *beccabunga* diye tanımlanmaktadır.

Bizim yaptığımız bu çalışmada amacımız, farmakolojik olarak büyük öneme sahip quercetin, rutin, kaempferol, apigenin flavonoid bileşiklerinin, ekonomik olarak değersiz sayabileceğimiz yavşan otunda varlığını tespit etmek ve miktar analizini gerçekleştirmektir. Ayrıca antioksidan, antimikrobiyal aktivite tayinlerin ve yağ asidi içerikleri tayini yapılarak çalışmalarımız bu yönde gerçekleşmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Yavşan Otu

Latince adı “Veronica beccabunga” olan Yavşan otunun ilk olarak Avrupa’da bulunduğu bilinmektedir. Bununla beraber Kuzey Amerika ve Asya’nın kil ve kireç bakımından zengin topraklarında da yetiştiği görülmektedir. Ormanlık yerlerin kenarlarında, güneş gören yerlerde, ormanlık yerlerin seyrek ağaçlı bölgelerinde, çimenlik ve meralarda, hatta duvar çatlaklarında bile yetişebilen bir bitkidir. Yavşan otunun tarihçesi çok eski dönemlerden başlamaktadır. Ülkemizde yetiştiği yerler ise Kuzey Anadolu, Güney Doğu Anadolu ve İç Anadolu bölgesidir.

Yavşan Otu Sıracagiller familyasındandır. Acı yavşan otunun bildiğimiz ismi dışında halk arasında yaygın kullanılan başka isimleri de vardır. Bu isimler; Avrupa çayı, Ak pelin, Acı pelin, Acı yavşandır. Yavşan otunun içeriğinde tanen, flavonoidler, kahve asidi ve glikozitler bulunduğu görülmüştür. Bitki toplandığı anda koku oluşumu görülmez. Serilip kurutulduğunda aromatik bir kokuya sahip olur. Boyu 110-120 cm’lere ulaşabilir. Çiçeklerinin rengi gri, beyaz, yeşil ve mavi olup, gövde olarak kabarık bir yapıya sahiptir. Yapısında ince ince tüyler bulunmaktadır. İlk olarak taze toplandığında tadı acıdır. Serilip kuruduktan sonra aromatik bir tat verir. Ekseriyetle güz mevsiminde çiçekleri kuruduktan sonra toplanıp, güneş görmeyen, havadar ve kuru yerlerde kurutulur [4].

Yavşan otu eski çağlardan beri ilaç olarak kullanılan aromatik bir bitkidir. Yavşan otunun antifungal özelliği yüksek, antibakteriyel özelliğinin ise düşük olduğu bilinmektedir. Geleneksel olarak kullanıldığı şifa özelliklerine bakıldığında antihelmintik (kurt dökücü), antiseptik, balzamik ve antidepresif olarak, koleraya ve sindirim bozukluklarında, ayrıca diüretik olarak idrar sökücü, lösemi ve skleroz tedavisinde kullanılmıştır. Acı yavşan otu özütlerinin kas gevşetici ve kaygısal durumların tedavisinde hafif sakinleştirici özelliği olduğu için kullanıldığı bilinmektedir. Eski dönemlerde yavşan otu yapraklarının kurutulup toz haline getirilip göğüs enfeksiyonlarını ve yaraları tedavi için de kullanıldığı da bilinmektedir. Ayrıca ağrı kesici olarak da çeşitli hastalıklarda kullanılmıştır. Yavşan otu endüstriyel anlamda ise alkollü içeceklerin üretiminde yaygın olarak, yaygın olmasa bile

meyve suyu ve çeşitli gıdaların üretiminde, hususan şekerli gıdalarda aroma katıcı özelliğinden faydalanılan bir bitkidir [5].



Resim 2.1. Yavşan otu

2.2. Yavşan Otunun Besin Değeri

Yavşan otu geleneksel olarak yaygın kullanılmaktadır. Özellikle son yıllarda bu ota olan ilginin artmasının nedeni içeriğindeki şifalı özelliklerin fazla olması ve aromatik olarak hoş kokusu olmasından kaynaklanmaktadır. Yavşan otunda çeşitli vitamin, mineraller ve elementler olduğu bilinmektedir. Flavonoidler bakımından zengindir. Ayrıca yapısında glikozitler, saponinler, tanenler, reçine, kahve asitleri vb. maddeleri de içermektedir.

Yavşan otu ile ilgili detaylı bir çalışma fazla bulunmamaktadır. Bizim bu konuda çalışmamızın nedeni de zaten budur. Ama geleneksel kullanıma ve az da olsa literatür çalışmalarına bakıldığında içeriğinin zengin olduğu görülecektir. İçeriğindeki bu maddelerden dolayı oldukça şifalı bir özelliğe sahip olarak görülmüştür.

2.3. Yavşan Otunun Farmakolojik Özellikleri

Yavşan otu hakkında yukarıda da bahsedildiği gibi detaylı bir akademik çalışma bulunmamaktadır. Farmakolojik olarak şifalı özellikleri geleneksel kullanımından ve az da olsa literatür çalışmalarından bilinmektedir.

- Sakinleştirici özelliği vardır.
- Antioksidan özelliği ile serbest radikalleri süpürür. Böylece kanser gibi hastalıklara karşı kullanılır.
- Şeker hastalığına karşı etkili olduğu gözlemlenmiştir.
- Kolesterol ve trigliserit değerlerinde iyileşme gözlemlenmiştir.
- Sıtmaya karşı olumlu sonuçlar gözlemlenmiştir.
- Antimikrobiyal tedavide kimyasal ilaçlara alternatif olarak önemli bir kaynak olarak görülmüştür.
- Antiinflamatuvar ve iltihap özelliği vardır.
- Hazımsızlığı önler.
- Yara ve böcek ısırıklarında kullanılır.
- Ateş düşürücü özelliği vardır.
- Mide ve sindirim bozukluklarında kullanılır.

2.4. Antioksidan Maddeler

Antioksidan bileşikler, vücut sağlığını koruma açısından önemli bir görev üstlenmektedir. Anti oksidanların herkesçe bilinen genel özelliği serbest halde dolaşan radikalleri tutmak ve onları süpürmektir [6].

Antioksidan bileşikler, oksidatif kimyasal tepkimelerin başlamasını veya bu tepkimelerin çoğaltılmasına engel olan bileşiklerdir. Böylelikle organizmadaki moleküllerin okside olmasını engellemiş olurlar ve hücrelerin zarara uğramasını önlemiş olurlar. Serbest radikaller, kalp rahatsızlıkları, yaşlanma ve kanser gibi oldukça ciddi hastalıklara sebep olan bileşiklerdir. Serbest halde olan bir radikal, bir molekül veya moleküler türevler olarak belirtilir. Orbitallerine baktığımızda en dış kabuktaki orbitalinde bir veya birden fazla ortaklanmamış elektron içerirler [7].

Antioksidan özellik, fenolik bileşenler olan flavonoidler, fenolik diterpenler ve fenolik asitlerle oluşur. Bu fenolik bileşiklerin antioksidan özelliği esas olarak serbest emilim ve nötrleştirme reaksiyonlarının redoks özelliklerinden kaynaklanır [8].

2.4.1. Doğal antioksidanlar

Günümüzde hazır gıdalar, alışlagelmiş ve sürekli olarak kullanılan katkı paketleri ekseriyetle bir fenolik yapıli antioksidan ve ikinci stabilize edici olarak da fosfor ve kükürt elementleri içerir. Birkaç yıl önce, bu katkı maddelerinin sağlık açısından bazı tehlikeli sonuçlar oluşturacağına dair soru işaretleri belirmiştir ve bu maddeler için henüz bir alternatif oluşturulamamıştır. Meyvelerde, sebzelerde ve bazı bitkilerde, organizmada serbest radikallerin reaksiyonlarında önemli rol oynayan fazla sayıda antioksidan maddeler bulunmaktadır. Bu antioksidan maddeleri bulunduran maddeler, doğal tıpta geleneksel olarak yıllardır kullanılmaktadır ve günümüzde de gıda sektöründe koruyucu olarak oldukça yaygın olarak bulunmaktadır. Gıdalardaki polimer maddeleri koruyucu amaçlı olarak bu doğal antioksidanların kullanılmasına henüz yeni başlanmıştır. Günümüzdeki kısıtlı bilgilerden birbiri ile çelişenler vardır. Dayanıklılıklarını artırmak için gıdalara çeşitli bileşikler eklenmiş olsa da, en çok fayda görülen maddeler flavonoidler, karetenoidler, diğer doğal fenoller ve lignin içerikli fenolik polimer maddelerdir. Güncel sonuçlar, gıda sektöründe kullanılan türevlendirilmiş yapay fenolik maddelerden çok daha yüksek özellikli stabilize edici bileşiklerin flavonoidler olduğunu göstermiştir. Doğal antioksidanlar, gıdaların koruyucu özelliği için verimli olarak kullanılabilir. Ancak, gıda paketlerine bu maddeleri ekleyebilmek için daha fazla araştırma yapılmalı ve bütün avantajlarına bakılmalıdır [9].

Yapılan çalışmalar, bambu bitkisinin antioksidan bakımından zengin olduğunu, düzenli olarak bambu içeren besinlerin yenilmesinin, kanser, kalp damar sistemi hastalıkları, şeker hastalığı, parkinson gibi yaş ilerlemesine bağlı kronik hastalıkların riskini azaltacağını göstermiştir.

Gıdaların ve ilaçların işlenmesi, depolanmasına sebep olan serbest halde dolaşan radikallerin süpürülmesini sağladığı için antioksidan bileşikler, ilaç ve gıda sektörünün olmazsa olmaz öğeleridir. Ayrıca bu serbest radikallerin sebep olduğu hücrede oluşan hasarları etkisiz hale getirdiği için sağlığımız için önemlidir.

Antioksidanların, hastalıkların önlenmesi, yaşlanma sürecinin yavaşlaması gibi sağlık açısından şifalı özellikleri olduğu bilinmektedir. Bambudaki ana antioksidan maddeler fenolik bileşikler, E ve C vitaminleri ve selenyum, demir, çinko, bakır ve manganez gibi minerallerdir. İlaç ve gıdalardaki kullanılan yapay antioksidanların sağlığa zararlı etkileri olabileceğinden doğal antioksidanlar oldukça fazla talep görmektedir. Bambunun büyük bir ağaç olmasından dolayı potansiyel bir antioksidan kaynağı olarak çok önemli bir bitki olarak değerlendirilebilir [10].

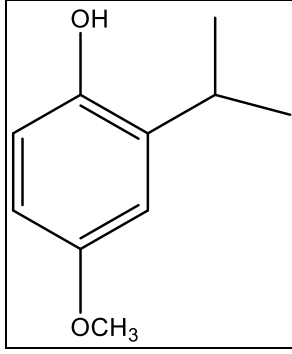
Dış dünya ile temas ve organizmadaki metabolik işlemler sırasında, vücudumuzda yoğun olarak serbest radikaller üretilir. Bu serbest radikaller nükleik asitler, proteinler gibi büyük moleküllere saldırarak hücrelerde ve dokularda hasara neden olur ve hatta genlerin mutasyona uğramasına sebep olabilirler. Vücudumuzda oluşan yüksek miktarlara ulaşan serbest radikaller birçok zarara yol açıp hatta genç yaşlarda bile kronik hastalıkların sebebi olabilirler. En son araştırmalarda, kronik hastalıklardan olan kanser, kalp damar sistemi hastalıkları, alzheimer, eklem hastalıkları, parkinson gibi hastalıkların sebebinin serbest radikaller ve serbest radikallerin oluşturduğu redoks dengesizliği ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Serbest radikaller, bu sebeplerden ötürü insan sağlığını bozan zararlı yapılar haline gelmiştir. Vücuttaki serbest radikalleri ortadan kaldırmak ve vücudun iç dengesini korumak sağlığı korumak ve hastalıkları tedavi etmeyi sağlar. Bununla birlikte serbest radikalleri ortadan kaldırmak için antioksidanların tüketimi de gereklidir. Ama yapay antioksidanların vücutta zararlı etkileri olduğu da unutulmamalıdır. Bu sebeple, doğal antioksidanlar tercih edilmelidir. Doğal antioksidanların zarar vermemekle birlikte hastalıkları önlemede ve tedaviye yardımcı olmada önemli bir etkileri vardır. İlaç, sağlık ve gıda sektörlerinin gelişmesi için önemli olan antioksidanlar Çizelge 2.1’de gösterilmiştir [11].

Çizelge 2.1. Gıdalardaki doğal antioksidanlar ve hastalıkların önlenmesi ve tedavisindeki rolleri

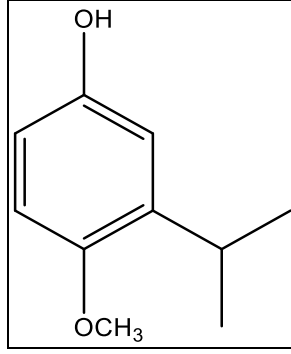
Doğal antioksidanlar	Hedef hastalıklar	Doğal antioksidanlar bakımından zengin besinler
C vitamini	Kardiyovasküler hastalıklar, kanser ve siroz	Taze meyve ve sebzeler
E vitamini	Akciğer, cilt ve prostat kanserleri	Kuruyemiş, yeşil meyveler ve sebzeler
Karoten	Diyabetin neden olduğu göz hastalıkları	Koyu yeşil veya kırmızı ve sarı meyveler ve sebzeler
Likopen	Parkinson ve Alzheimer hastalıkları	Domates
Astaksantin	Yaşlanma, Alzheimer hastalığı ve inflamasyon	Karides kabuğu, istiridye
Kakao polifenol	Arteroskleroz, koroner kalp hastalığı ve alkolik karaciğer	Kakao çekirdeği
Yeşil çay polifenolleri	Yaşlanma, Alzheimer hastalığı, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, tümörler ve inflamasyon	Yeşil çay
Kırmızı şarap polifenolleri	Diyabet, kalp-damar hastalıkları	Kırmızı şarap, üzüm çekirdeği
Şeftali polifenolleri	Meme kanseri	Şeftaliler
Flavonoidler	Kardiyovasküler hastalık, artrit, Alzheimer hastalığı, inme	Bitkiler, meyveler, bal
isoflavonoidler	Prostat, yumurtalık, servikal ve meme kanserleri	Soya fasulyesi
Antosiyaninler	Kardiyovasküler hastalık, nörodejeneratif hastalıklar, karaciğer kanseri	Siyah pirinç, mor tatlı patates, yaban mersini, dut
Xanthones	Enflamasyon, sinir yaralanması	Mangosten
Çin bitkilerinden elde edilen bileşenler	Enflamasyon, kanser, Alzheimer hastalığı, diyabet, kardiyovasküler hastalık	Çin bölgesinde yetişen bazı otlar

2.4.2. Yapay antioksidanlar

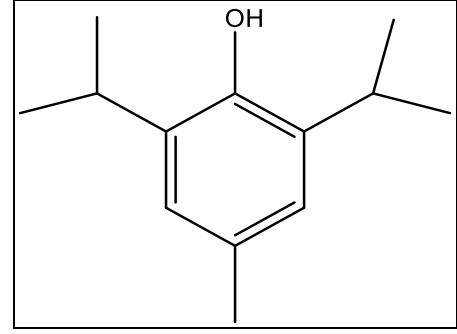
Yapay antioksidanlar, gıdalardaki maddelerin uzun ömürlü olması ve oksidasyona uğramamaları için kullanılır. Günümüzde endüstriyel proseslerde gıda maddelerinin depolanma özelliklerini artırmak için çoğunlukla BHA, BHT ve PG gibi sentetik antioksidanlar kullanılmaktadır. Ancak, antioksidan olarak kullanılan kimyasalların muhtemel zararlı etkileri nedeniyle, son yıllarda ilgi doğal antioksidanlar üzerinde yoğunlaşmıştır [12]. Ticari olarak en çok kullanılan antioksidanların yapıları Şekil 2.1’de gösterilmektedir [16].



(3-BHA)

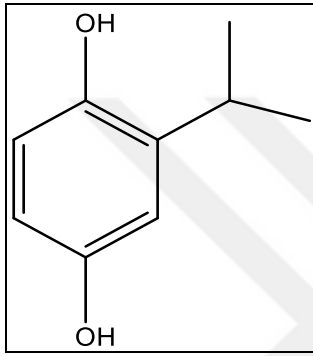


(2-BHA)

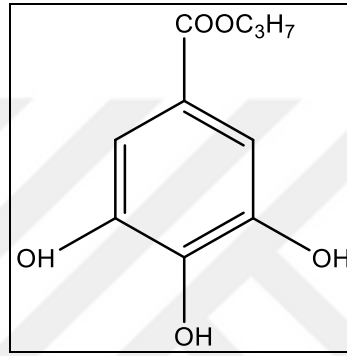


Butillenmiş hidroksi anisol yapısı (BHA)

Butillenmiş hidroksi anisol türleri (BHA)



Tersiyer butilhidrokinon (TBHQ)



Propil gallat (PG)

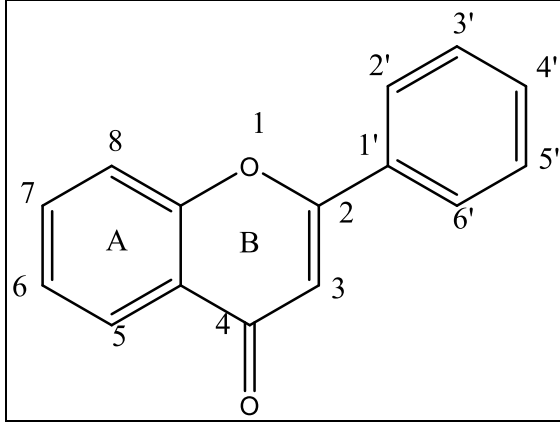
Şekil 2.1. Gıdalarda kullanılan yapay fenolik antioksidan yapılar

Antioksidanlar içerisinde, çalışılan tezin de konusu olan flavonoidler incelenecektir.

2.4.3. Flavonoidler

Flavonoidler ekseriyetle doğadaki bitkilerden elde edilebilen maddelerdir. Enflamasyona karşı, kansere karşı, diyabete karşı, yaşlanmayı geciktirici gibi birçok özellikleri büyük ilgi ile görmüş ve birçok çalışmaya da konu olmuştur. 9000'den fazla flavonoid bulunmuştur. Diyetle günlük alınan dozları 20, 50 ve 500 mg olarak değişebilmektedir. Elde edildiği kaynaklar ekseriyetle çay, soğan, domates, elma gibi diyetle alınan gıda takviyelerindedir.

Şekil 2.2. Flavonoid bileşiklerinin temel iskelet yapısını göstermektedir [13].



Şekil 2.2. Flavonoid bileşiklerinin temel iskelet yapısı

İnsan diyeti için çok önemli olan vitaminler vücudumuzda doğrudan sentezlenemezler. Dışarıdaki besin kaynaklarından alınması gerekir ve vücudumuz için yapısal ve hayati açıdan büyük öneme sahiptirler. Flavonoidler de vücutta sentezlenememeleri, dışarıdan alınan bileşikler olmaları ve diyetimizde çok kıymetli olmaları bakımından vitaminlerle benzerlik gösterirler. Bitkilerden elde edilen fitokimyasallar toksik özellikli bileşiklere ve serbest radikallere karşı organizmayı koruyan faktörler olarak önemli bir rol üstlendiği görülmektedir. Bu fitokimyasalların metabolizmaları netleştirildi ve inflamasyon inhibitörleri olarak yakın zamanda hızla gelişti.

Bitkiler alemi içinde çok geniş kapsamlı olan flavonoidler polifenollere ait bir gruptur. Ekseriyetle sebze, çay ve meyvelerde görülür. Flavonoidlerin 4000'den fazla çeşidi vardır ve kimyasal yapıları olarak 6 grup altında incelenebilir:

Flavonoller, flavonlar, flavanoller, antosiyanidinler, flavanonlar ve izoflavonitlerdir [14].

Bitkilerin yapısında birçok flavonoid çeşiti olduğu bilinmektedir ve bu flavonoidler bitkilerin büyümesi için önemli olmakla birlikte hastalık faktörlerinin engellenmesinde de önemli bir role sahiptir. Flavonoidler arasında en yaygın olanları flavonlar, izoflavonlar, antosiyaninler ve ksantonitlerdir. Flavonoidler, serbest halde olan radikallerin süpürülmesini şöyle sağlar: Lipit bileşiklerine serbest radikalın hidrojenini verir ve serbest radikali fenolik radikallere (inert) dönüştürerek gerçekleştirir.

Prostat kanseri, Avrupa'daki erkekler üzerinde ciddi etkisi olan ilk kötü huylu kanserdir. Asya'da ise prostat kanseri oranı oldukça düşüktür. Yapılan birçok araştırma bunun

nedeninin soya fasulyesinden kaynaklandığını göstermiştir. Soya fasülyesinin, flavonoid çeşitlerinden olan izoflavon içeriği yüksektir ve Asyalı insanların da soya fasülyesi tüketimi Avrupa ve Amerika'dan daha fazladır. Bununla beraber, Japon serumundaki izoflavon içeriği, Avrupa'dakilerden 10 ila 100 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

Bazı bitkilerden elde edilen flavonoidler, kalp ve damar sisteminin korunması, alzheimer ve artrit hastalığının tedavisi için çok önemli antioksidan özelliği olan bileşiklerdir. Örneğin, quercetin alan sporcuların oksidatif stres indeksi olan F2-izoprostan seviyesi önemli ölçüde azalabilir. Fareler ile yapılan deneyde, 15 gün boyunca flavonoid verilen farelerde artrit skoru azalmıştır. Kateşin prosiyanidin olarak Ginkgo biloba bitkisinin özütünün, Alzheimer hastalıkları ve diğer hastalıkların tedavisinde önemli olduğu görülmüştür. Yine yapılan bir araştırmada taze Ginkgo biloba özütü ile tedavi edilen 32 yaşlı insanın karaciğer ve derisinde mikro dolaşımının arttığı görülmüş ve Ginkgo biloba özütünün serbest radikallerin atılmasını sağladığı ve arterosklerozun gelişimini önlediği ortaya çıkmıştır. Bu nedenle, Ginkgo biloba bitkisinin kullanımının yaşlı nüfusun sağlığı için önemli olduğu söylenebilir.

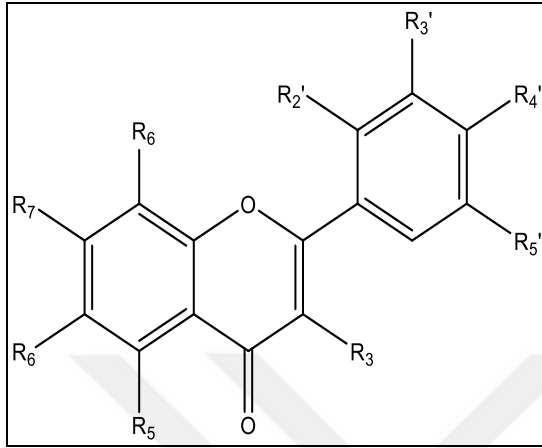
Soya fasülyesinde bulunan izoflavonlar kansere karşı koruyucu özelliği olan flavonoidlerdendir. Yapılan kontrol deneyleri ile, soya fasülyesi kullanan bireylerin yumurtalık kanseri olma riskinin oldukça düşük olduğu görülmüştür.

Yine önemli bir flavonoid olan antosiyaninler, kuvvetli antioksidan etkiye sahip ve bitkilerde oldukça fazla olarak bulunan suda çözünebilen doğal renkli pigmentlerdir. Mor tatlı patates, yaban mersini, siyah renkli pirinç, üzüm, dut vb. koyu renk içeren gıdalarda bol miktarda antosiyanin bulunur. Günümüzdeki çalışmalara göre antosiyaninlerin, nörodejeneratif hastalıkların, kalp damar sistemi hastalıklarının ve kanserin önlenmesinde ve tedavisinde önemli bir fonksiyonu vardır. Yaban mersini meyveleri ile uzun süreli (7 hafta) veya kısa süreli (2 hafta) beslenen sıçanlarda, ışığa bağlı retina yaralanmasının büyük ölçüde azaldığı görülmüştür. Bu durum antosiyanin flavonoidlerinin nöral hücrelerde koruyucu rolünün olduğunu göstermektedir. Yeni bir araştırma ile de frenk üzümü özütünde biyoaktif bir bileşen olan siyanidin türevinin, karaciğer kanseri hücrelerinin büyümesini önemli ölçüde engellediği görülmüştür [11].

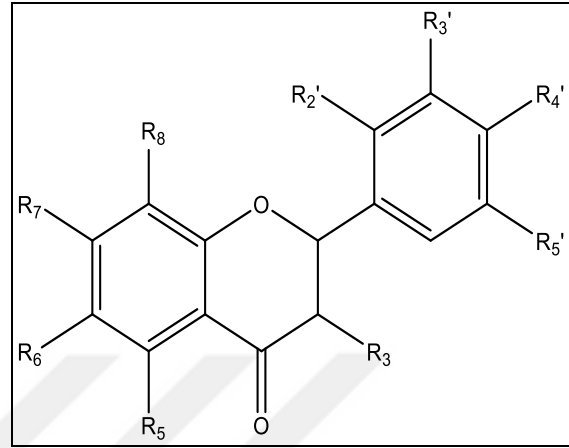
Ksanton bileşikleri, mangosten meyvesinde bulunur. Ksanton doğal antioksidanlardandır. Mangosten meyvesi özütünün, serbest radikalleri süpürerek DNA hasarı üzerindeki

koruyucu özelliği yerine getirebileceği bildirilmiştir [15].

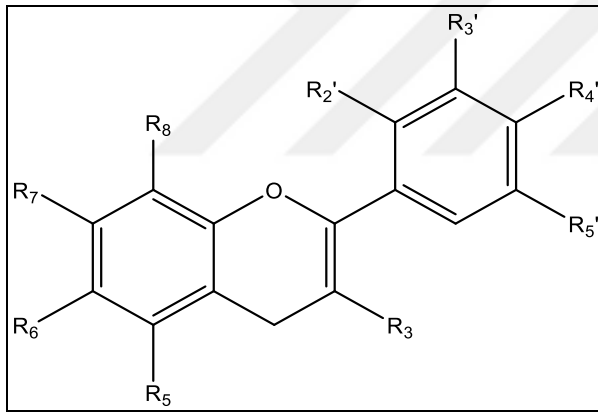
Dört temel flavonoid grubunu temel yapısı Şekil 2.3’de verilmiştir [16].



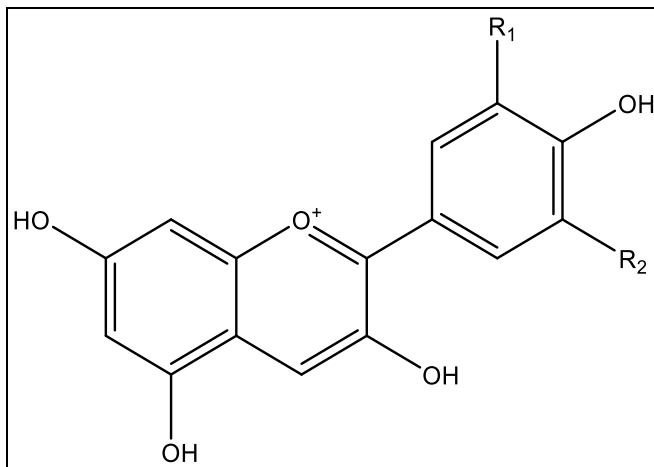
Flavon



Flavonon



Kateşin



Antosiyanin

Şekil 2.3. Dört temel flavonoid grubunun moleküler yapısı

2.5. Süperkritik Akışkan ve Özütleme Sistemi

2.5.1. Süperkritik akışkan

Fransız mühendisi ve fizikçisi Baron Charles Cagniard De La Tour, 1821 yılında, maddenin sıcaklığının belli bir derecenin üzerine çıktığında maddenin ne sıvı ne de gaz fazında olduğunu, ama akışkan bir faz halinde bulunduğunu görmüştür. Top gülleri ile yapılan çalışmalarda, farklı sıcaklıklardaki suyla dolu sızdırmaz kaplarda, top gülleri ilerlerken çıkardıkları seslerdeki süreksizlikleri dinlerken, belirli sıcaklığa gelindiğinde bu ses süreksizliğinin ortadan kaybolduğunu gözlemlemiştir ve bu ses süreksizliğine sebep olan sıvı-gaz faz sınırının ortadan kalktığı sıcaklık değerlerini kaydetmiştir. Böylece bu sıcaklık değerleri ile kritik sıcaklık kavramı ortaya çıkmıştır [17].

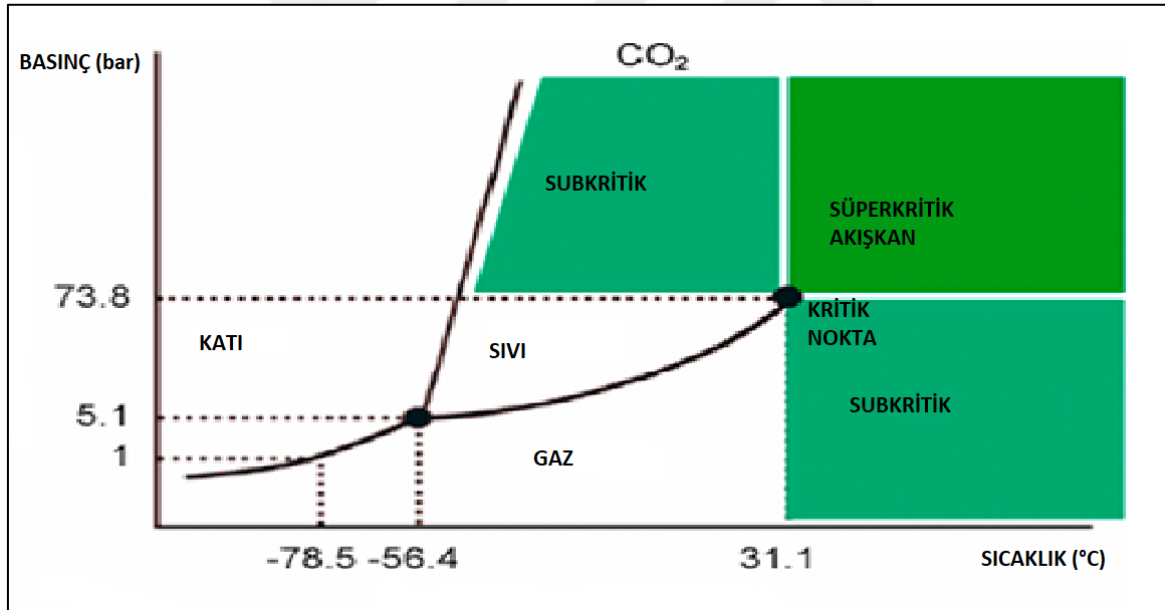
1879’da Hannay ve Hogarth süperkritik akışkanlarda katı maddelerin çözünbildiğini tespit etmişlerdir. 1898’de ise Villard, iyodinden iyodoetani elde etmek için ilk defa süperkritik akışkan yöntemini kullanmıştır [18].

Bir saf madde, element halinde veya karışım halinde olabilir, kritik basıncının (P_c) ve sıcaklığının (T_c) üzerindeki bir noktaya ulaştığında “süperkritik akışkan” (SCF) olarak isimlendirilir. Süperkritik akışkan maddeler, geleneksel olarak yıllardır kullanılan diğer çözücülere göre çok daha avantajlıdır. Yoğunluğu, difüzyon hızı, viskozitesi, dielektrik sabiti, çözünürlüğü ve yoğunluğu gibi fizikokimyasal özellikleri basınç ve sıcaklığın değiştirilmesiyle gaz davranışı gösteren özelliklerden sıvı davranışı gösteren özelliklere dönüşür. Sıvılardan yaklaşık 100 kat fazla difüzyon hızına ve gazlardan 10 kat düşük viskoziteye sahip olması özelliğiyle iyi bir kütle aktarım özelliği oluşturur. Böylelikle SCF ortamda gerçekleşen enzimatik bir reaksiyonda, SCF ortamın içinde dağılmış olan enzimlerin kütle aktarım hızı artar. Süperkritik akışkan ortamda, tepkimelerin sıvı ortama göre daha hızlı gerçekleştiği görülür [19].

Süperkritik akışkan grafiği incelendiğinde incelendiğinde süperkritik akışkan maddelerin ısı kapasitelerinin ve sıkıştırılabilirliğinin kritik noktanın yakınlarında daha fazla olduğu görülmektedir. Ayrıca kritik noktaya gelindiğinde, gaz fazın yoğunluğu ile sıvı fazın yoğunluğu eşitlenir ve gaz-sıvı ara yüzeyinin kaybolduğu görülür [20].

Bir madde için kritik sıcaklık; basınç ne olursa olsun o sıcaklığın üstünde maddenin sıvı olarak bulunamayacağı sıcaklıktır. Maddenin kritik sıcaklığındaki buhar basıncı da kritik basıncıdır. Süperkritik akışkan terimi ise hem sıcaklığı hem de basıncı kritik noktanın üzerinde olan maddeler için kullanılır. Bir süperkritik akışkan (SKA), maddenin bastırılabilirdiği ve bir gaz olarak davrandığı halidir. Diğer bir tabirle, kritik sıcaklığının yukarısına ısıtılan ve aynı zamanda kritik basıncının yukarısına bastırılan bir gazdır. Kritik basıncın (P_c) üzerinde bir basınçta tutulan bir sıvının bazı özellikleri (yoğunluk, viskozite vb.) sıcaklığın yavaş yavaş artırılması ile değişir, bu da SKA oluşumunu sağlar. Benzer şekilde kritik sıcaklığın (T_c) yukarısında ısıtılan gaz, yavaşça artan basınçla süper kritik akışkanı oluşturur. Bu sayede katı kimyasal maddeler, dışardan uygulanan etkilerle basınç ve sıcaklık değerlerinde değişiklik yapılarak, maddenin birçok haline dönüştürülür [21].

Şekil 2.4’de karbondioksit basınç-sıcaklık faz diyagramı grafiği verilmiştir [22].



Şekil 2.4. Karbondioksit basınç-sıcaklık faz diyagramı

Yukarıdaki şekilde gösterilen üçlü noktada üç faz beraber bulunur. Eğrilerin üzerinde kısımlarda iki faz beraber bulunur. Sıvı-gaz fazlarının beraber bulunduğu eğride (buhar basıncı ve sıcaklık eğrisi) ilerledikçe sıcaklık ve basınç artar. Sıvının yoğunluğunun termal genişmeden dolayı azaldığı görülürken gazın yoğunluğu ise basınç arttığı için artar. İki fazın yoğunlukları kritik noktaya ulaşıldığında ise birbirleriyle aynı olur ve artık gaz ile sıvı arasındaki farklılık ortadan kalkar. Süperkritik akışkanların özelliklerini sıcaklık ve basınç

değişimleri ile ayarlayabiliriz. Basıncı artırdığımızda süperkritik akışkan halde bulunan maddede gaz benzer özelliklerden sıvıya benzer özelliğe doğru değişim gözlenir. Yapılan bu değişimlerle süperkritik akışkanda termodinamik özellikler de değişir. Maddemiz Kritik sıcaklığa yakın sıcaklıklara getirildiğinde, ufak basınç değişikliklerinde süperkritik akışkanın özelliklerinde ani değişiklikler meydana geldiği görülür. Bu ani değişikliklerden en bilineni yoğunluk değişimidir. Maddenin Entalpi gibi diğer özelliklerinde de kritik sıcaklığa yakın sıcaklıklara gelindiğinde yoğunluktaki gibi ani değişiklikler olduğu görülmektedir [23].

Süperkritik akışkanların fizikokimyasal özellikleri dikkate alınırsa, süperkritik akışkanlar gaz ve sıvı arasında bir faz olarak yer alır. Diğer çözücülerden daha iyi performans göstermesini bu sıvı ve gaz arasındaki özelliği sağlar. Süperkritik akışkanın sıvı hali, gaz hali ve süperkritik bölgedeki halinde yoğunluk, viskozite ve difüzyon katsayılarını gösteren tablo çizelge 2.2’de verilmiştir [24].

Çizelge 2.2. Bir akışkanın sıvı, gaz ve süperkritik bölgedeki fizikokimyasal özellikleri

Fizikokimyasal Özellik	Sıvı	Süperkritik Akışkan	Gaz
Yoğunluk (kg/m^3)	600-1600	200-1000	1
Viskozite (kg/m.s)	$1,0 \times 10^{-3}$	$1,0 \times 10^{-4}$	$1,0 \times 10^{-5}$
Difüzyon Katsayısı (m^2/s)	$1,0 \times 10^{-9}$	$1,0 \times 10^{-7}$	$1,0 \times 10^{-4}$

Süperkritik akışkanlar kütle transfer özelliği bakımından gazlara, çözünürlükleri açısından ise sıvılara benzerlik göstermektedir. Süperkritik akışkan yoğunluğun artması ile sıvı fazın özelliğini göstererek, çözme gücü artmaktadır ve gazlardan daha fazla madde çözebilmektedirler. Bununla birlikte süperkritik akışkanların taşınması sıvılara göre daha kolaydır ve katı maddelerin içine de kolaylıkla difüze edilebilirler. Özütü elde etmek istenen maddeyi sıvı maddelerden daha kolay bir şekilde bulunduğu yapıdan ayırabilmektedir. Özütleme işleminin şartları süperkritik akışkanın yoğunluk gibi fizikokimyasal özelliklerini değiştirebilmesi nedeniyle önemlidir [25].

Fiziksel kimya, termodinamik kimya ve yoğun madde fiziğinde kritik noktanın adlandırılması, bir maddenin sıcaklığı artarken artık sıvı halinin olmadığı koşulları belirten nokta ile tanımlanır. Bir sıvının ısısı yükselirken, basınç etkisine bağlı olarak buharının

yoğunluğu artış gösterirken, kendisinin yoğunluğu ısı genleşmeyle düşmeye başlar. Sıvı ve buharının yoğunluk değerleri birbirine yaklaşmaya başlar ve kritik noktaya gelindiğinde, iki yoğunluk değeri birbirine eşit hale gelince, sıvı ile gaz fazları arasındaki sınır tabakası da yok olmuş olur [26].

Isıl genleşmeler sebebiyle, sıvının yoğunluğu azalırken, basıncın artmasından dolayı gazın yoğunluğu artmaya başlar. Giderek iki fazın yoğunlukları birbirine yaklaşır, gaz ve sıvı fazlar arasındaki farklar kaybolur ve faz eğrisi bir kritik noktaya gelir. Bu noktada madde artık akışkan olarak adlandırılır ve bu bölge süperkritik bölgedir [27].

Süperkritik akışkanın viskozitesi ve yayılışı, gazlara çok benzerdir; bu durum yüksek bir ayırıcı faz hızında yüksek bir ayırma verimliliğini oluşturur. Bu arada, süperkritik akışkanın yoğunluğu ve yayılışı, sıvılarınkine benzerdir ve ayrılması gereken maddeler için iyi bir çözünürlük özelliği sağlar [28].

Süperkritik faza geçiş tersinir bir süreçtir. Bu geçiş sırasında olan olaylar şu şekilde özetlenebilir:

1. Kritik noktanın altındaki madde iki fazdan oluşur.
2. Sıcaklık derecesi arttıkça sıvı genleşir.
3. İki faz arasındaki ayırım gittikçe belirsizleşir.
4. Süperkritik akışkana geçildiğinde tek faz olur.
5. Sistem soğutulmaya başladığında süreç tersine işler.
6. Sıvı ve buhar fazının birbirinden ayrılması gerçekleşir.

Katı hâlde iken molekülleri birbirine bitişik ve bağlı olan maddelerin sıvı hâle geçtiklerinde ise molekülleri arasındaki mesafe biraz artar ama molekülleri hâlâ birbirine bağlıdır. Sıvının viskozitesi yüksek ise molekülleri arasındaki bu bağlar oldukça güçlü olabilir. Gaz hâlde ise molekülleri arasındaki mesafe oldukça artar ve moleküller arasındaki bağlar ortadan kalkar. Böylelikle gaz hâlindeki madde bulunduğu ortamın hacmini tamamen doldurur [29].

2.5.2. Süperkritik akışkanların seçimi

Süperkritik teknolojisinde kullanılan bazı akışkanların kritik noktaları Çizelge 3.3'te verilmiştir [30].

Çizelge 2.3. Süperkritik teknolojisinde kullanılan bazı akışkanların kritik noktaları

AKIŞKAN (ÇÖZÜCÜ)	KRİTİK SICAKLIK T _c (K)	KRİTİK BASINÇ P _c (MPa)	KRİTİK YOĞUNL UK ρ _c (g/cm ³)
Su	647,3	22	0,322
Karbondiyoksit	304,2	7,38	0,468
Metanol	512,6	8,09	0,272
Etanol	516,2	6,38	0,276
Propanol	536,7	5,17	0,275
2-Propanol	508,3	4,76	0,275
Etilen	282,4	5,04	0,218
Triflormetan	299,1	4,88	0,525
Etan	305,4	4,88	0,203
Azotoksit	309,6	7,24	0,45
Sülfürheksaflor	318,7	3,76	0,74
Propan	369,8	4,24	0,217
1,1-Difloreten	386,6	4,5	0,365
Amonyak	405,6	11,3	0,235
n-Bütan	425,2	3,8	0,225
Metilamin	430	7,46	0,202
1-Hekzen	504	3,17	0,238
t-Bütanol	506,2	3,97	0,269
n-Hekzan	507,4	3,03	0,233
Aseton	508,1	4,7	0,278
Toluen	591,7	4,11	0,292
p-Ksilen	616,2	3,52	0,28
Metan	190,6	4,6	0,162
Klorotriflormetan	302	3,92	0,579
Propilen	365	4,62	0,233
Dietileter	467,7	11,3	0,265
n-Pentan	469,6	3,37	0,237
Benzen	562,1	4,89	0,302
Piridin	620	5,63	0,312
Ksenon	289,7	5,84	1,113
Etil asetat	250,2	22,06	

Çizelge incelendiğinde; amonyak, n-pentan, metanol ve tolueenin kritik sıcaklıkları yüksek olduğundan, sıcaklığa duyarlı olan doğal maddelerin özütlenmesi için uygun çözücü olmadıkları görülmektedir.

Saf hidrokarbonlar patlayıcı ve yanıcı özellikli oldukları hâlde bazı durumlarda çözücü olarak kullanılabilir. Aromatik bileşiklerin bazıları yüksek süperkritik koşulları nedeniyle ısıya karşı hassas ve bozunabilen bileşiklerin özütlenmesinde kullanılamaz. Su, avantajları olması ile birlikte genellikle koroziv etkilidir. Amonyak, kokusu kötü olduğu için pek kullanılmaz. Azotoksitin, düşük kritik koşulları vardır ve polar yapısı nedeniyle ilgi görse de yağlarla birlikte kullanıldığında patlamalara yol açabilir [31].

CO₂ maddesi zehirli, yanıcı ve pahalı olmadığından üründen ayrılması kolay ve düşük kritik sıcaklık ve basınç değerlerine sahip olup (T_c=31,1 °C; P_c=72,8 atm) iyi bir çözücü özelliği gösterir. Isıl olarak kararsız ve apolar biyoaktif bileşenler için uygundur. Ancak apolar özelliğinden dolayı polar molekülleri çözmek için kullanılmaz. Polar bileşiklerin çözünürlüğü ve prosesin seçiciliği akışkana az miktarda (en çok % 5) diğer çözücülerden (etil alkol, metil asetat, metil alkol vb.) ilave edilerek saklanabilir. CO₂'nin sudaki çözünürlüğü düşük olduğundan, sulu çözeltilerden organik bileşiklerin özütlenmesinde çözücü olarak kullanılmaktadır. CO₂ hemen hemen her organik özüt ile karşılaştırılacak kadar yüksek uçuculuğa sahip olduğundan dolayı özüt çözeltilisinden ürünün yeniden kazanılması, CO₂'nin kolayca ayrılması mümkün olmaktadır [32].

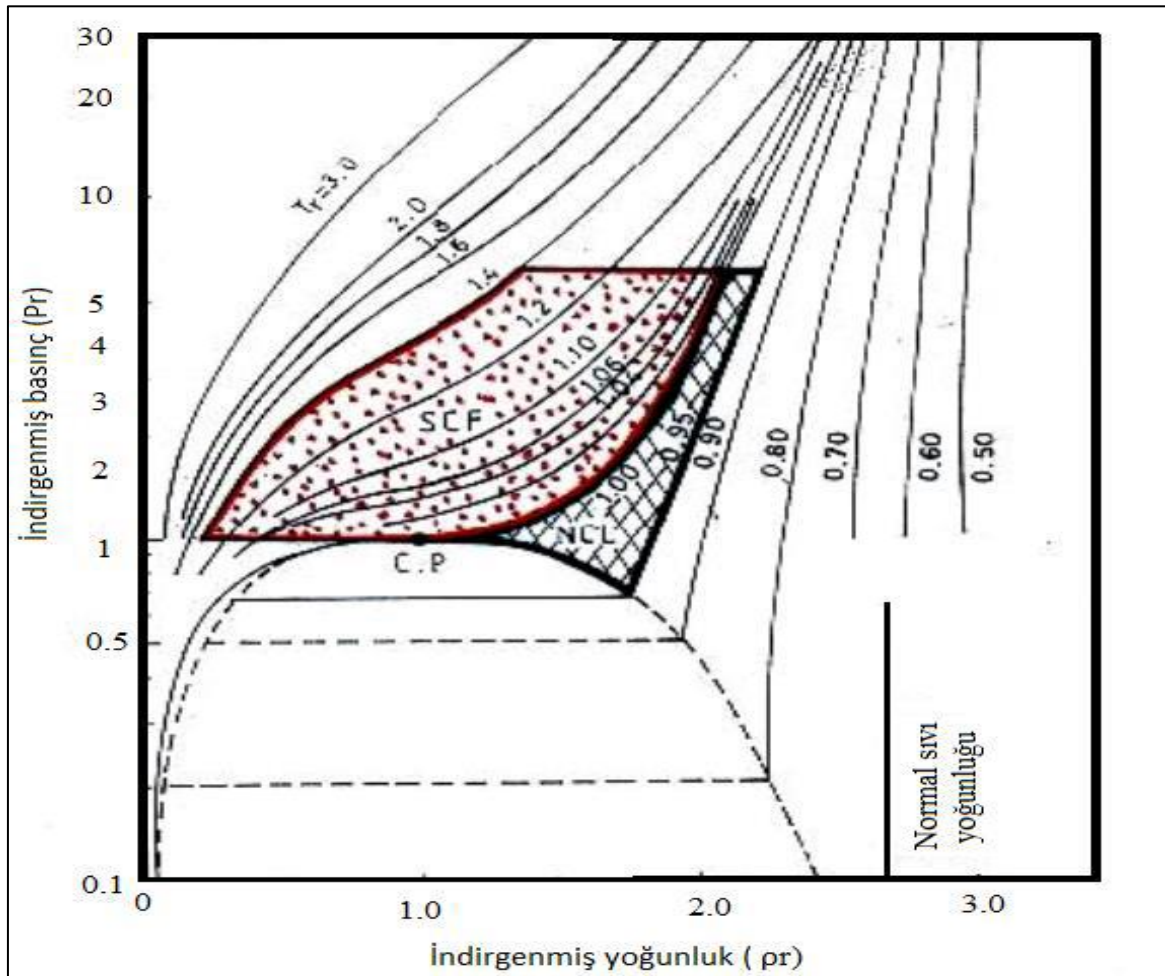
2.5.3. Süperkritik akışkanların çözme gücü

Süperkritik bir akışkanın çözme gücü o akışkanın yoğunluğu ile ilişkilidir. Süperkritik CO₂'in yoğunluğu, kritik noktada yani kritik sıcaklık ve basınç değerlerine yakın bölgede basınç ve sıcaklıkla çok belirgin bir şekilde değişmektedir. CO₂'in yoğunluğu oda şartlarında iken 2,0 kg/m³, kritik noktada ise 470 kg/m³ tür. Bu durumda; CO₂'in oda koşullarındaki çözme gücü oldukça düşükken, kritik sıcaklık ve basınca geldiğinde ise oldukça yüksektir. Süperkritik akışkanların sıcaklık ve basıncındaki çok küçük değişiklikleri akışkanın yoğunluğunda değişikliğe sebep olur. Bu durum, süperkritik akışkanların çözücü özelliklerini etkiler [25].

Aşağıdaki şekil 2,6'da CO₂'nin indirgenmiş yoğunluk değerinin indirgenmiş sıcaklık ve indirgenmiş basınçla değişim grafiği gösterilmiştir. Şekil 2.6'da iki bölge vardır. Şekilde süperkritik akışkanlarla özütleme işlemlerinin uygulandığı en uygun sıcaklık ve basınç değerlerini gösteren bölge süperkritik akışkan (SCF) bölgesidir, akışkanın sıcaklık ve basınç değerlerinin kritik sıcaklık ve basınç değerlerine oldukça yakın olduğu bölge ise kritik altı

bölgede (NCL)'dir. Bazı süperkritik CO₂ özütleme işlemlerinde bu kritik altı bölgenin süperkritik akışkan özütlemesi için belirtilen bölgeden özütleme verimliliği açısından daha verimli olduğu bildirilmektedir.

CO₂'nin indirgenmiş yoğunluk değerinin indirgenmiş sıcaklık ve indirgenmiş basınçla değişimi grafiği Şekil 2.5'te verilmiştir [33].



Şekil 2.5. CO₂'nin indirgenmiş yoğunluk değerinin indirgenmiş sıcaklık ve indirgenmiş basınçla değişimi

Süperkritik CO₂'in farklı sıcaklık ve basınçtaki fizikokimyasal özellikleri incelendiğinde, sabit sıcaklıkta basıncını artırdığımızda CO₂'in viskozitesi ve yoğunluğunun arttığı; ancak sabit basınçta ise sıcaklığını artırdığımızda viskozite ve yoğunluk değerlerinin düştüğü görülmektedir. Sıcaklık ve basınçtaki çok küçük değişikliklerin süperkritik CO₂'in fizikokimyasal özelliklerinde önemli değişikliklere sebep olduğu görülmektedir [34].

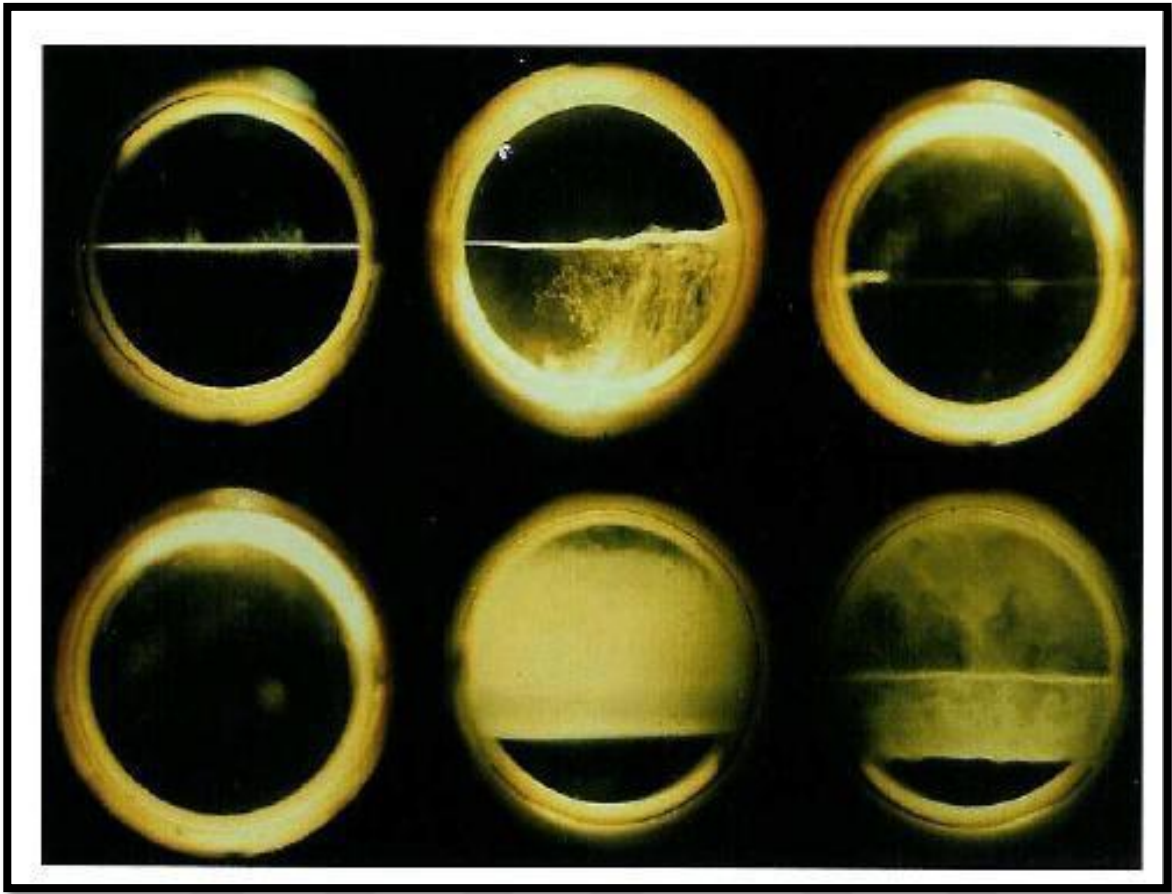
Süperkritik CO₂'in çeşitli sıcaklık ve basınçtaki fiziksel özellikleri çizelge 2.4'te verilmiştir [35].

Çizelge 2.4. Süperkritik CO₂'in çeşitli sıcaklık ve basınçtaki fiziksel özellikleri

Basınç (atm)	Sıcaklık (K)	Yoğunluk (kg/m ³)	Viskozite (kg/(m.s))
245	313	879,5	8,2x10 ⁻⁵
	328	806,2	6,9x10 ⁻⁵
	343	730	5,7x10 ⁻⁵
176	313	814,6	7,0x10 ⁻⁵
	328	712,5	5,4x10 ⁻⁵
	343	599,1	4,1x10 ⁻⁵
108	313	676,1	4,7x10 ⁻⁵
	328	379,4	2,7x10 ⁻⁵
	343	283,6	2,4x10 ⁻⁵

Resim 2.1'de sıvı bir maddenin süperkritik faza geçişi ve soğutulmasıyla tekrar normal şartlara geri dönüşü görülmektedir. Akışkanların görünümünü sırasıyla incelediğimizde, kritik noktanın altında belirgin bir şekilde iki faz bulunmaktadır. Sıcaklık yükselince sıvı genişler ve faz ayrımı belirsiz olmaya başlar. Süperkritik faz oluşmaya başlayınca fazlar arasındaki ayırım çizgisi de kaybolur. Kritik noktadan sonra sistem tekrar soğutulmaya başlanır ve tersinir bir süreç gözlenir. Fazlar arasındaki ayırım tekrar belirir ve aradaki çizgi tekrar oluşur.

Resim 2.1'de süperkritik faza geçerken bir akışkanın görünümü verilmiştir [36].



Resim 2.2. Süperkritik faza geçerken bir akışkanın görünümü

Süperkritik özütleme genel olarak hızlı bir tekniktir, özütleme işlemi genel olarak birkaç saat içerisinde biter. Organik çözücülerle yapılan klasik özütlemeler ise çok uzun zaman alır [36].

Süper kritik akışkanların çözücü gücü sıcaklıklarında ve basınçlarında yapılan küçük değişikliklerle büyük oranda değiştirilebilir. Sıvıların çözme gücü ise sıcaklık ve basınçtan fazla etkilenmez. SCF'ların bu üstün özelliğinden dolayı sıcaklık ve basınçta yapılan küçük değişikliklerle SCF'ın çözme gücü ve oranı değiştirilerek, bu özellik sayesinde ürünün verimi ve ürün seçiciliği artırılabilir. SFE işlemlerinde özütlemenin sonunda basıncın düşürülmesi ile çözücü kolaylıkla geri kazanılabilir. SFE işlemlerinde sıklıkla kullanılan çözücü CO₂; ucuz, inert ve çevreye, sağlığa zararsızdır. Fakat SFE, yüksek basınç şartları altında gerçekleştirilen bir özütleme yöntemi olup başlangıç yatırım maliyeti yüksektir [37].

Uygulamaya ait diğer değişkenler ise uygulama maliyeti, özütün saflığı, içerikteki katkıları veya katkısız ürün elde etmek ile ürünün ticari değeri kıyaslanarak bu yöntem kimi özel ürünler için tercih edilen bir yöntem olmaktadır. Bitkilerin aktif maddelerinin doğal yollarla

ve çözücü kalıntısı olmadan özütlenmesi SFE uygulamalarının başında gelir. Toplumda bilinçlenme oranı arttıkça, insanlar zararlı kalıntılar içermeyen bitkisel kaynaklı ilaçlara ve gıda takviyesi ürünlere ilgi göstermektedirler [16].

2.5.4. Süperkritik akışkan teknoloji uygulamaları

Süperkritik akışkan ortamında gerçekleştirilen uygulamalar çizelge 2.5’de gösterilmiştir [37].

Çizelge 2.5. Süperkritik akışkan ortamında gerçekleştirilen uygulamalar

SFE Uygulamaları
Kahve ve çaydan kafeinin uzaklaştırılması
Tohumlardan vitamin yağlarının özütlenmesi
Tat verici, güzel kokulu aroma ve parfümlerin özütlenmesi
Baharat özütlenmesi
Hayvansal ve bitkisel kaynaklı yağlarda koku veren maddelerin uzaklaştırılması
Meyve sularının stabilizasyon işlemleri
Yünden lanolin üretimi
Doğal ürünlerden pigment özütlenmesi
Hazır yiyeceklerdeki yağın uzaklaştırılması
Kolesterol uzaklaştırılması
Bitkilerden antioksidan özütlenmesi
Tütünden nikotinin uzaklaştırılması
Farmasötik bitkilerden ilaç etken maddelerin özütlenmesi
Şerbetçi otunda acılık veren maddelerin uzaklaştırılması

SCF KROMATOĞRAFİSİ UYGULAMALARI
Doğal kaynaklardan elde edilen bileşikler
İlaçlar
Gıda ürünleri
Fosil yakıtlar
Pestisitler
Yüzey aktif maddeler
Polimerler
Polimer katkı maddeleri
Roket yakıtları
Patlayıcı maddeler

Çizelge 2.5. (devam) Süperkritik akışkan ortamında gerçekleştirilen uygulamalar

Kimyasal/biyokimyasal tepkimeler
Homojen/heterojen katalizler kullanarak gerçekleştirilen reaksiyonlar
- İzomerizasyon
- Hidrojenerasyon
- Enzim katalizli reaksiyonlar
- Fischer-Tropsch sentez gibi
Polimerizasyon
Kiral bileşiklerin sentezi
Nano/mikro Tanecik Tasarımı
RESS (Rapid Expansion of Supercritical Fluids)
GAS (Gas Antisolvents)
ASES (Aerosol Solvent Extraction System)
SAS (Supercritical Antisolvents)
Ters misel uygulamaları
Çevresel Uygulamalar
Adsorbanların rejenerasyonu
Atık sulardan organik kirliliklerin giderilmesi (süperkritik H ₂ O oksidasyonu)

2.5.5. SCCO₂ işleminde nem miktarının etkisi

Süper kritik özütleme işlemlerinde özütlenecek örnek içindeki nem miktarı özütleme sürecine etkileyebilir. Öğütülmüş soya fasulyesinin süperkritik karbondioksit özütlenmesi işlemi sırasında %3-12 arasındaki nem oranının özütleme verimini değiştirmedığı rapor edilmiştir. [38] Ayrıca Martinez ve arkadaşları örneklerdeki nem miktarının, çıkan yağ kalitesini ve yağ asitlerinin bileşimini etkilemediği (%2.5-%7,5) belirtilmiştir. [39] Özütlenecek bitkideki nemin hiç kalmaması için hazırlanan numunelerin derin dondurucuda veya etüvde kurutulması gerekir. Numunenin içeriğindeki suyu tamamen almak için örnekler hidromatriks ve 2,2-dimetoksi-propan (DMP) gibi nem çekiciler kullanılarak da kurutulabilir. Yapılan birçok çalışmada özütleme verimliliğinin, nem miktarı azaldıkça arttığı gözlemlenmiştir [40].

2.5.6. SCCO₂ işleminde parçacık büyüklüğünün etkisi

Gürü ve İçen tarafından 2004 yılında yapılan parçacık büyüklüğü değiştirilmesi deneysel çalışmalarında organik çözücülerle çay atıklarından kafein özütlenmiş ve tanecik boyutu küçüldükçe özütlenen kafein miktarının arttığı gözlenmiştir. [41] Park ve arkadaşları tarafından 2007 yılında yapılan çalışmada tanecik büyüklüğü arttıkça, küçük tanecikli numunelerle yapılan çalışmalarda verime ulaşabilmek için çok daha uzun özütleme

yapılması gerektiği tespit edilmiştir. Örneğin 40. dakikada 236,5 µm tanecik boyutu ile çalışıldığında verim %75,7 iken 5,5–17,4 mm tanecik boyutu ile çalışıldığında verimin %32,3 olduğu görülmüştür [42].

2.5.7. SCCO₂ işleminde özütleme süresinin etkisi

Özütleme süresi, çözünürlük, gözenek yapısı gibi özelliklere göre farklı sonuçlar getirebilir. Bjornsson ve arkadaşları mikroalglerden triasilgliseroller elde etmek için süperkritik karbondioksit özütleme yöntemi ile çalışmalar yapmıştır. Çalışmalar “*Nannochloropsis granulata* ve *Botryococcus braunii*” türü mikroalglerle yapılmıştır. Çalışma sonucunu karşılaştırmak için de Hekzan (Soxhlet) özütlemesi yöntemi kullanılmıştır. Süperkritik CO₂ özütlemesi deneylerinde parametre değişikliği çalışmalarında özütleme süresinin çıkan yağ verimine etkisi incelenmiştir. 50 °C sıcaklık, 35 MPa basınç ve 100 g/dk CO₂ debisiyle çalışılmış, 180, 270 ve 360 dakika sürelerde ayrı deneyler yapılmıştır. Özütlemenin süresi 180 dakikadan 270 dakikaya çıkarıldığında çıkan yağ verimi yaklaşık iki katına ulaşmıştır. Fakat çıkan 360 dakikaya çıkıldığında çıkan yağ verimi açısından önemli bir değişiklik gözlenmemiştir [43].

2.5.8. SCCO₂ işleminde sıcaklığın etkisi

Sıcaklık parametresi değişikliği ile ilgili yapılan çalışmalar incelendiğinde sıcaklığın özütleme verimine etkisine dair birbirinden farklı sonuçlar bulunmaktadır. Solana vd. düşük (150 bar) ve yüksek (300 bar) sabit basınçlarda çalışarak, sıcaklığın çıkan yağ verimi üzerine etkisini görmek için ‘*Scenedesmus obliquus*’ türü mikroalg ile deneyler yapmış ve bu basınç farklılıklarında birbirine ters sonuçlar elde etmiştir. Basınç düşükken yağ verimi sıcaklık artışıyla azalırken, basınç yüksek olduğunda, yağ verimi sıcaklık artışıyla artmıştır. [44] Garcia Alba, ‘*Desmodesmus sp*’ alg türü üzerinde sıcaklık etkisi için deneyler yapmış, 250 ve 350 bar basınçlarda yapılan deneylerde en yüksek verimleri 50 °C’de bulmuştur [45].

Bjornsson ‘*Nannochloropsis granulata*’ türü alg kullanarak 350 bar basınçta 270 dakika sabit özütleme süresinde sıcaklığı 55 °C’den 70 °C’ye çıkardığında çıkan yağ verimin yaklaşık iki katına ulaştığını gözlemlemiştir. [43] Mendes vd. sabit basınç kullanarak yaptıkları deneylerde sıcaklığı arttırdıkça yağ veriminin düştüğünü gözlemlemiştir. [46] Cheung de sıcaklığın çıkan yağ verimine etkisini incelemek için deneylerini düşük ve yüksek olarak iki

farklı basınçta gerçekleştirmiş, deneyinin sonuçları Solana vd. nin çalışması ile benzer çıkmıştır [47].

Tüm bu çalışmalar incelendiğinde, 300 bar'ın altındaki basınçlar ile çalışıldığında sıcaklık arttığında ekseriyetle çıkan yağ veriminin de düştüğü gözlemlenmiştir. Bunun yanında 300 bar ve üzerindeki yüksek basınçlarda yapılan deneylerde ise sıcaklık artışıyla ekseriyetle çıkan yağ verimin artış yönünde meyil gösterdiği görülmüştür. Bütün çalışmalara bakıldığında, basınç düşükken sıcaklık arttığında çıkan yağ verimi düşerken, basınç yüksekken sıcaklık artışı olduğunda çıkan yağ veriminin ise yükseldiği söylenebilir [48].

2.5.9. SCCO₂ işleminde basıncın etkisi

Saldana ve arkadaşları süperkritik karbondioksit işleminde basıncın artırılması, karbondioksitin yoğunluk artışına ve sıvı gibi davranış göstermesine sebep olmakta; karbondioksitin çözücü gücünün artmasını sağlamaktadır. Basınç ve sıcaklığın aktif madde miktarına etkisinin tespit edildiği bir çalışmada kafein bileşiği için, 190 bar'a kadar basınç arttıkça kafein miktarının basınçla arttığını bulmuşlardır [49].

Basınç artışı çözücünün numunedeki gözeneklere daha çok girebilmesini sağlayacağı için daha çok yağ verimi elde edilmesini sağlamaktadır.

2.5.10. Süperkritik akışkan ile özütlemenin avantajları

Süperkritik akışkan özütlemesi birçok avantajı olması sebebiyle, geleneksel olarak yapılan çözücü özütleme yöntemlerine alternatif olma özelliğini kazanmıştır. Avantajları şunlardır:

- Süperkritik akışkanlar, diğer çözücülere oranla düşük viskozite ve yüksek özelliğine sahiptir. Dolayısıyla gözenekli katı maddelerin içerisine sıvı çözücülere göre daha hızlı nüfuz edebilmekte ve özütleme işlemi daha kısa bir süre içerisinde tamamlanabilmektedir.
- Süperkritik akışkanların çözücülük güçleri, sıcaklık ya da basınç değerlerindeki küçük değişimler ile önemli ölçüde değişir. Bu özellik ürün seçiciliği ve ürün verimliliğini etkiler. Çözme gücünü ayarlayabilmemiz, süperkritik akışkan özütleme yöntemlerinde ve süperkritik akışkan kromatografi yöntemlerinde önemli bir avantajdır.

- Doğadaki ürünlerin içeriklerinde az miktarlarda bulunan değerli endüstriyel bileşiklerin ayrılması işlemlerinde süperkritik akışkan özütlemesi etkili bir yöntemdir.
- Süperkritik akışkanlar ile özütleme işlemi sona sonuçlandığında, basıncın düşürülmesi ile süperkritik akışkan çözünen maddeden basitçe ayrılabilir. Böylelikle üründe çözücü kalıntısı kalmamış ve yeni bir saflaştırma, temizleme işlemine ihtiyaç duyulmamış olur.
- Süperkritik akışkanın, özütleme cihazına girişinde sürekliliğin sağlanması, özütleme işlemlerinin yürütücü kuvvetinin de artmasına neden olduğu için kütle aktarım hızını artırır.
- Geleneksel olarak kullanılan organik çözücü ile özütleme yöntemlerine kıyasla daha az çözücü harcanması ve özellikle süperkritik akışkanlarla gerçekleştirilen özütleme işlemlerinde çözücü olarak karbondioksitin kullanılması, çevreye daha duyarlı işlemler sağlamıştır.
- Süperkritik akışkan özütlemesinde kullanılan çözücüler inert maddelerdir. Bu özellik sayesinde, süperkritik şartlarda gerçekleştirilen özütleme işlemlerinde herhangi bir oksidasyon, bozunma ya da hidroliz olayının oluşmamasını sağlamaktadır.
- Isıya karşı hassas ve ısı ile bozunabilen bileşiklerin ayırma ve saflaştırmaları için süperkritik akışkan özütlemesi en etkili yöntemdir.
- Süperkritik akışkan sistemi, doğrudan bir kromatografik analiz cihazına bağlanabilir ve elde edilen özütün çevrimiçi olarak analiz işlemi yapılabilir.
- Süperkritik akışkan özütlemesi yöntemlerinde kullanılan akışkan çözücü, özütleme cihazına tekrar geri kazandırılıp çözücü kaybı az olmasından dolayı ekonomik bir ayırma işlemidir [50].

2.5.11. Süperkritik akışkan ile özütlemenin dezavantajları

- Süperkritik akışkan çözücülerle ayırma işlemlerinde, yüksek basınçlarda işlem yapılmasından dolayı pahalı yatırım maliyetleri ve yüksek enerji ihtiyacı bulunur. Bunlar, süperkritik akışkan yönteminin dezavantajlarını oluşturur.
- En saf karbondioksit tüplerinde bile bulunan %1-2 oranındaki oksijenin, antioksidanlar gibi oksijenle etkileşebilen hassas bileşikler ile tepkimeye girip az miktarda da olsa bozunmasına neden olup radikalleri süpürme özelliğini azaltmasına neden olur [50].

3. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

Tez için planlanan çalışma için literatüre bakıldığında Yavşan otu ile ilgili az da olsa yapılan çalışmaların genellikle belirli çözücüler yardımıyla soxhlet özütlemesi tekniği ile yapıldığı ve bunun sonucunda yavşan otu içeriğindeki bileşiklerin tespiti yapıldığı görülmüştür. Literatürde süperkritik CO₂ ile özütlemesi çalışması görülmemiştir. Flavonoid içeriğinin özütlemesi yöntemine göre çok farklı sonuçlar vereceği bilinmektedir. Bu yüzden, birçok avantaja sahip süperkritik CO₂ özütlemesi metodu ile tez çalışması yapılması amaçlanmıştır. Ülkemizde yaygın olarak yetişen, ekonomik değeri olmayan ve şifalı özelliği geleneksel olarak bilinen yavşan otu ile SCCO₂ özütlemesi planlanmıştır. Bu bitkiden SCCO₂ ile özütlemesi yapılarak, çıkan özütlerdeki flavonoidlerin varlığı ve miktarsal analizi yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemi ile bulunmuştur.

Nuralın ve arkadaşları dikkat çekici flavonoidler olan quercetin, rutin, kaempferol bileşiklerinin miktarsal tayini için ığde çekirdeği, ayva çekirdeği ve kıvılçam kozalağı kullanılarak yapılan SCCO₂ deneylerinde, özütlemesi süresi, basınç, sıcaklık, parçacık boyutu, CO₂ akış hızı ve yardımcı çözücü olarak etanolün etkileri araştırmıştır. Çalışma sonunda optimum toplam özüt miktarı ve toplam flavonoid miktarı sonuçları sırasıyla; kıvılçam kozalağında 72,28 mg/g ve 7,95 µg/g, ığde çekirdeğinde 66,51 mg/g ve 4,84 µg/g, ayva çekirdeğinde ise 212,40 mg/g ve 6,47 µg/g olarak bulunmuştur [16].

Milena ve arkadaşları tarafından 29 türün 52 örneğinde yüzey flavonoid aglikonlarının dağılımı üzerine yapılan bir çalışmada, veronika bitkilerinin sekiz flavon aglikonunu içerdiği tespit edilmiştir. Bu flavonoidler içerisinde en çok bulunanlar apigenin ve luteolin olduğu görülmüştür. Yavşan otunda ise en çok apigenin bulunduğu tespit edilmiştir [51].

Anggrianto ve arkadaşları tarafından börölce ve fıstıktan yüksek protein düşük yağ içeren diyet ürün elde edilebileceği görülmüştür. Bunun için börölce ve fıstıktan SCCO₂ özütlemesi yöntemiyle işlem gerçekleştirmişlerdir. Çalışma aralığı olarak 250-350 bar arasında 4 ila 60 °C arasında ve 10-20 g/dak CO₂ akış hızını kullanmışlardır. Çalışma sonunda 250 bar 60 °C ve 10 g/dak CO₂ akış hızı börölce için % 5,4 verim ile ve 350 bar 60 °C ve 15 g/dak CO₂ akış hızı fıstık bazlı diyet ürünü için % 48,5 verimle eldesinde optimum şartlar olarak belirlemişlerdir [52].

Yi ve arkadaşları Kore çamını araştırma konusu yapmışlardır. Kore çamında bulunan polifenoller, yüzey cevap metoduyla, % 28,1 düzeyinde saflaştırmışlardır. 7 farklı kanser türünü bu polifenollerle muameleye tabi tutmuşlardır. Çalışılan kanser türleri arasında kolon, göğüs, cilt, akciğer, sinir sistemi gibi türler bulunmaktadır. Ayrıca yaptıkları analizlerde kateşin, metil quercetin, o-vanillin, luteolin ve koronarik asit bileşenlerini Kore çamında tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, bulunan bu maddelerden dolayı Kore çamının hazır bir polifenol kaynağı olduğunu ve çalışılan yöntemler ile fonksiyonel gıda uygulamalarında etkili bir ajan olarak kullanılabileceğini vurgulamışlardır [53].

Faramarz ve arkadaşları, İran'da 7 farklı bölgeye ait iğde çeşidinin kabuk, iç ve çekirdeklerinde toplam fenoller ve toplam flavonoidleri çalıştıkları araştırmalarında toplam fenoller spektrometrik Folin-Ciocalteu yöntemiyle Quercetin eşdeğeri (QE) cinsinden hesaplamışlar, toplam flavonoid miktarlarını ise Quercetin eşdeğeri (QE) miktarı olarak bulmuşlardır. Toplam fenolikler için, çekirdekte 2,14 ile 6,26 mMQ/mg özüt değerine, iç (meyve) kısmı için 0,14 ile 1,54 nMQ/mg özüt değerine ve kabuklar için ise 0,12 ile 2,59 mMQ/mg özüt değerine ulaşmışlardır. En yüksek fenolik içeriğe ise çekirdeğin sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Aynı şekilde toplam flavonoid için çekirdekte 4,7 ile 17,6 mMQ/mg özüt değerine, iç kısmında ise 0,62 ile 1,90 mMQ/mg özüt değerine ve kabuk kısmı için ise 0,64 ile 1,13 mMQ/mg özüt değerine ulaşmışlardır. Yine en yüksek flavonoid içeriğinin ise çekirdekte bulunduğunu tespit etmişlerdir [54].

Fernandez ve arkadaşları, hint kirazı yapraklarından süperkritik CO₂ ve süperkritik altı su özütlemeye yöntemlerini kullanarak elde ettikleri örnekler için uygun şartları 55 °C sıcaklık, 100 bar basınç ve çözücü olan CO₂'in yanında yardımcı çözücüye ise % 20 oranında etanol olarak bulmuşlardır. Süperkritik altı su özütlemesi ile yaptıkları çalışmada ise CO₂ ve etanol çözücülerini ile karışım özütlemekten daha yüksek verime ulaştıklarını belirtmişlerdir. HPLC yöntemi ile, elde edilen özütlerdeki ana polifenollerin miktar analizini yapmışlar ve antioksidan aktivitesini araştırmışlardır. Yaptıkları çalışmalarında süperkritik altı su özütlemesinde, 100 g yaprak başına 1365 mg mangiferin ve 409 mg quercetin bulmuşlar, ve 100 bar, 55 °C'deki SC CO₂ özütlerinde ise en çok 184 mg mangiferin ve 231 mg quercetin elde etmişlerdir [55].

Döker ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada susam yağının SFE sürecinde özütlemeye verimine etki eden; tanecik büyüklüğü (300–1180µm), sistem basıncı (250–350 bar), sistem

sıcaklığı (50–70 °C) ve sistemin SC CO₂ akış hızı (0,91–2,71 g CO₂/dak) gibi parametrelerin etkisini incelemiştir. Araştırmacılar, işletme basıncı ve kütleli SCCO₂ akış hızının artırılması ile özütleme veriminde artış olduğu ve özütleme süresinin azaldığını bildirmişlerdir. Susamların tanecik boyutunun küçültülmesi ile gözenek içi difüzyon direncinin azaldığını ve SCF akış hızındaki artış ile konveksiyon artışına bağlı olarak özütleme veriminin de arttığını vurgulamışlardır. Yapılan bu çalışmada, en yüksek özütleme verimine; 300–600 µm ortalama tanecik büyüklüğü 50 °C sıcaklık, 350 bar basınç ve 2 mL CO₂/dak akış hızı koşullarında ulaşılmış ve tohumlardaki yağ içeriğinin %85'i elde edilmiştir. Organik çözücü özütlemesi ile SCCO₂ özütlemesi arasında yağ bileşiminde anlamlı bir farkın görülmediği rapor edilmiştir [56].

Mitra ve arkadaşları ortalama tanecik büyüklüğü 500 µm olan öğütülmüş tohumları kullanarak kabak çekirdeği yağının SCCO₂ özütleme sürecinde özütleme verimine etki eden; basınç (15.16-34,45 MPa) ve sıcaklık (35-75 °C) etkisini araştırmışlardır. Araştırmacılar optimum sonuç elde etme çalışmaları sonucunda optimum özütleme koşullarının; 32,14 MPa, 68,1 °C ve 94,6 dak olduğunu saptamışlardır. Ayrıca belirtilen koşullarda gerçekleştirilen ayırma işleminde elde edilen yağın karakterizasyonu incelenmiş ve linoleik asit bakımından çok zengin bir yağ olduğu belirtilmiştir. Yağ asitlerinin analizi sonucunda kabak çekirdeği yağında kütlece %12.8 palmitik asit (C16:0), %11,2 stearik asit (C18:0), %29.5 oleik asit (C18:1) ve %45.5 linoleik asit (C18:2) bulunduğunu tespit etmişlerdir [57].

Kiriamiti ve arkadaşları tarafından ayçiçeği yağının süperkritik akışkan özütlemesini, 250 bar sabit basınç altında, 40 – 60 °C sıcaklık, 0,25 – 1,25 mm parçacık boyutu büyüklüğü, 1,4–3.02 kg/saat çözücü akış hızı koşullarında incelemiştir. 1,4 kg/saat ve 3,02 kg/saat çözücü akış hızında 250 bar basınç ve 40 °C sıcaklık koşullarında öğütülmemiş tohum örnekleri ile gerçekleştirilen ayırma sürecinde yağın çözünürlük değerini 3,8 g yağ/kg CO₂ olarak tesbit etmişlerdir. Ancak öğütülmüş tohum örneklerinin kullanıldığı özütleme sürecinde çözücü akış hızının değişmesi, özütleme veriminde değişikliklere neden olduğunu bildirmişlerdir. Bu değişikliklerin sebebinin ise iç kütle aktarım dirençlerinden kaynaklandığını vurgulamışlardır. Parçacık boyutunun küçültülmesi ile fiziksel olarak katı ile sıvının temas alanının artması ile özütleme oranının arttığı belirtilmiştir. Sıcaklığın özütleme verimine etkisi düşük basınç koşullarında SCCO₂ yoğunluğuna ve yüksek basınç koşullarında ise çözünen maddenin buhar basıncındaki değişimlere bağlı olarak değiştiği belirtilmiştir.

Araştırmacılar, 40 °C sıcaklık ve ayçiçeği yağı için cross-over etkinin gözlemlendiği basınç koşullarının üzerindeki koşullarda özütleme veriminin arttığını tesbit etmişlerdir [58].

Uquiche ve arkadaşları, Şili'nin kıyı kesimlerine özgü bir bitki türü olan boldo yapraklarından süperkritik CO₂ ile esansiyel yağların eldesi üzerine yaptıkları çalışmada; esansiyel yağlar, alkoloidler ve flavonoidler bulunduğunu tesbit etmişlerdir. Deneylerini 40 °C sıcaklık ve 10 MPa basınç altında gerçekleştirmişlerdir. Düşük sıcaklığın ve hızlı sıkıştırılmanın olduğu ortamda esansiyel yağların verimliliğinin çok fazla arttığı sonucuna varmışlardır [59].

Lasekan ve arkadaşları, Çoban Sarımsağının süperkritik CO₂ ile esansiyel yağların eldesi üzerine çalışma gerçekleştirmişlerdir. 40-80 °C sıcaklık aralığı, 20-40 MPa basınç aralığı ve 60-360 dakika özütleme süresi aralığı elde edilen yağ veriminin üzerindeki etkileri araştırılmıştır. En yüksek elde edilen yağ verimi, 210 dakika özütleme süresinde, 30,25 MPa basınç ve 60 °C sıcaklıkta 260 mg/g olarak bulunmuştur [60].

Ksouda ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada 25 farklı Tunus bitki cinsinde yağ asidi içeriği, fenolik içerik ve antioksidan aktivite tayini gerçekleştirmişlerdir. Yağ asidi içerikleri gaz kromatografisi ile tayin edilmiştir. Bitkilerin yağ asidi içerikleri %4.2 ile %66.5 (kuru kütle üzerinden) bulunmuştur. Çalışma sonunda bitki içeriklerinin palmitik asit, oleik asit, linoleik asit ve linolenik asit içeriği bakımından zengin olduğu görülmüştür. Bitki tohumlarının fenolik içeriği folin-ciocalteu yöntemiyle tayin edilmiş ve içerik 30-4700 mg GAE/100 g bitki (kuru kütle) şeklinde verilmiştir. Yine bu bitkilerin DPPH yöntemi ile antioksidan aktivitelerine bakılmış ve iyi derecede antioksidan aktivite gösterdikleri belirtilmiştir [61].

Naves ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada *Garcinia brasiliensis* özütlerinin antioksidan, fenolik içerik ve antimikrobiyal aktivitesini incelemişlerdir. Bitkinin fenolik içeriğinin 344 mg GA/g olduğunu bulmuşlardır. Bitki tohumlarının radikal süpürücü etkisini DPPH yöntemiyle tayin etmişler ve %86,57 olarak bulmuşlardır. Ayrıca bitkinin bakterilere ve mantarlara karşı minimum inhibisyon konsantrasyonunu (MIC) incelemişler ve bitkinin çalışılan mikroorganizmalara karşı iyi bir antimikrobiyal ajan olduğunu söylemişlerdir [62].

Kozłowska ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada çeşitli bitkilerin tohumlarının yağ özütlерinin antioksidan aktivitesi, yağ asidi ve sterol içeriğini incelemişlerdir. Bitki özütlерinin sterol içeriğinin büyük oranda β -stosterolden oluştuğunu bulmuşlardır. Bitkilerin toplam fenolik içeriği tayini için heksan ve kloroform/metanol çözücülerini denemişler. Kloroform/metanol özütlерinin heksandan daha iyi olduğunu belirtmişlerdir. Soxhlet yöntemi ile hazırladıkları bitki özütlерinin radikal kovucu etkisini DPPH yöntemi ile Folch metoduna göre incelemişlerdir. Folch metodunun heksan özütlерine göre daha iyi sonuç verdiğini söylemişlerdir [63].





4. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

4.1. Kullanılan Malzemeler, Kimyasallar ve Kullanım Amaçları

- Yavşan otu hammadde olarak kullanılmıştır.
- %99,9 saf karbon dioksit, özüt elde etmek için çözücü amaçlı olarak kullanılmıştır.
- Quercetin standart maddesi, nicel analiz yapmak için standart amaçlı olarak kullanılmıştır.
- Rutin standart maddesi, nicel analiz yapmak için standart amaçlı olarak kullanılmıştır.
- Kaempferol standart maddesi, nicel analiz yapmak için standart amaçlı olarak kullanılmıştır.
- Apigenin standart maddesi, nicel analiz yapmak için standart amaçlı olarak kullanılmıştır.
- Folin reaktifi antioksidan aktivite tayini yapmak için kullanılmıştır.
- Gallik asit çözeltisi, antioksidan aktivite tayininde standart madde olarak kullanılmıştır.
- DPPH (1,1 – difenil- 2 – pikrilhidrazil) antioksidan aktivite tayini yapmak için kullanılmıştır.
- BHA (Bütillenmiş hidroksi anisol) antioksidan aktivite tayininde standart olarak kullanılmıştır.
- BHT (Bütillenmiş hidroksi tolüen) antioksidan aktivite tayininde standart olarak kullanılmıştır.
- Serum fizyolojik (% 0,9 NaCl) besiyeri hazırlanmasında kullanılmıştır.
- Mueller Hinton agar, bakteri hücreleri için katı besiyeri hazırlanmasında kullanılmıştır.
- Mueller Hinton broth, bakteri hücreleri için sıvı besiyeri hazırlanmasında kullanılmıştır.
- Sabouraud Dekstroz broth, maya hücreleri için sıvı besiyeri hazırlanmasında kullanılmıştır.
- Sabouraud Dekstroz agar, maya hücreleri için katı besiyeri hazırlanmasında kullanılmıştır.
- BF₃ – Metanol (%14), yağ asitleri esterlerinin hazırlanmasında kullanılmıştır.
- Standart yağ asitleri metil esterleri, yağ asitlerinin nitel ve nicel tayininde standart olarak kullanılmıştır.
- MN Chromafil Xtra marka 0,20 µm lik PTFE tipte filtre olarak kullanılmıştır.
- Sigma aldrich marka HPLC saflığında etanol kullanılmıştır.
- Sigma aldrich marka HPLC saflığında asetonitril kullanılmıştır.
- Merck marka HPLC saflığında metanol kullanılmıştır.

➤ SGE marka 250 µL lik HPLC manuel sıvı enjektörü kullanılmıştır.

4.2. Kullanılan Cihazlar

Bitkiyi öğütmek için kullanılan öğütücü değirmen, yavşan otunun deneysel çalışma aralığına uygun boyutlara küçültülmesinde kullanılmıştır. Resim 4.1 bu çalışmaların yapıldığı ilgili laboratuvarından alınmıştır.



Resim 4.1. Retsch marka bitki değirmeni

Elek seti, öğütülerek boyutları küçültülen bitkinin, farklı boyutlara ayrılması için kullanılmıştır. Eleme yapıldıktan sonra iki elek arası ortalama parçacık boyutunun sonucu hesaplanarak boyutlar ayırt edilmiştir.

SCCO₂ cihazı, soğutucu, yüksek basınç pompası, modifiye sıvı pompası ve fırından oluşan sistemden oluşur. Örnekler fırının içerisine 24, 100, 500 mL hacimli olan silindir reaktörler

ile yüklenmektedir. Örnek miktarı önce 5 g ve sonrasında 2,5 g olarak alınmıştır. Çalışmalar 24 mL lik reaktör kullanılarak yapılmıştır. Sistem yarı kesikli tiptedir. Reaktörün iki ucu vida ile kapaklıdır. Örnekler reaktör içine yerleştirilirken, reaktörün başına ve sonuna cam pamukları konularak kapatılıp fırına yüklenir. Resim 4.2 bu çalışmaların yapıldığı ilgili laboratuvarından alınmıştır.



Resim 4.2. Kompresör, CO₂ tüpü, soğutucu, fırın ve pompalı süperkritik sistemi

HPLC cihazı, bitkilerden özüt elde edildikten sonra flavonoidlerin tanımlanması ve miktar tayinlerinin yapılmasında kullanılmıştır. Resim 4.3 bu çalışmaların yapıldığı ilgili laboratuvarından alınmıştır.



Resim 4.3. Dionex marka UV dedektörlü HPLC cihazı ve bilgisayarı

Spektrofotometre cihazı, antioksidan aktivite tayini için absorbans ölçümünde kullanılmıştır. Resim 4.4 bu çalışmaların yapıldığı ilgili laboratuvardan alınmıştır.



Resim 4.4. PG T80/T80+ model UV-GB spektrofotometre cihazı

Mc Farland cihazı, antimikrobiyal aktivite tayininde 0,5 bulanıklılığın ayarlanmasında kullanılmıştır. Resim 4.5 bu çalışmaların yapıldığı ilgili laboratuvarдан alınmıştır.



Resim 4.5. Mc Farland analiz cihazı

Gaz kromatografi cihazı, yağ asidi içeriklerinin belirlenmesinde kullanılmıştır. Resim 4.6 bu çalışmaların yapıldığı ilgili laboratuvardan alınmıştır.



Resim 4.6. Agilent HP GC 6890 gaz kromatografi cihazı

4.3. SCCO₂ Özütleme Yöntemi ile Çalışılan Değişkenler

Çalışma içerisindeki değişkenler:

- Sıcaklık,
- Basınç,
- CO₂ akış hızı,
- Tanecik boyutu

Çalışmanın sonucunda çıkan değişkenler:

- Özütlenen yağ miktarı,
- Kaempferol, quercetin, rutin ve apigenin flavonoidlerinin miktarları alınmıştır.

4.4. SCCO₂ Özütleme Yöntemi ile Çalışılan Sıcaklık ve Basınç Aralıklarının Planlaması

Çalışılan basınç aralığı : 160-260 bar

Çalışılan sıcaklık aralığı: 35-75 °C

Parçacık boyutunun aralığı: Elekten elemeler sonucu, iki elek arası ortalama sonuç alınarak 0,125 mm, 0,3025 mm, 0,4775 mm, 0,655 mm, 0,855mm olarak beş boyut aralığında seçilmiştir.

Karbon dioksit akış hızı: 3, 4, 5, 6, 7 L/dak olarak beş farklı CO₂ akış hızı şeklinde seçilerek uygulanmıştır.

Bu parametre değişikliği çalışmaları, önemiyet sırasına göre önce basınç değişiklikleri için optimum sonuç çalışması, sonra sıcaklık değişiklikleri için optimum sonuç çalışması, sonra parçacık boyutu değişiklikleri için optimum sonuç çalışması ve en son olarak da CO₂ akış hızı değişiklikleri için optimum sonuç çalışması şeklinde olmuştur.

4.5. Yavşan Otu Örneklerinin Hazırlanması

Deneyisel çalışmalarda kullanılan yavşan otu, Karaman ilinin Ermenek ilçesindeki dağlık arazilerden toplanılmıştır. Toplanan yavşan otları yıkanıp, yabancı maddelerden arındırılmıştır. Deneyde yaprakları kullanılacağı için yaprakları, dallarından ve köklerinden ayrılmıştır. Ayrılan yapraklar, gölgede ve temiz bir ortamda iki hafta gibi bir süre bekletilerek kurutulmuştur.

Örneklerdeki nem içeriğinin, süperkritik özütleme işleminin verimliliğini olumsuz etkileyeceği bilinmektedir. Doğadan elde edilen bileşiklerin SCCO₂ özütlemesinde, suyun varlığı ve aktivitesi bileşenlerin birbirleri ile olan etkileşimlerini belirleyen en önemli durumdur. Bitki dokularının içeriğindeki su, süperkritik karbondioksit ile girişim yaparak özütleme işlemini etkileyebileceği gibi, örneğin yapısında değişikliğe neden olarak SCCO₂ işleminin aktarımını da engelleyebilir. İşte bu yüzden toplanan meyve ve sebze örnekleri SCCO₂ işleminden önce kurutularak bekletilmiştir [16].

Yapılan pek çok çalışmada özütleme verimliliğinin, nem miktarı azaldıkça arttığı gözlenmiştir.

Özütleme işlemi öncesindeki numune hazırlama işlemlerinde kurutulan örnekler, öncelikle bitki değirmeninde öğütülerek küçük boyutlar elde edilmiştir. Bitki değirmeninden sonra, daha da küçük boyutlara ulaşabilmek için kahve değirmeninde tekrar öğütülmüş ve ulaşmak istenen boyutlara inmesi gerçekleşmiştir. Daha sonraki işlem ise elek seti kullanılarak farklı boyutlu eleklerin yardımıyla boyutlarına göre beş farklı büyüklüğe ayrılarak sınıflandırılmıştır.

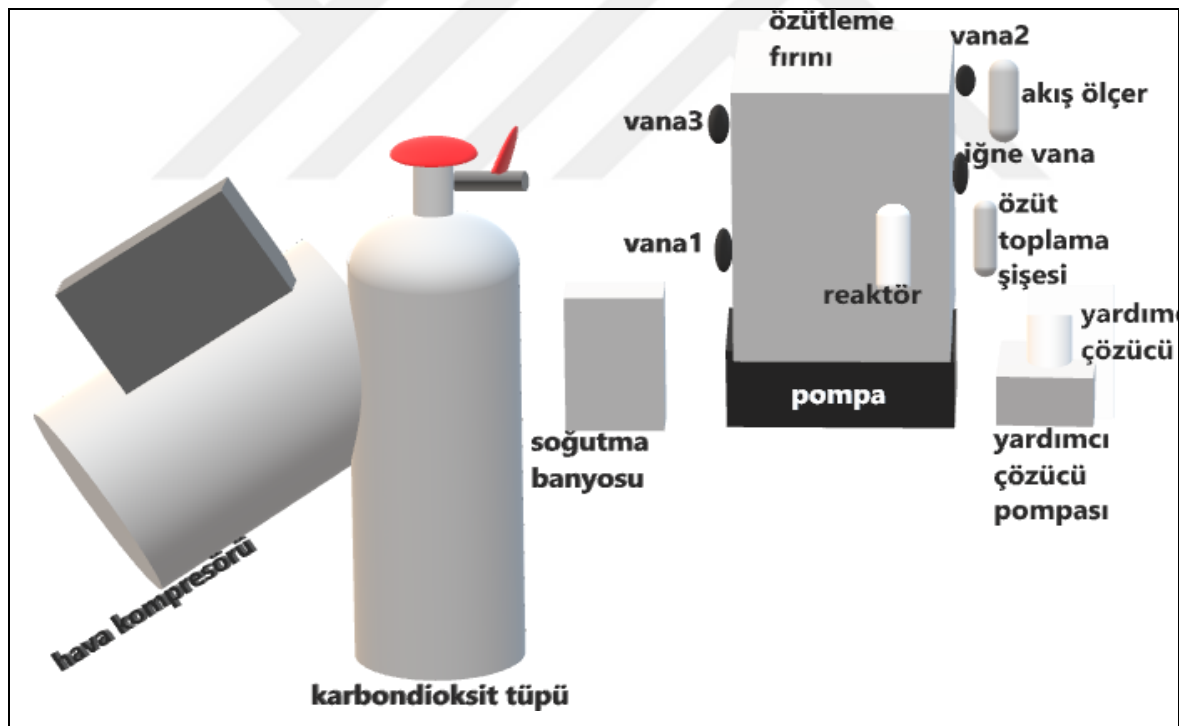
Özütleme işlemi sonrasında elde edilen özütlerin HPLC cihazında analiz edilmesi öncesinde, örnek şişelerindeki özütler etanol çözücüsü ile 3 defa yıkanıp alınmış ve böylelikle HPLC cihazına enjeksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

4.6. SCCO₂ Özütleme Yöntemi ile Özütün Elde Edilmesi

Yavşan otlarından flavonoid elde edebilmek için yağ temini işlemi, Applied separation cihazı ile süperkritik karbondioksit çözücüsü kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Cihazın

sistemine, sifonlu CO₂ tüpünden sıvı olarak CO₂, kompresör cihazından basınçlı hava, hava pompası ile basınç verilmiştir. Devri daim için su banyosu sistemi ile, CO₂ in basınçlı hale gelmesi işleminde kullanılan hava pompalaması esnasında ortaya çıkan ısıнын uzaklaştırılması sağlanmıştır. İstenen sıcaklığa getirilen ekstraktörden özütlenen yağlar toplama kabı tüplerine alınmıştır. Cihazın sistemine bağlı olan akış hızını ölçen alet ise CO₂ miktarının ekstraktördeki örnekten devamlı olarak geçirilmesini kontrol etmek için kullanılmıştır.

Cihazdan çıkan özütler, darası alınmış toplama şişelerine alınmış ve 120 dakikalık özütleme işleminin sonrasında alınan özüt miktarları hesaplanmıştır. Örnek şişesinin sıcaklığının, şişede CO₂ katısı oluşmayacak derecede sıcak ve şişede buharlaşma olmaması için soğuk olmasına dikkat edilmiştir. Süperkritik karbondioksit özütleme sisteminin şeması şekil 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4.1. Süperkritik özütleme cihazı sistemi

4.7. SCCO₂ Özütlenmesi Sonrası Örneklerin Çözülerek Alınması

Kullanılabilecek muhtemel çözücüler içinde aranan flavonoidleri daha iyi çözdüğünden dolayı organik bir çözücü tercih edilmiştir. Organik çözücüler içinde de daha yüksek

çözücülüğe sahip ve diğerlerine göre daha az kalıntı bıraktığından zararı az olan etanol kullanılmıştır. Örneklerin toplandığı kaptan örnekleri alabilmek için toplamda 3ml etanol çözücüsü kullanılmıştır. Kalıntı kalmayacak şekilde etanolle iyice yıkanarak örnekler deney tüpüne alınmış ve derin dondurucuda saklanmıştır. Böylece SCCO₂ cihazından elde edilen örneklerin tamamının alınması hedeflenmiştir.

4.8. Elde Edilen Özütlerin Analiz Yönteminin Belirlenmesi

Uygun mobil fazlar için literatüre baktığımızda, Nuralın ve arkadaşları mobil fazlar için yaklaşık 3 ay süren çalışma ile 250 kadar HPLC analizi yapmış, sonrasında A mobil fazı için % 0,1 oranında formik asit içeren saf su ve B mobil fazı için ise % 75 asetonitril ve % 25 metanol içeriğinin uygun olduğunu bulmuşlardır. Aşağıda ayrıntıları ile belirtilen çalışma şartları ile her bir standart maddenin piklerinin birbirinden ayrıldığı verimli HPLC yöntemi oluşturulmuştur. Çalışmaları oda sıcaklığında yaparak, A ve B taşıyıcı fazları sabit olarak toplam 0,5 ml/dak akış hızında ve 256 nm dalga boyu seçilerek başarıyla gerçekleştirmişlerdir.

Yaptıkları basamaklı çalışma programı ile;

A (Saf su % 99,9 ile formik asit % 0,1) mobil fazı

B (% 75 asetonitril ile % 25 metanol) mobil fazı

t: 0 dakikada % 80 A % 20 B

t: 5 dakikada % 60 A % 40 B

t: 10 dakikada % 30 A % 70 B

t: 15 dakikada % 80 A % 20 B

t: 20 dakikada program sonu

A ve B çözücüsünden yukardaki karışım oranları ile mobil faz beslenilmiş, cihazın programı ise piklerin ayrılması için toplamda 20 dakika çalışılmıştır [16].

Literatürden elde ettiğimiz bu analiz yöntemi ile çalışılmış ve kalibrasyon grafiklerinin r^2 değerleri apigenin için 0,979, kaempferol için 0,9449, quercetin için 0,9983 olarak bulunmuştur. Örneklerle ve standart maddelere ait çalışmalarda, kalibrasyonda kullanılan pik

alanlarına göre ppm olarak standartların ve örneklerin aktif madde konsantrasyonları hesaplanmıştır.

4.9. SCCO₂ Özütleme Yöntemi ile Elde Edilen Özütün Analiz Edilmesi

Süperkritik özütleme cihazından çıkan yağların, içeriğinde aranan flavonoidlerin hepsinin iyi çözündüğü bir çözücü yardımıyla deney tüpüne alınarak, nicel analizlerini belirlemek için HPLC cihazına verilmiştir.

4.10. Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri

Yavşan otunun süperkritik CO₂ özütlemesi ile elde edilen özütlerin antioksidan aktivite tayini için çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bunun için iki yöntem kullanılmıştır.

- DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) radikali giderme aktivitesi tayini yöntemi
- Toplam fenolik madde tayini (Folin-Ciocalteu) yöntemi

4.10.1. DPPH (1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil) radikali giderme aktivitesi tayini yöntemi

2,4 mg DPPH alınır behere alınır, üzerine 50 ml metanol koyulur ve ısıtılarak çözünmesi beklenir. Sonra 100 ml'lik balon jojede metanolla 100 ml'e tamamlanır.

DPPH'nin standart eğrisinin çizilebilmesi için, 2,4 mg DPPH 100 ml metanolde çözülerek son derişimi 6×10^{-5} M olan DPPH çözeltisi hazırlanmış oldu. 517 nm'de metanol körüne karşı absorbansları okunur. Kalibrason grafiği derişime karşı absorbans şeklinde çizilir. Okunan bu absorbans değeri A₀ (kontrol) değeri olur.

Süperkritik karbondioksit ile elde edilen özütlerden 1 ml örnek alınır bir deney tüpünde üzerine 4 ml metanol eklenir. Hazırlanan 5 ml stok örnekten deney tüplerine 100 µl, 50 µl, 25µl alınıp üzerleri 1 ml metanol ile tamamlanarak 3 farklı derişimde örnekler hazırlanır.

Hazırlanan 3 deney tüpünün ölçümü için, 0,2 ml özüt hazırlanan tüplerden alınır. Üzerine 3,8 ml 6×10^{-5} M DPPH eklenir. 30 dakika karanlık oda inkübasyonunda beklenildikten sonra metanol körüne karşı absorbans değerleri okunur. Sırayla hazırlanan 3 örnek tüpü için de aynı işlemler yapılır ve A_{numune} değerleri kaydedilir.

BHA ve BHT standartlarının hazırlanması

BHA hazırlanması

0,01 g bütillenmiş hidroksianisol (BHA) tartılır. 10ml metanolle üzeri tamamlanır. Hazırlanan bu stok çözeltiden 100 µl, 50 µl, 25 µl alınır ve 1 ml metanolle üzeri tamamlanır.

BHT hazırlanması

0,01 g bütillenmiş hidroksitoluen tartılır. 10 ml metanolle üzeri tamamlanır.

Hazırlanan bu stok çözeltiden 100 µl, 50 µl, 25 µl alınır ve 1 ml metanolle üzeri tamamlanır.

Yavşan Otu, BHA ve BHT ‘nin absorbans değerleri her üç deney için ayrı ayrı not edildi. İnhibisyon hesaplamaları yaparken bu üç deneydeki yavşan otu, BHA, BHT’nin absorbans değerlerinin ortalaması alındı.

Yavşan otu için % inhibisyon değeri aşağıdaki eşitliğe göre hesaplandı.

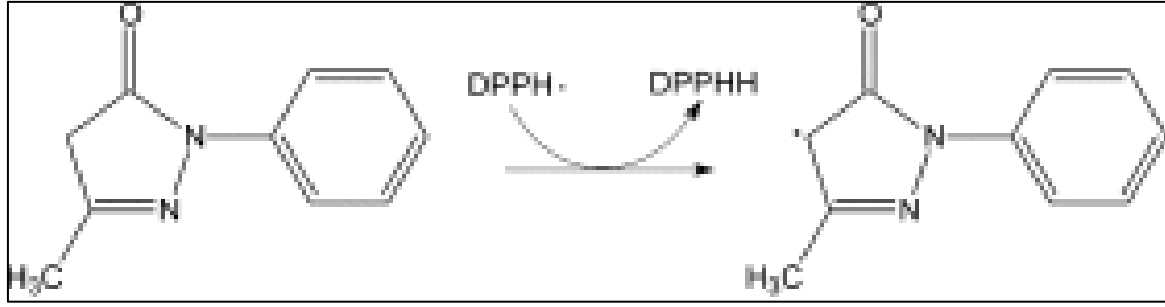
$$I (\%) \text{ DPPH Radikali Giderme Aktivitesi} = (A_0 - A_{\text{NUM}} / A_0) \times 100$$

$$I (\%) \text{ DPPH Radikali Giderme Aktivitesi} = (A_0 - A_{\text{BHT}} / A_0) \times 100$$

$$I (\%) \text{ DPPH Radikali Giderme Aktivitesi} = (A_0 - A_{\text{BHA}} / A_0) \times 100$$

DPPH üzerine antioksidan etki mekanizması

Antioksidanların DPPH radikali üzerine süpürücü etkisi örnek bir molekülle Resim 4.7’de gösterilmiştir [64].



Resim 4.7. Antioksidan etki mekanizması

4.10.2. Toplam fenolik madde tayini (Folin-Ciocalteu) yöntemi

Yavşan otunun süperkritik karbondioksit yöntemi sonrası elde edilen özütten her parametre için ayrı yapmak üzere deney tüpüne 1 ml alınıp 4 ml metanol eklenir. Aynı şekilde gallik asitten 10 mg alınır ve 10 ml %70'lik metanolde çözülür.

Yavşan otu örnekleri için 2 deney tüpü alınır. Hazırlanmış çözeltilerin her biri için 2 tüpe 100 µl ve 40 µl alınır ve üzeri 1 ml metanolle tamamlanır. Sonra her tüpten 40 µl alınır üzerine 2,4 ml saf su, 0,2 ml seyreltilmemiş folin reaktifi ve 0,6 ml %20'lik Na_2CO_3 ilave edilir. Oda sıcaklığında ve karanlıkta olmak üzere 2 saat inkübe edilir. Sonra karışımın absorbansı metanol körüne karşı 765 nm'de okunup not edilir.

Gallik asitten sırayla 5 tüpe, 1 ml, 0,5 ml, 0,25 ml, 0,125 ml ve 0,0625 ml koyulur. Bunların her birinden sırayla başka tüplere 40 µl alınır üzerine 2,4 ml saf su, 0,2 ml seyreltilmemiş folin reaktifi ve 0,6 ml %20'lik Na_2CO_3 ilave edilir. Oda sıcaklığında ve karanlıkta 2 saat inkübasyon yapılır. Sonra karışımın absorbansı metanol körüne karşı 765 nm'de okunup not edilir.

Sonra gallik asit derişimlerine karşı absorbans grafiğı çizilir. Yavşan otu için okunan absorbans değeri grafik kullanılarak gallik asitle eşdeğer cinsinden hesaplanır.

4.11. Antimikrobiyal Aktivite Tayinleri

4.11.1. Bileşiklerin antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi

Mikrodilüsyon yöntemi

Bileşiklerin minimum inhibitör konsantrasyon (MİK), minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) ve minimum fungisidal konsantrasyon (MFK) değerleri mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir. +4 derecede muhafaza edilen sıvı besiyeri (bakteriler için Mueller Hinton broth, mayalar için Sabouraud Dekstroz broth) 96 kuyulu mikropalakaya her kuyucuğa 100 µl olacak şekilde dağıtılmıştır. Konsantrasyonu 2500 µM olan bileşikten 100 µl alınıp ilk kuyuya eklenmiş, ilk kuyudan aynı miktar alınıp sonraki kuyuya geçilmiştir. Bu işlem 8 defa tekrarlanmıştır ve bileşiğin 1250-9,77 µM arasında değişen farklı konsantrasyonları elde edilmiştir. McFarland No: 0,5 (1×10^8 colony forming unit (cfu)/ml)) olarak ayarlanmış olan mikroorganizmalar serum fizyolojik içerisinde 1\10 oranında seyreltilmiştir ve her bir kuyuya 5 µl eklenmiştir. Negatif kontrol olarak besiyeri, pozitif kontrol olarak besiyeri ile mikroorganizma kullanılmıştır. Bakteri olan plakalar 24 saat 37 °C’de, maya olan plakalar 48 saat 30 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. Bileşiklerin MİK, MBK ve MFK değerlerinin belirlenmesi için inkübasyon sonrası mikropalakalar içerisindeki her bir kuyudan 10 µl örnek alınıp bakteriler için Mueller Hinton agar, mayalar için Sabouraud Dekstroz agar besiyerine ekim yapılmış ve uygun sürede inkübasyondan sonra mikroorganizmaların farklı konsantrasyonlardaki üremeleri kontrol edilmiştir. Mikroorganizma üremesinin olmadığı en düşük konsantrasyon bakteriler için minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK), mayalar için minimum fungisidal konsantrasyon (MFK) değeri olarak değerlendirilmiştir. İnkübasyon sonunda mikroorganizmaların üremesinin yavaşladığı ilk konsantrasyon minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değeri olarak değerlendirilmiştir.

Mikroorganizmaların konsantrasyonunun McFarland standartına göre ayarlanması

+4°C’de muhafaza edilen stok kültürler canlandırılmak üzere çıkarılmıştır. Bakteriler, içinde Muller Hinton Agar bulunan petrilere, stok kültürlerden alınarak tek koloni ekimi yapılmış ve 37°C’de 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra gelişen aktif bakteri kültüründen alınarak steril serum fizyolojik bulunan tüplere aktarılmış, yoğunluğu McFarland No: 0,5 (1×10^8 colony forming unit (cfu)/ml)) olacak şekilde ayarlanmıştır.

Mayalar, Malt Extract agar bulunan petrilere ekilmiş ve 30°C’de 48 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra gelişen aktif maya kültüründen alınarak steril serum fizyolojik bulunan tüplere aktarılmış, yoğunluğu McFarland No: 0,5 (1×10^7 cfu/ml) olacak şekilde ayarlanmıştır.

4.12. Yağ Asidi İçeriği Çalışma Şartları ve Tayin Yöntemi

4.12.1. Gaz kromatografi cihazı çalışma şartları

Cihazımız Agilent HP GC 6890, Kolonumuz HP-88 uzunluğu 100 m çap 0,25 mm, Film Kalınlığı 0,20 cm’dir.

Split oranı 1: 100’dür. Enjeksiyon sıcaklığı 250 °C’dir. Basınç 34,17 psi, Split akışı 207,1 ml /dk, toplam akış 215,9 ml / dk’dır. Fırın programı; ilk sıcaklık 120 °C olup 10. dakikada 175 °C’ye çıkar 15. dakikada 210 °C, 20 dk 230 °C yükselir. Analiz bitiminde kendini 120 °C’ye soğutur.

4.12.2. Yağ asidi içeriği tayin yöntemi

Çözücüsü tamamen uzaklaştırılmış numuneden 0,1g tartılarak 2 ml heksan içerisinde çözüldü. Sonra üzerine 2 M metanollü KOH çözeltisinden 0,2 ml ilave edilerek su banyosu üzerinde sabunlaşma oluncaya kadar 10 dakika ısıtma işlemi yapıldı. Sabunlaşma sonunda, yağ balonu içine % 14’ lük BF₃–metanol çözeltisinden belli miktarda eklendi ve 5 dakika daha ısıtıldı. Isıtma sonrasında balon sürekli ve yavaş bir şekilde çalkalandı, üzerine 2 ml n–heptan ilave edildi. Tüm bunlar bir dakika daha ısıtıldıktan sonra, üzerine 4 ml doymuş NaCl çözeltisinden eklendi. Karışım iyice karıştırıldıktan sonra ayırma hunisine alındı, 5 ile 10 dakika kadar fazların ayrılması beklendi. Alttaki sulu faz atılarak, üstteki açık sarı renkli faz vial tüplere konularak analizin yapılacağı zamana kadar derin dondurucuda saklandı.

5. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA

5.1. SCCO₂ Özütleme Yöntemi ile Yavşan Otu Çalışmaları

5.1.1. Yavşan otunun SCCO₂ özütleme yöntemi ile elde edilen özüt miktarı için en iyi sonucu elde etme çalışmaları

Bu bölümde, yavşan otundan özütlenen yağ miktarlarının basınç, sıcaklık, parçacık boyutu, karbon dioksit akış hızı parametrelerine göre nasıl sonuç verdiği incelenmiştir. Literatüre bakıldığında, süperkritik karbondioksit özütleme cihazı ile çalışmalarda maksimum verimin ilk 90 dakika içinde gözlemlendiği belirlenmiştir. Özütleme sonucunda çıkan yağ miktarlarının yüksek miktarlarda temin edilmesi için deney süresi 120 dakika olarak belirlenmiştir [16].

Yavşan otunun süperkritik özütlemesi sonrasında elde edilen özüt miktarının en yüksek düzeyde olması için farklı deneysel parametrelere göre en iyi sonuç elde etme çalışmaları yapılmıştır. Deneyler, literatüre uygun olarak 160 bar, 35 °C, 0,55 mm parçacık boyutu, 5 L/dak CO₂ akış hızı ile başlanmıştır. Deneylerin sonuçları çizelge 5.1’de verilmiştir.

Çizelge 5.1. Yavşan otu örnekleri için farklı parametrelere göre en iyi özüt elde etme çalışmaları

Örnek tüplerin kodları	Basınç, sıcaklık, parçacık boyutu, CO ₂ akış hızı parametreleri	Oluşan Özüt miktarı (mg/g)
Y1	160 bar, 35 °C, 5 L/dak CO ₂ , 0,55 mm	21,622
Y2	180 bar, 35 °C, 5 L/dak CO ₂ , 0,55 mm	22,576
Y3	200 bar, 35 °C, 5 L/dak CO ₂ , 0,55 mm	23,785
Y4	220 bar, 35 °C, 5 L/dak CO ₂ , 0,55 mm	24,649
Y5	240 bar, 35 °C, 5 L/dak CO ₂ , 0,55 mm	24,844
Y6	260 bar, 35 °C, 5 L/dak CO ₂ , 0,55 mm	25,094
Y7	35 °C, 260 bar, 5 L/dak CO ₂ , 0,55 mm	36
Y8	45 °C, 260 bar, 5 L/dak CO ₂ , 0,55 mm	42,4
Y 9	55 °C, 260 bar, 5 L/dak CO ₂ , 0,55 mm	44,8
Y10	65 °C, 260 bar, 5 L/dak CO ₂ , 0,55 mm	43,6
Y11	75 °C, 260 bar, 5 L/dak CO ₂ , 0,55 mm	38,16
Y 12	0,125 mm, 55 °C, 260 bar, 5 L/dak CO ₂	48,842
Y 13	0,3025 mm, 55 °C, 260 bar, 5 L/dak CO ₂	39,662
Y 14	0,4775 mm, 55 °C, 260 bar, 5 L/dak CO ₂	34,293
Y 15	0,655 mm, 55 °C, 260 bar, 5 L/dak CO ₂	48,96
Y 16	0,855 mm, 55 °C, 260 bar, 5 L/dak CO ₂	32,96
Y 17	3 L/dak CO ₂ , 0,655 mm, 55 °C, 260 bar	25,926
Y 18	4 L/dak CO ₂ , 0,655 mm, 55 °C, 260 bar	24,37
Y 19	5 L/dak CO ₂ , 0,655 mm, 55 °C, 260 bar	24,888
Y 20	6 L/dak CO ₂ , 0,655 mm, 55 °C, 260 bar	28,4
Y 21	7 L/dak CO ₂ , 0,655 mm, 55 °C, 260 bar	32,8

Çizelge 5.1'e bakıldığında Y kodlarıyla tanımlanan örneklerde, en yüksek verimle özütün elde edildiği deney parametreleri bulunmaya çalışılmıştır. Bu parametrelerin, 260 bar basınç, 55 °C sıcaklık, 0,655 mm parçacık büyüklüğü, 5L/dak CO₂ akış hızı olduğu görülmüştür. Bu parametrelerde çalışılan örneğin kodu ise Y15'tir.

Süperkritik karbondioksit özütlemesi sonunda elde edilen örnekler, HPLC cihazı ile analiz edilmiş. Örneklerin toplam QRKA miktarları hesaplanmıştır. Çizelge 5.2 bu sonuçları göstermektedir.

Çizelge 5.2. Yavşan otu örnekleri için farklı parametrelere göre en yüksek toplam QRKA elde etme çalışmaları

Örnek tüplerin kodları	Basınç, sıcaklık, parçacık boyutu, CO ₂ akış hızı parametreleri	Özüt toplam QRKA miktarı (µg/g)
Y1	160 bar, 35 °C, 5 L/dak CO ₂ , 0,55 mm	1,668
Y2	180 bar, 35 °C, 5 L/dak CO ₂ , 0,55 mm	1,041
Y3	2000 bar, 35 °C, 5 L/dak CO ₂ , 0,55 mm	1,062
Y4	220 bar, 35 °C, 5 L/dak CO ₂ , 0,55 mm	1,112
Y5	240 bar, 35 °C, 5 L/dak CO ₂ , 0,55 mm	1,622
Y6	260 bar, 35 °C, 5 L/dak CO ₂ , 0,55 mm	2,450
Y7	35 °C, 260 bar, 5 L/dak CO ₂ , 0,55 mm	2,340
Y8	45 °C, 260 bar, 5 L/dak CO ₂ , 0,55 mm	2,278
Y9	55 °C, 260 bar, 5 L/dak CO ₂ , 0,55 mm	2,329
Y 10	65 °C, 260 bar, 5 L/dak CO ₂ , 0,55 mm	2,261
Y11	75 °C, 260 bar, 5 L/dak CO ₂ , 0,55 mm	2,437
Y12	0,125 mm, 55 °C, 260 bar, 5 L/dak CO ₂	7,258
Y13	0,3025 mm, 55 °C, 260 bar, 5 L/dak CO ₂	8,163
Y14	0,4775 mm, 55 °C, 260 bar, 5 L/dak CO ₂	8,461
Y15	0,655 mm, 55 °C, 260 bar, 5 L/dakCO ₂	9,278
Y16	0,855 mm, 55 °C, 260 bar, 5 L/dak CO ₂	6,436
Y17	3 L/dak CO ₂ , 0,655 mm, 55 °C, 260 bar	1,286
Y18	4 L/dak CO ₂ , 0,655 mm, 55 °C, 260 bar	5,757
Y19	5 L/dak CO ₂ , 0,655 mm, 55 °C, 260 bar	8,400
Y20	6 L/dak CO ₂ , 0,655 mm, 55 °C, 260 bar	9,415
Y21	7 L/dak CO ₂ , 0,655 mm, 55 °C, 260 bar	9,473

Çizelge 5.2'ye bakıldığında, en yüksek toplam QRKA miktarının olduğu parametrelerin 260 bar basınç, 55 °C sıcaklık, 0,655 mm parçacık büyüklüğü, 7L/min CO₂ akış hızı olduğu görülmüştür. Bu parametrelerle çalışılan örnek kodu Y 21'dir.

Çizelge 5.1 ve 5.2'ye bakıldığında, özüt miktarının en yüksek oranda çıktığı örnekler ile QRKA miktarlarının en yüksek oranda çıktığı örnekler aynı değildir. Çizelgeler incelendiğinde, artış ve azalış oranlarının aynı yönlü olmadığı görülmüştür. Toplam QRKA miktarının yüksek olması istenildiğinde, özüt miktarının yüksek olması için gereken şartlarla tutarlı olmadığı görülmektedir. Toplam QRKA ve özüt miktarları için farklı en uygun şartlar gerekmektedir.

5.1.2. Yavşan otunun SCCO₂ özütleme yöntemi ile elde edilen toplam özüt miktarı ve QRKA veriminin farklı parametrelere göre incelenmesi

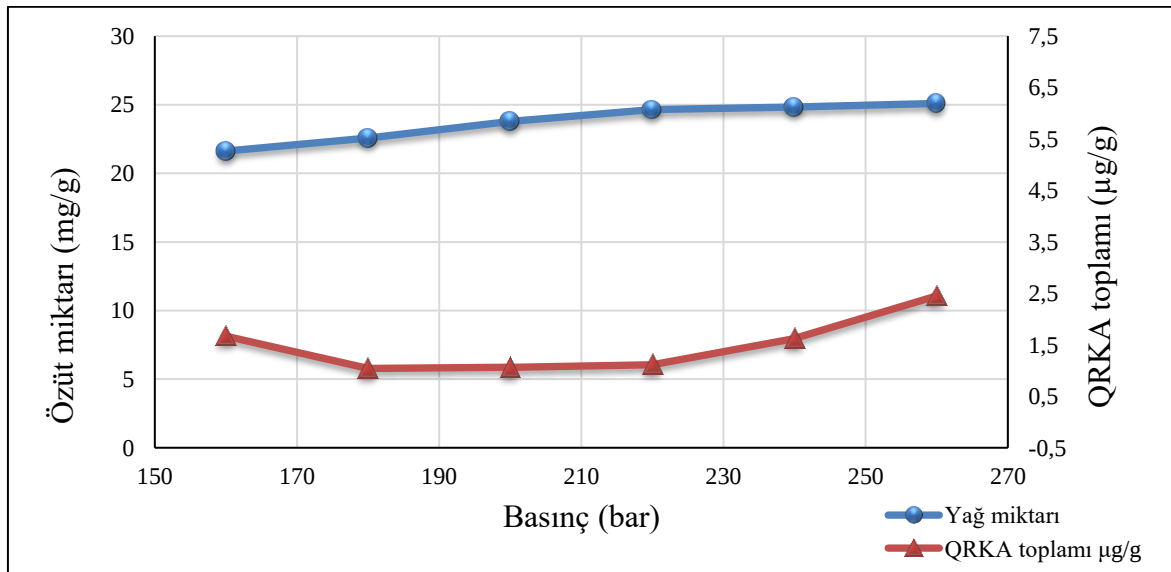
Yavşan otu ile yapılan çalışmalarda, çalışılan parametrelerin toplam özüt miktarı ve toplam QRKA'yı nasıl etkilediğine dair yapılan deneylerimizin ilki basınç değişikliği üzerine oldu.

Yavşan otunun basınç değişikliği ile özüt miktarı ve toplam QRKA verileri Çizelge 5.3'te verilmiştir.

Çizelge 5.3. Yavşan otundan elde edilen özüt miktarı ve toplam QRKA miktarına basınç etkisi verileri

Basınç (Bar)	Özüt miktarı (g)	Toplam QRKA ($\mu\text{g/g}$)
160	21,622	1,668
180	22,576	1,041
200	23,785	1,062
220	24,649	1,112
240	24,844	1,622
260	25,094	2,450

Yukarıda çizelge 5.3'te verilen deney sonuçları, sıcaklık 55 °C, 5L/dak CO₂ akış hızı, 0,55 mm parçacık boyutu, 120 dakika özütleme süresi parametreleri sabit tutularak basınç değişikliği verileri ile çalışılmıştır. Yavşan otundan elde edilen özüt miktarı ve toplam QRKA'ya basınç etkisi grafik olarak Şekil 5.1'de verilmiştir.



Şekil 5.1. Yavşan otundan elde edilen özüt miktarı ve toplam QRKA miktarına basınç etkisi

Basınç artışı ile elde edilen özüt miktarının arttığı görülmektedir. Yapılan literatür araştırmasında bu sonucun beklenen bir durum olduğu görülmektedir. Yapılan bir süperkritik CO₂ ile özütleme çalışmasında, bir tür Meksika bitkisi olan Chia tohumundan süperkritik CO₂ ile yağ eldesi araştırılmıştır. Çalışmanın sonucuna göre basınç artışı ile özütleme verimliliğinde artış olduğu gözlenmiştir [65].

Şekil 5.1’de verilen grafik incelendiğinde basıncın artmasıyla 220 bar’a kadar düzenli bir özüt miktarı artışı gerçekleşmiştir. Basıncın artmasıyla toplam QRKA miktarı ise 160 bar’dan 180 bar’a kadar azalma göstermiş. 180 bar’dan 220 bar’a kadar çok düşük miktarda artış göstermiştir. Toplam QRKA miktarında 220 bar’dan 260 bar’a kadar ise oldukça yüksek bir artış görülmüştür.

Basıncın artması ile özüt miktarının genellikle artması literatürde sürekli karşılaşılan ve gözlenen bir durumdur. Yüksek basınçlarda CO₂ yoğunluğunun artışı ile çözme etkisinin arttığı bilinmektedir. İçen tarafından 2008 yılında yapılan çalışmada kafeinin süperkritik karbon dioksit özütlemesinde basınç artışı ile kafein miktarındaki artışın giderek azaldığı ve belli bir basınçtan sonra ürün miktarına katkısının olmadığı görülmüştür [25].

Bulunan bu sonuca göre elde edilen QRKA miktarının en yüksek olduğu parametre olan 260 bar basınçla deneylere devam edilmiştir.

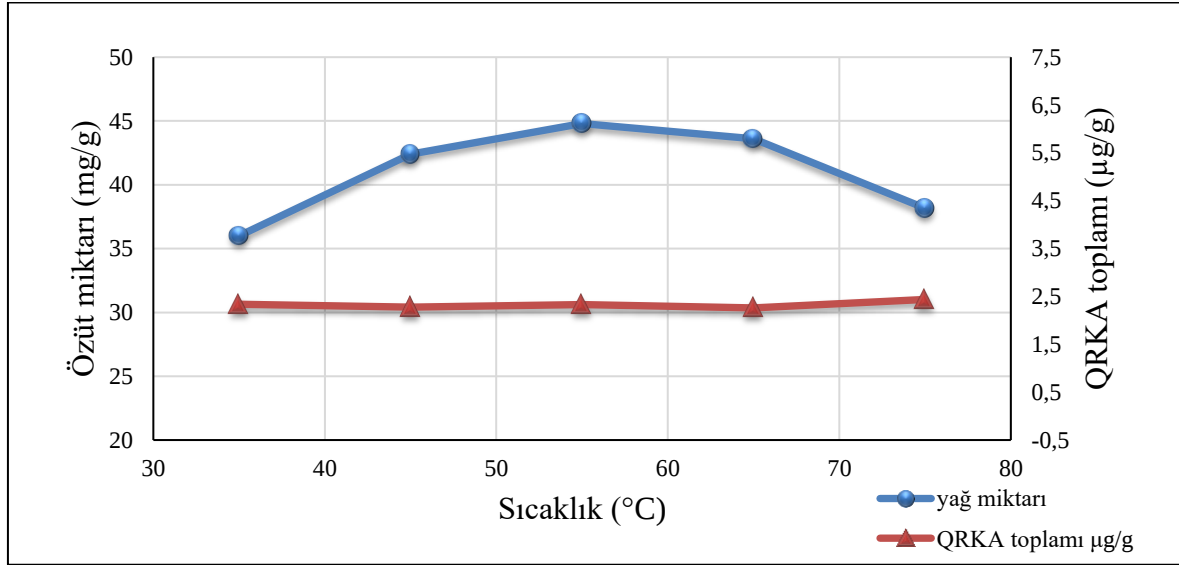
Yavşan otunun sıcaklık değişikliği ile özüt miktarı ve toplam QRKA verileri Çizelge 5.4’te verilmiştir.

Çizelge 5.4. Yavşan otundan elde edilen özüt miktarı ve toplam QRKA miktarına sıcaklık etkisi verileri

Sıcaklık (°C)	Özüt miktarı (mg/g)	Toplam QRKA (µg/g)
35	36	2,340
45	42,4	2,278
55	44,8	2,329
65	43,6	2,261
75	38,16	2,437

Yukarıda çizelge 5.4’te verilen deney sonuçları, basınç 260 bar, CO₂ akış hızı 5L/min, parçacık boyutu 0,55 mm, özütleme süresi 120 dakika parametreleri sabit tutularak sıcaklık

değişikliği ile çalışılmıştır. Yavşan otundan elde edilen özüt miktarı ve toplam QRKA'ya sıcaklık etkisi grafik olarak Şekil 5.2'de verilmiştir.



Şekil 5.2. Yavşan otundan elde edilen özüt miktarı ve toplam QRKA miktarına sıcaklık etkisi

Özüt miktarında sıcaklık ile önce artma sonra azalma gerçekleşmiştir. Özüt miktarının en yüksek olduğu parametreler, 55 °C sıcaklık, 260 bar basınç, 0,55 mm parçacık boyutu, 5 L/dak CO₂ akış hızı olarak bulunmuştur. Sıcaklık çalışmaları ile yapılan deneylerde, en yüksek çıkan yağın 55 °C olduğu görülmüştür. Çalışmalara bu sıcaklık sabit tutularak devam edilmiştir.

Şekil 5.2'de verilen grafik incelendiğinde sıcaklık 35 °C'den 55 °C'ye kadar arttıkça özüt miktarının arttığı görülmüştür, 55 °C'den sonra ise düşme görülmüştür. Yine grafik incelendiğinde sıcaklık artışı ile QRKA miktarının hemen hemen değişmediği görülmüştür. Literatür değerleri incelendiğinde sıcaklıkla ilgili çalışmalar ile bizim çalışmamız arasında genel olarak uygunluk görülmüştür.

Yapılan bir çalışmada süperkritik karbondioksit özütleme yöntemi ile deve dikeninden silibin özütlemesi deneylerinde, sıcaklık artışı ile silibin miktarında düşüş olduğu görülmüştür [66].

Sıcaklık artışı ile özütlenecek bileşiklerin buhar basınçları artarak, bu bileşiklerin akışkan faza daha kolay difüze olmalarını sağlamaktadır. Sıcaklık artmasıyla madde bileşenlerinin yapılarına ve buhar basınçlarına göre bileşenlerin verimini artırma veya buhar basıncı düşük olan büyük molekülü maddeler için verimi azaltma etkisi olmaktadır [16].

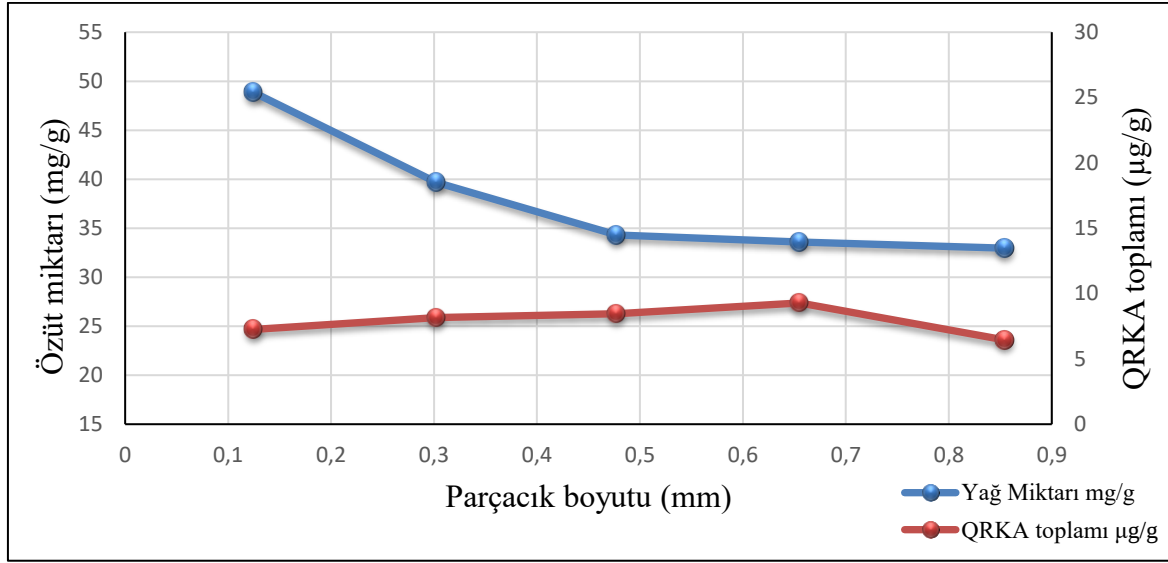
Bulunan bu sonuca göre elde edilen QRKA miktarının en yüksek olduğu parametre olan 55 °C sıcaklıkla deneylere devam edilmiştir.

Yavşan otunun parçacık boyutu değişikliği ile özüt miktarı ve toplam QRKA verileri çizelge 5.5'te verilmiştir.

Çizelge 5.5. Yavşan otundan elde edilen özüt miktarı ve toplam QRKA miktarına parçacık boyutu etkisi verileri

Parçacık boyutu (mm)	Özüt miktarı (g)	Toplam QRKA (µg/g)
0,125	48,842	7,258
0,3025	39,662	8,163
0,4775	34,293	8,461
0,655	33,6	9,278
0,855	32,96	6,436

Yukarıda çizelge 5.5'te verilen deney sonuçları, basınç 260 bar, sıcaklık 55 °C, CO₂ akış hızı 5L/dak, özütleme süresi 120 dakika parametreleri sabit tutularak sıcaklık değişikliği ile çalışılmıştır. Yavşan otundan elde edilen özüt miktarı ve toplam QRKA'ya parçacık boyutu etkisi grafik olarak Şekil 5.3'te verilmiştir.



Şekil 5.3. Yavşan otundan elde edilen özüt miktarı ve toplam QRKA miktarına parçacık boyutu etkisi

Şekil 5.3'te verilen grafik incelendiğinde partikül büyüklüğü arttıkça, elde edilen özüt miktarının azaldığı görülmüştür. Yine grafik incelendiğinde 0,655 mm'e kadar toplam QRKA miktarı artmış sonrasında ise azalmıştır.

Literatüre bakıldığında, partikül boyutu azaldıkça özüt veriminin arttığı görülmüştür.

Reverchon ve arkadaşlarının yaptığı deneysel çalışmada yer fıstığından süperkritik karbondioksit ile yağ eldesi konulu çalışmada tanecik boyutu küçüldükçe yüzey alanının genişlediği ve dolayısıyla özütleme veriminde artış olduğu bulmuşlardır. Parçacık boyutu küçük olunca, örneğin yüzey alanının arttığı ve bundan dolayı da dış kütle aktarım dirençleri azaldığı için taneciklerin çözücüye daha kolay ulaşması sağlanmaktadır. Difüzyonun da arttığı göz önüne alınırsa verimdeki artış daha kolay açıklanabilir [67].

Machmudah ve arkadaşlarının yaptığı deneysel çalışmalarda tanecik boyutu küçük oldukça yüzey alanının fazla olduğu, esansiyel yağların çözücüye daha yüksek oranda geçtiğini ve kütle transfer dirençleri azaldığı için de özütleme veriminde artış olduğu görülmüştür [68].

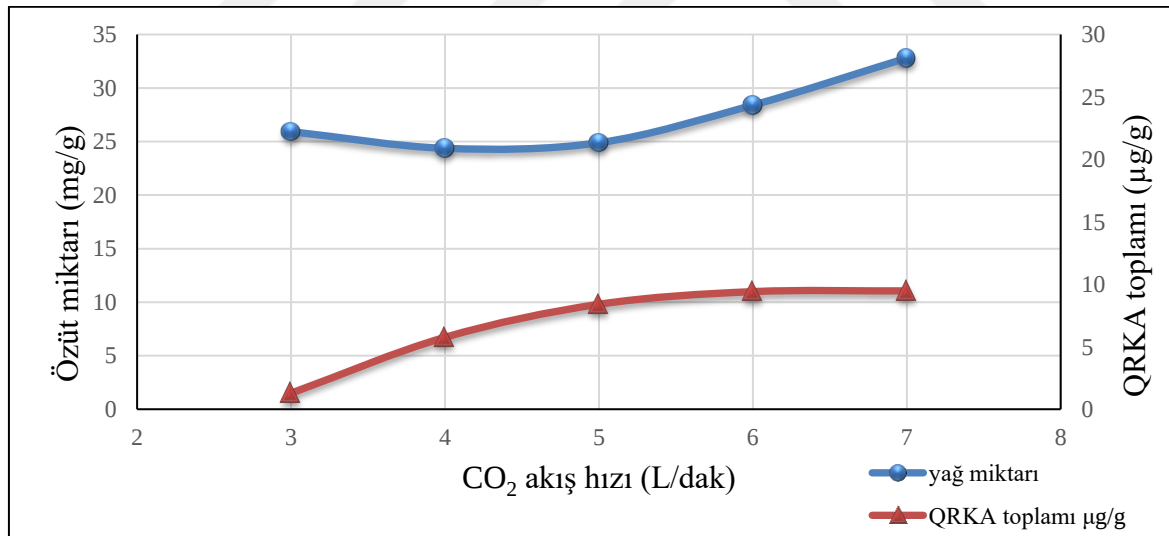
Bulunan bu sonuca göre elde edilen QRKA miktarının en yüksek olduğu parametre olan 0,655 mm parçacık boyutu ile deneylere devam edilmiştir.

CO₂ akış hızının elde edilen özüt miktarı ve toplam QRKA miktarına etkisi çalışmaları çizelge 5.6’da verilmiştir.

Çizelge 5.6. Yavşan otundan elde edilen özüt miktarı ve toplam QRKA miktarına CO₂ akış hızı etkisi

Karbon dioksit akış hızı (L/dak)	Özüt miktarı (mg/g)	Toplam QRKA (µg/g)
3	25,926	1,286
4	24,37	5,757
5	24,888	8,400
6	28,4	9,415
7	32,8	9,473

Yukarıda çizelge 5.6’da verilen deney sonuçları, basınç 260 bar, sıcaklık 55 °C, parçacık boyutu 0,655 mm, özütleme süresi 120 dakika parametreleri sabit tutularak CO₂ akış hızı değişikliği ile çalışılmıştır. Yavşan otundan elde edilen özüt miktarı ve toplam QRKA’ya CO₂ akış hızı etkisi grafik olarak Şekil 5.4’te verilmiştir.



Şekil 5.4. Yavşan otundan elde edilen özüt miktarı ve toplam QRKA miktarına CO₂ akış hızı etkisi

Şekil 5.4’te verilen grafik incelendiğinde özüt miktarı, CO₂ akış hızı 3L/dak’dan 4L/dak’a çıktığında azalmakta, fakat sonrasında akış hızı arttıkça özüt miktarı da artmaktadır.

Toplam QRKA miktarına bakıldığında, 5L/dak’a kadar yüksek oranda artış olmakta sonrasında yine artış olmakta ve sabit hale gemektedir.

Akış hızı etkisi ile süreç iki şekilde etkilenmektedir. CO₂ akış hızının artması özütleme haznesi içindeki girdapların artmasına, katı ile akışkan madde arasında film kalınlığında azalmaya sebep olmaktadır. Bunun sonucunda da verimlilik artmaktadır. CO₂ akış hızı arttıkça katı ve akışkan madde arasındaki etkileşme süresini kısaltmakta ve verimliliği azaltmaktadır. Çözücü olan CO₂ akış hızının sürece etkisi katı maddenin yapısı ile yakından ilgilidir [52].

Jojoba tohumu yağı süperkritik karbon dioksit ile özütleme deneysel çalışmasında, CO₂ akış hızında artış olması ile başlangıç özütleme hızının arttığı ve fakat özütleme verimliliğinde kayda değer bir değişimin olmadığı belirtilmiştir. [69] Reverchon ve arkadaşları Süperkritik karbon dioksit özütlenmesi ile kuş burnu tohumu yağının özütlenmesini araştırmış ve deneysel çalışmalarda çözücü akış hızının artışı ile özütleme hızının değiştiğini belirtmiştir. [70] CO₂ akış hızının verimliliğe etkisi konusunda bulunan sonucun, literatürdeki benzer sonuçlarla desteklendiği görülmüştür.

Bulunan bu sonuca göre elde edilen QRKA miktarının en yüksek olduğu parametre olan 7 L/dak CO₂ akış hızı belirlenmiştir. Böylelikle çalışmanın optimum parametrelerinin 260 bar basınç, 55 °C sıcaklık, 0,655 mm parçacık boyutu, 7 L/dak olduğu görülmüştür.

SCCO₂ çalışmalarından sonra yavşan otu örnekleri 0.4775 ve 0,655 eşit oranda toplam 2,5098 g numune olarak alındı ve soxhlet cihazına 170 ml etanol konularak 7 saat soxhlet cihazından geçirildi. 145 ml toplam geriye etanollü örnek kaldı. Bu kalan örnekten 12 ml numune HPLC için deney tüpüne aktarıldı. HPLC ile örnek incelendiğinde, 226,41 µg/g QRKA miktarı çıkmıştır. SCCO₂ yöntemine göre çok yüksek miktarda elde edilmiştir. Ama toksik olmayan ucuz bir çözücü kullanılması, kolay yapılabilmesi, kısa sürede elde edilebilmesi gibi yöntemlerden dolayı SCCO₂ yönteminin bir çok üstün özelliği olduğu görülmüştür.

5.2. Antioksidan Aktivite Tayini Yöntemleri Sonuçları

5.2.1. DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) radikal süpürme etkisi deney sonuçları

Yavşan otundan elde edilen özütlerin, antioksidan aktivitesinin belirlenmesi için önce DPPH serbest radikal çözeltisinin birbirinden farklı derişimleri hazırlandı (10-0,625 mg/ml) ve absorbansı spektrofotometre cihazında ölçüldü A_0 olarak belirlendi. Yavşan otu, BHT ve BHA'nın absorbansı 517 nanometre'de ölçüldü ve her ölçüm için üç deneyin ortalaması çizelge 5.7'de tablo olarak verildi.

Çizelge 5.7. Örnek, BHA, BHT ve DPPH radikallerinin absorbans değerleri

Örnek	A_0 (DPPH)	Derişim mg/ml	(10 Derişim (5 mg/ml)	Derişim (2,5 mg/ml)
Y1	0,549	0,532	0,515	0,535
Y2	0,549	0,523	0,530	0,535
Y3	0,549	0,530	0,522	0,522
Y4	0,549	0,535	0,531	0,529
Y5	0,549	0,538	0,526	0,524
Y6	0,690	0,575	0,571	0,576
Y7	0,690	0,600	0,579	0,582
Y8	0,690	0,591	0,587	0,586
Y9	0,690	0,577	0,589	0,581
Y10	0,690	0,563	0,558	0,588
Y11	0,690	0,594	0,587	0,595
Y12	0,647	0,621	0,625	0,629
Y13	0,647	0,638	0,633	0,635
Y14	0,690	0,605	0,596	0,594
Y15	0,647	0,621	0,627	0,632
Y16	0,690	0,602	0,595	0,591
Y17	0,647	0,618	0,620	0,618
Y18	0,647	0,618	0,608	0,611
Y19	0,647	0,622	0,599	0,613
Y20	0,553	0,514	0,513	0,512
Y21	0,553	0,495	0,517	0,517
Ysoxhleth	0,553	0,470	0,489	0,505
BHA	0,349	0,051	0,072	0,159
BHT	0,349	0,151	0,209	0,278

Yavşan otu, BHA ve BHT için ortamdaki DPPH serbest radikallerinin inhibe edilen yüzde (%) miktarı hesabı aşağıdaki formülden yararlanılarak yapılmıştır.

$$\% \text{ Inhibisyon} = (A_o - A_{\text{numune}}) / A_o \times 100$$

$$\% \text{ Inhibisyon} = (A_o - A_{\text{BHA}}) / A_o \times 100$$

$$\% \text{ Inhibisyon} = (A_o - A_{\text{BHT}}) / A_o \times 100$$

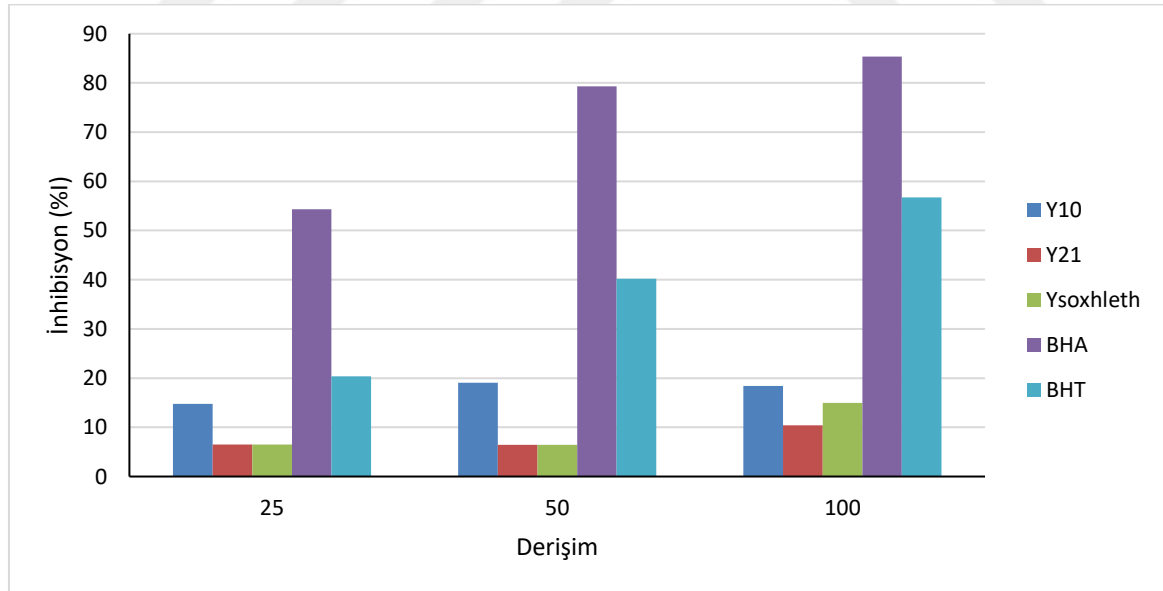
Örnek, BHA, BHT için ortamdaki DPPH serbest radikallerinin inhibe edilen yüzde miktarları çizelge 5.8’de tablo olarak verildi.

Çizelge 5.8. Örnek, BHA, BHT için ortamdaki DPPH serbest radikallerinin inhibe edilen yüzde miktarları

Örnek	%I Derişim mg/ml)	(10 %I Derişim (5 mg/ml)	%I Derişim (2,5 mg/ml)
Y1	3,155	6,250	2,670
Y2	4,794	3,519	2,609
Y3	3,580	5,036	5,036
Y4	2,670	3,297	3,641
Y5	2,063	4,247	4,551
Y6	16,626	17,158	16,481
Y7	13,001	16,046	15,563
Y8	14,306	14,934	15,031
Y9	16,336	14,596	15,756
Y10	18,415	19,043	14,741
Y11	13,968	14,935	13,726
Y12	4,018	3,452	2,782
Y13	1,391	2,164	1,855
Y14	12,276	13,581	13,871
Y15	4,018	3,091	2,318
Y16	12,711	13,775	14,355
Y17	4,482	4,173	4,482
Y18	4,482	6,028	5,616
Y19	3,915	7,367	5,255
Y20	6,996	7,238	7,358
Y21	10,434	6,453	6,514
Ysoxhleth	14,958	11,459	8,685
BHA	85,387	79,284	54,355
BHT	56,733	40,229	20,344

Yüzde (%) inhibisyon değeri ne kadar yüksekse oranda ise antioksidan etki değerinin de o kadar yüksek olacağı kabul edilmektedir. Yukarıdaki çizelgeye bakıldığında DPPH serbest radikali giderme aktivitesi değeri normal özellik göstermiştir.

Yukarıda verilen sonuçlar anlamlıdır. Yapılan deneyde numunenin derişimi 10 mg/ml, BHA ve BHT derişimi ise 1 mg/ml alındı. Aşağıdaki şekilde derişime göre %I grafiğı gösterilmiştir. Örnekler içinden süpürücü aktivitesi en yüksek olan Y10, SCCO₂ yöntemine göre optimum QRKA elde edilen değeri olan Y21 ve soxhleth özütlemesi ile elde edilen Ysoxhleth, grafiğı konulmuştur. Standart olarak da BHA ve BHT grafiğı konularak kıyaslama yapılmıştır. Örnekler antioksidan özellik göstermesine rağmen, sentetik antioksidan olan BHA ve BHT'ya göre daha zayıf olduğu görülmüştür. Y10 özütler içerisinde süpürücü özelliğı en yüksek olan örnektir. BHA ve BHT standartlarına göre daha düşük özellik gösterse de antioksidan özelliğı yine iyi olarak görüldü. Y21 nisbeten daha düşük değerde süpürücü özellik gösterse de yine antioksidan aktivite olarak süpücü özellik göstermiştir. Ysoxhleth, soxhleth özütlemesi ile elde edilen özüttür. Y21'e göre nispeten daha yüksek özellikte süpürücü özellik göstermiştir.



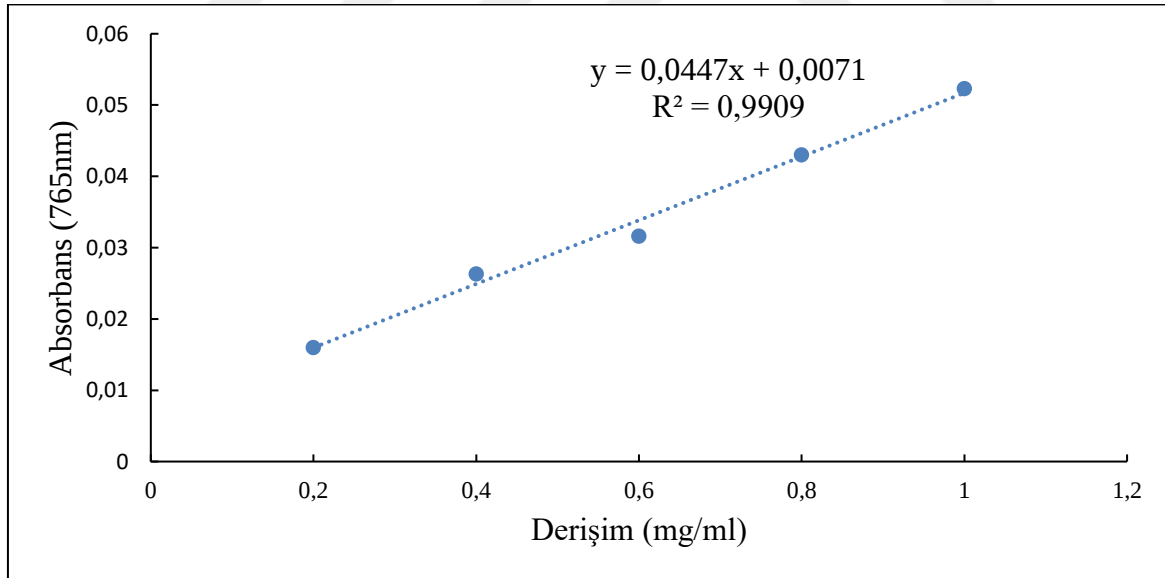
Şekil 5.5. Y10, Y21, Ysoxhleth, BHA ve BHT'nin DPPH serbest radikal üzerindeki süpürücü aktiviteleri

5.2.2. Toplam fenolik madde tayini (Folin-Ciocalteu) yöntemi deney sonuçları

Bitkideki toplam fenolik madde miktarı 100 g yavşan otundaki mg cinsinden gallik asit (GA) eşdeğeri olarak hesaplandı (mg GAE/100 g yavşan otu). Bu amaçla gallik asit derişimlerine (1, 0,5, 0,25 mg/ml) karşı absorbanslar ölçülerek çizelge 5.9 verildi ve gallik asidin standart çalışma grafiğı Şekil 5.6 oluşturuldu.

Çizelge 5.9. Standart gallik asidin derişim absorbans verileri

Gallik asit (mg/ml)	
Derişim	Absorbans (765 nm)
0,2	0,016
0,4	0,0263
0,6	0,0316
0,8	0,043
1	0,0523



Şekil 5.6. Standart gallik asit derişim absorbans grafiğı

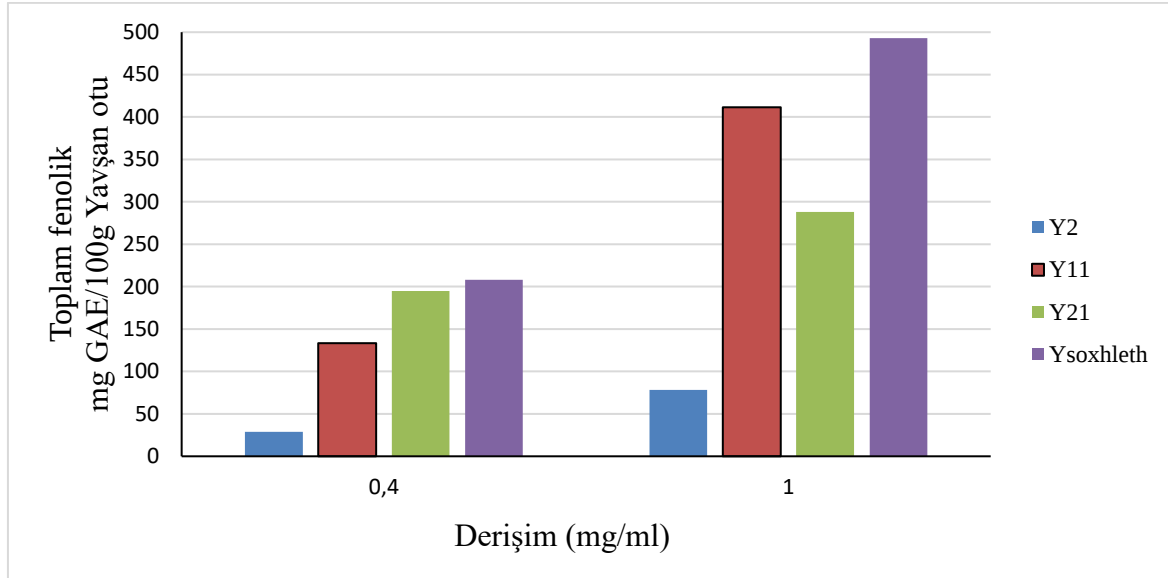
Yavşan otundan elde edilen özütlerin, antioksidan aktivitesinin belirlenmesi için Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılarak elde edilen toplam fenolik madde miktarı değerleri yavşan otu numuneleri için standart gallik aside eşdeğerleri Çizelge 5.10'da verildi.

Çizelge 5.10. Yavşan otundan elde edilen özütler ve soxhleth cihazından geçirilen özütün gallik asit cinsinden fenolik madde miktarı değerleri

Örnekler	GAE, gallik asit eşdeğeri	
	0,4 mg/ml	1,0 mg/ml
Y1	26,778	103,859
Y2	29,016	78,132
Y3	33,490	87,080
Y4	30,134	83,725
Y5	61,901	93,792
Y6	33,490	102,181
Y7	35503,360	190,940
Y8	36,555	130,537
Y9	36,107	127,181
Y10	48,190	93,624
Y11	133,199	411,297
Y12	90,246	202,125
Y13	68,322	224,497
Y14	113,512	243,512
Y15	116,644	305,034
Y16	39,687	160,738
Y17	81,745	143,960
Y18	140,805	178,635
Y19	110,380	207,718
Y20	124,251	234,564
Y21	194,944	288,255
Ysoxhleth	207,919	492,953

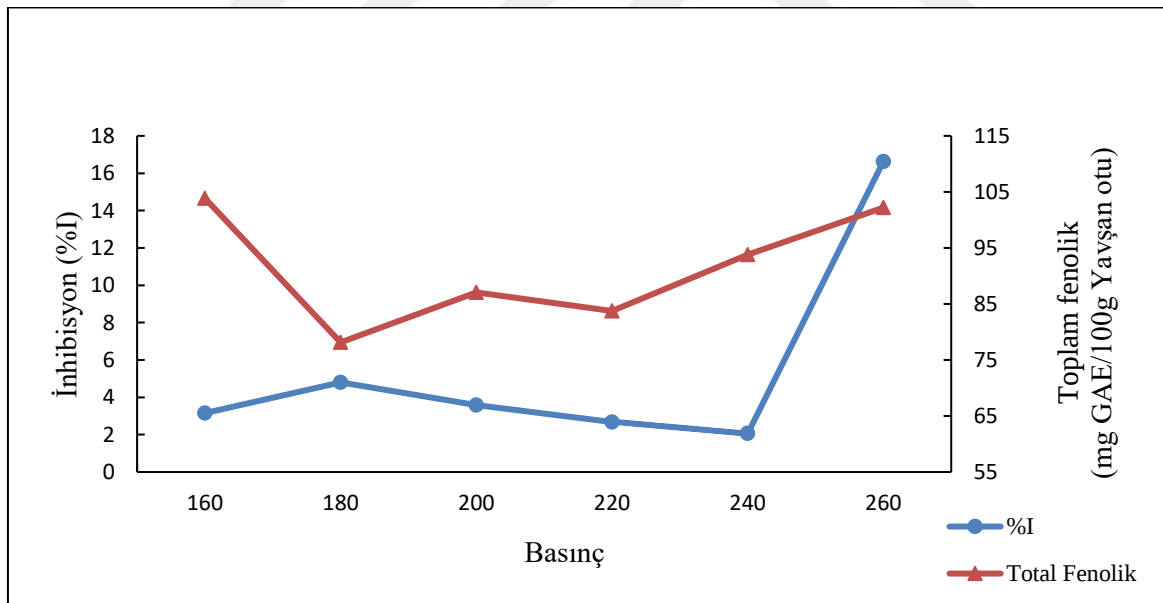
Çizelge 5.10'a bakıldığında Y2 hem 0,4 mg/ml, hem de 1,0 mg/ml derişim için gallik asiti eşdeğeri olarak minimum sonuç veren özütü, Y11 1,0 mg/ml için gallik asit eşdeğeri olarak optimum sonuç veren özütü, Y21 iki derişim için de SCCO₂ özütlemesi yöntemi ile optimum QRKA elde edilen özütleri ve aynı zamanda 0,4 mg/ml derişim için optimum fenolik madde elde edilen özütü, Ysoxhleth her iki derişim için de etanolle soxhleth cihazından geçirilen örnekten elde edilen özütü göstermektedir. Sonuçlar, 0,4 mg/ml ve 1 mg/ml derişim için verilmiştir. Toplam fenolik madde tayini deneyleri olarak incelediğimizde yavşan otunun fenolik madde içeriği 1,0 mg/ml için 78,13- 492,95 mg GAE/100g Yavşan otu aralığında değişmektedir. 0,4 mg/ml için ise 29,01-207,92 mg GAE/100g Yavşan otu aralığında değişmektedir.

Derişime göre toplam fenolik madde içeriği şekil 5.7'de verilmiştir.

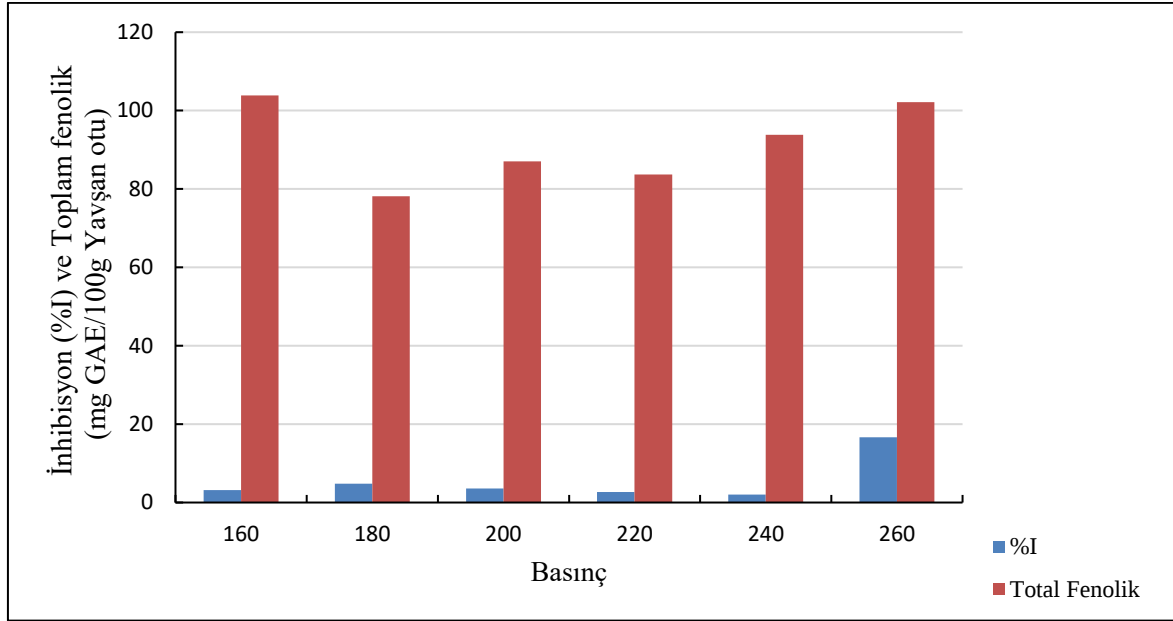


Şekil 5.7. Toplam fenolik madde içeriği derişim grafiğı

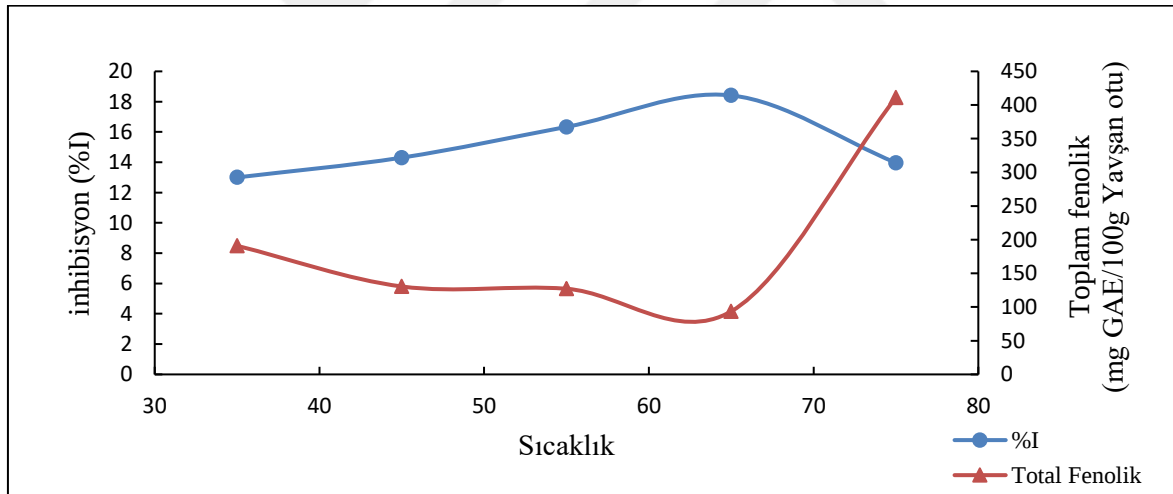
Aşağıdaki şekiller DPPH ve Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılarak elde edilen sonuçların beraberce grafiğıe dökülmüş halidir.



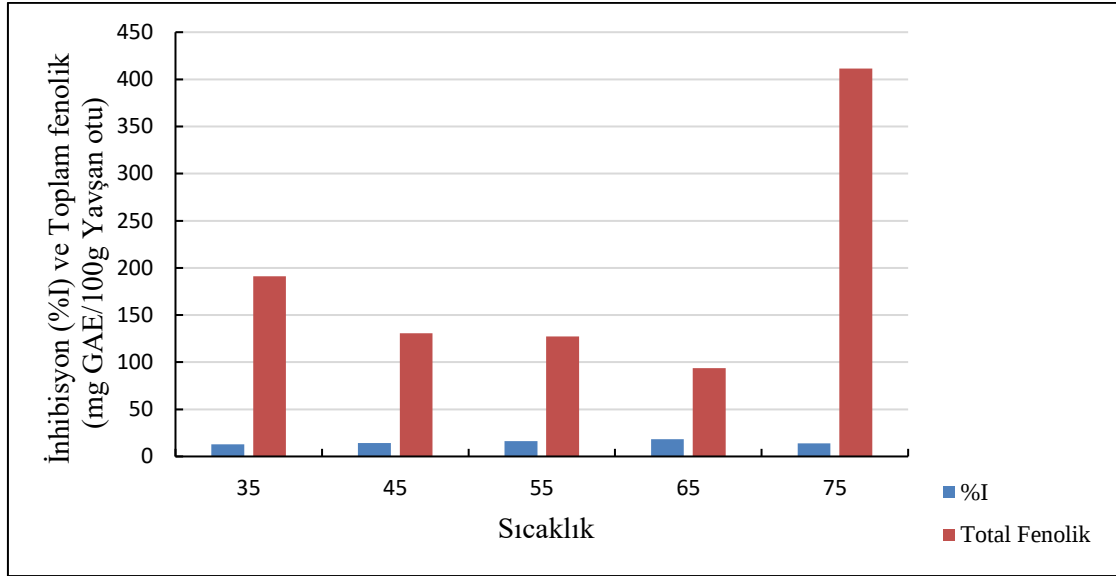
Şekil 5.8. SCCO₂ yönteminde basınç değışikliğı ile elde edilen özütlerin DPPH ve toplam fenolik değışimi çizgi grafiğı



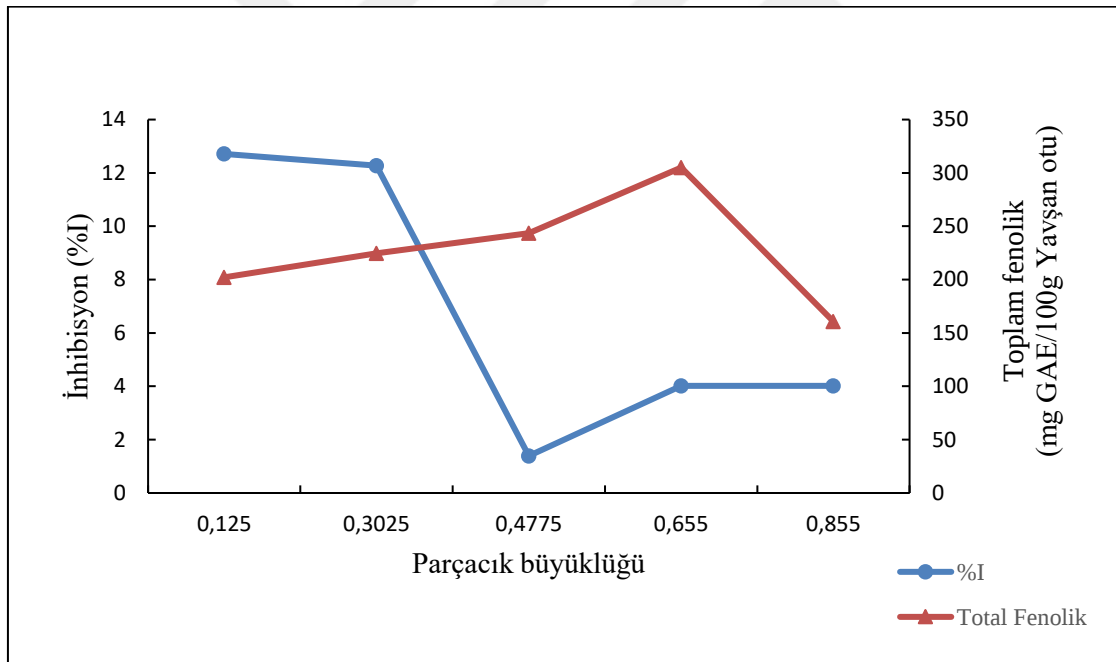
Şekil 5.9. SCCO₂ yönteminde basınç değişikliği ile elde edilen özütlerin DPPH ve toplam fenolik değişimi sütun grafiği



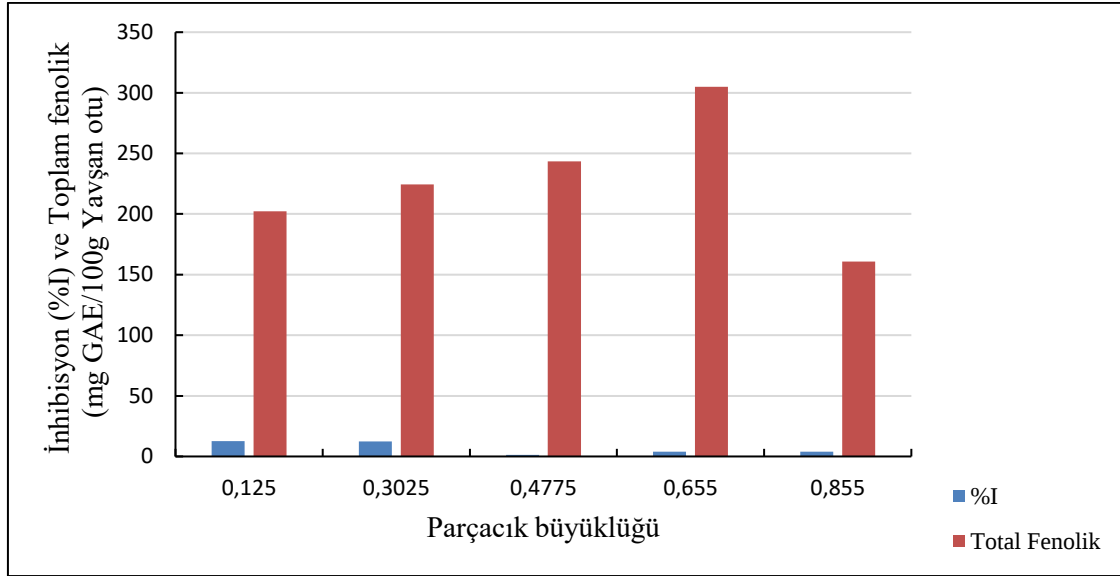
Şekil 5.10. SCCO₂ yönteminde sıcaklık değişikliği ile elde edilen özütlerin DPPH ve toplam fenolik değişimi çizgi grafiği



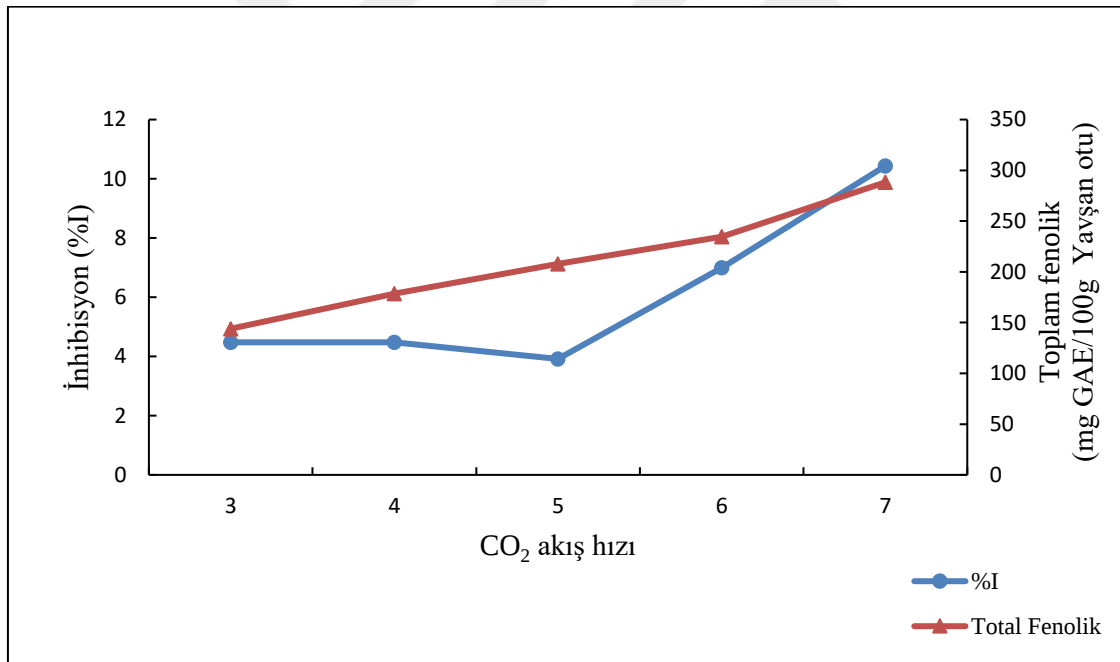
Şekil 5.11. SCCO₂ yönteminde sıcaklık değişikliği ile elde edilen özütlerin DPPH ve toplam fenolik değişimi sütun grafiği



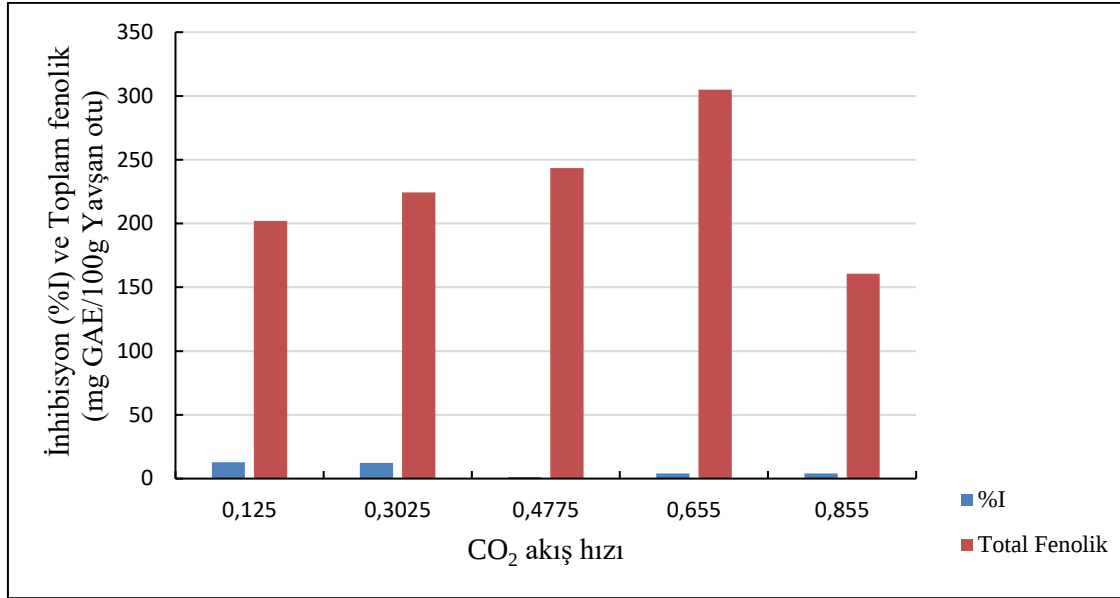
Şekil 5.12. SCCO₂ yönteminde parçacık büyüklüğü değişikliği ile elde edilen özütlerin DPPH ve toplam fenolik değişimi çizgi grafiği



Şekil 5.13. SCCO₂ yönteminde parçacık büyüklüğü değişikliği ile elde edilen özütlerin DPPH ve toplam fenolik değişimi sütun grafiği



Şekil 5.14. SCCO₂ yönteminde CO₂ akış hızı değişikliği ile elde edilen özütlerin DPPH ve toplam fenolik değişimi çizgi grafiği



Şekil 5.15. SCCO₂ yönteminde CO₂ akış hızı değişikliği ile elde edilen özütlerin DPPH ve toplam fenolik değişimi sütun grafiği

Benabderrahim ve arkadaşları tarafından Tunus'un çöl bitkilerinden (*Pituranthos tortuosus*; *Retama raetam*; *Ephedra alata*; *Ziziphus lotus*; *Capparis spinoza*; *Calligonum comosum* çöl çalıları) elde edilen biyoaktif kimyasallar ile ilgili çalışmada 23 bileşik tanımlanmış ve 10 tanesi daha yoğun miktarda bulunmuştur. Kimyasal içerik, antioksidan faaliyetlerin karşılaştırması ile birlikte hava parçalarının etanol özütlerinde hesaplanıp sonuçların önemli ölçüde çalışılan bitkiye bağlı olduğu görülmüştür. Fenolik içerikler 15,52 ila 37,5 mg gallik asit eşdeğeri (GAE) / g Kuru Ağırlık bitki ve flavonoidler 2,92 ila 9,14 mg rutin eşdeğeri / g Kuru ağırlık arasında değişmiş ve beş fenolik asit (kinik asit, gallik asit, şırıngaik asit, p-kumarik asit ve trans-Ferulik asit) ve beş flavonoidler (kateşin, epikateşin, rutin, quercetin ve naringenin) bitkiler arasında yoğun miktarda ve yaygın olduğu görülmüştür. Isı haritası içerisinde görselleştirilen tüm verilere dayanarak da bitkileri iki gruba ayırmışlar ve *Z. lotus* ve *E. Alata* bitkisini en yüksek antioksidan potansiyeli için seçmişlerdir [71].

Yine bitki özütleri üzerine yapılan bir çalışmada, antioksidan aktivite tayinleri yapılmış ve DPPH ve Folin-Ciocalteu yöntemleri kullanılmıştır. Bulunan sonuçlar BHA ve BHT standartları ile kıyaslandığında sonuçların iyi olduğu görülmüştür [72].

5.3. Antimikrobiyal Aktivite Tayini Sonuçları

Yavşan otundan elde edilen özütlerin antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi için beş adet bakteri ve iki adet fungus için bulunan minimum inhibisyon konsantrasyonu (MIC) ve minimum bakterisidal konsantrasyonu (MBC), minimum fungusidal (MFC) sonuçları çizelge 5.8 ve 5.9’da verilmiştir. Pozitif kontrol olarak bilinen standart ampisilin, kloramfenikol için bulunan MIC ve MBC değerleri ve ketokonazol için bulunan MFC değerleri yine çizelge 5.8 ve 5.9’da verilmiştir. Çizelgedeki değerler incelendiğinde, yavşan otundan elde edilen özütlerin farklı basınç, sıcaklık, parçacık boyutu ve CO₂ akış hızının optimum değerlerine karşılık beş bakteri üzerindeki MIC değerlerinin oldukça düşük değerler olduğu görülmektedir. Bu sonuçların, pozitif kontrol için kullanılan ampisilin ve kloramfenikol ile kıyaslandığında daha iyi olduğu görülmektedir.

Yine yavşan otu özütlerinin çalışılan beş bakteri üzerine gösterdiği MBC değerlerinin pozitif kontrol olarak kullanılan Ampisilin ve Kloramfenikole karşı kıyaslandığında bazı bakteriler için benzer etki gösterirken bazılarında ise daha iyi MBC değerlerine sahip olduğu görülmektedir.

Yavşan otu özütlerinin çalışılan iki fungus üzerine gösterdiği MIC değerleri incelendiğinde bulunan değerlerin pozitif kontrol olarak kullanılan ketokonazole göre daha düşük etkili olduğu görülmektedir.

Yine bu özütlerin iki fungus üzerine gösterdiği MFC değerleri incelendiğinde bulunan değerlerin pozitif kontrol olarak kullanılan ketokonazole göre *C. albicans* ATCC 10231 fungusu için hemen hemen aynı etkiye sahip olduğu görülürken *C. krusei* ATCC 6258 fungusu için daha düşük etkiye sahip olduğu söylenebilir.

Sonuç olarak yavşan otu özütlerinin, çalışılan beş bakteri için MIC değerlerinin pozitif kontrol olarak kullanılan ampisilin, kloramfenikolden daha etkili olduğu söylenebilir. MBC değerlerinin ise ampisilin ve kloramfenikol ile hemen hemen benzer etkiye sahip olduğu söylenebilir.

Yine yavşan otu özütlerinin, çalışılan iki fungus üzerine olan MFC değerleri incelendiğinde biraz daha düşük etkiye sahip olduğu ama etkili olduğu söylenebilir.

Özütleme yöntemleri olan süperkritik karbondioksit özütlemesi ve soxhleth özütlemesi karşılaştırıldığında her iki özütleme yöntemi sonrasında elde edilen özütlerin benzer antimikrobiyal ve antifungal etkiye sahip olduğu söylenebilir.

Bulunan bu değerler dikkate alındığında yavşan otunun çalışılan bakteriler üzerine oldukça yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu söylenebilir. Dolayısıyla bu bitki özütünün, diğer tamamlayıcı çalışmalar yapıldığı takdirde mikroorganizmaların sebep olduğu hastalıkların tedavisinde kullanılabileceği söylenebilir.

Abdi ve arkadaşları tarafından bir bitki olan *Persicaria pensylvanica*'nın çiçeğinden, yapraklarından, köklerinden ve köklerinden elde edilen özütlerin antimikrobiyal aktivitesinin değerlendirildiği çalışmada, özütlerin antimikrobiyal etkisi ticari olarak kullanılan tetrasiklin antibiyotiği ile karşılaştırılıp, minimum inhibitör konsantrasyon (MIC) ve minimum bakteriyosidal konsantrasyon (MBC) yöntemleri kullanılarak test edilmiştir. *P. pensylvanica*'dan elde edilen özütün sığır meme bezlerinin patojenik *S. aureus* suşu Newbould 305'i öldürdüğünü görmüşlerdir. Ve çiçek, yaprak, kök ve kökten elde edilen özütler için minimum inhibitör konsantrasyon (MIC) sınır değerleri 62.5 µg / ml, 31.25 /g / ml sırasıyla 7,8 µg / ml ve <46,9 /g / ml olarak tesbit etmişlerdir. Kan agarı üzerinde yetiştirilen *S. aureus*'taki bitki özlerinin minimum bakteri öldürücü konsantrasyonu (MBC), tetrasiklin için ise 2 µg / ml, yaprak ve kök için 31.25 µg / ml, çiçek için 125 µg / ml ve kök ekstraktları için 187.5 µg / ml olduğunu söylemişlerdir [73].

Yine bitki özütü üzerine yapılan bir çalışmada, bitki özütünün antimikrobiyal özellikleri 4 bakteri türüne karşı disk difüzyon ve mikrodilüsyon broth yöntemleri kullanılarak tespit edilmiş ve iyi bir antimikrobiyal etki özelliğine sahip olduğu görülmüştür. Bizim bulduğumuz antimikrobiyal etkinin bu çalışmalarla kıyaslandığında çok iyi olduğu görülmektedir [72].

Yavşan otu özütlerinin MIC değerleri çizelge 5.11'de verilmiştir.

Çizelge 5.11. Yavşan otu özütlerinin minimum inhibisyon konsantrasyonu (MIC) değerleri (µg/ml)

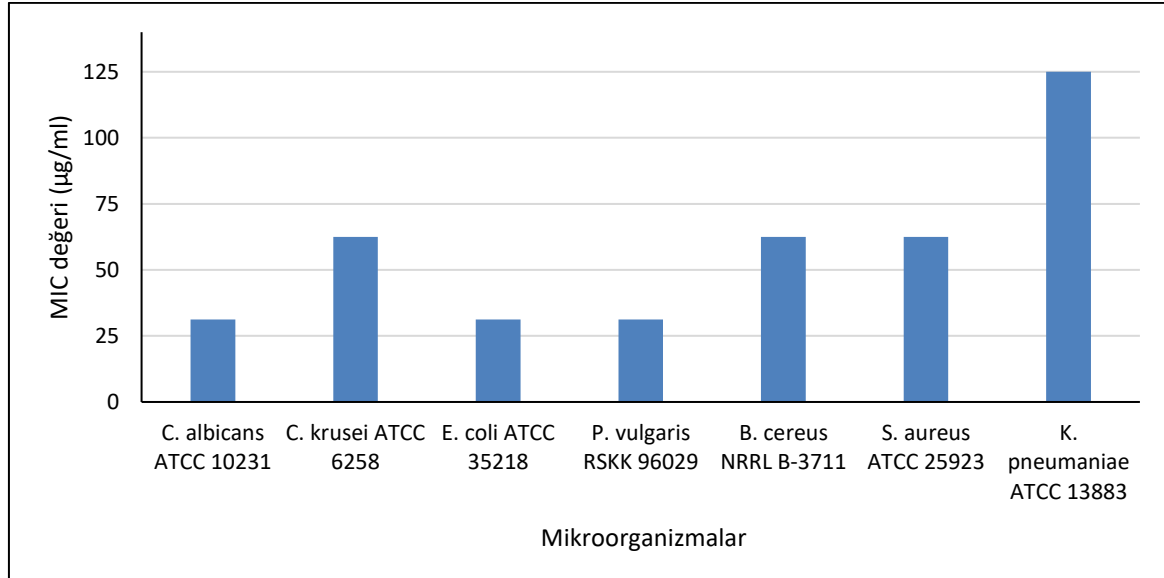
	Yavşan otu özütleri					Pozitif kontrol		
Test mikroorganizmaları	Y6	Y11	Y14	Y21	Ysoxhleth	Amp	Clf	Keto
<i>E. coli</i> ATCC 35218	250	125	125	125	125	>125	>125	-
<i>B. cereus</i> NRRL B-3711	62,5	125	125	125	125	>125	125	-
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	500	250	250	250	250	62,5	>125	-
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	125	125	125	125	125	125	15,63	-
<i>P. vulgaris</i> RSKK 96029	62,5	62,5	62,5	62,5	125	>125	>125	-
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	500	250	250	250	250	NS	NS	62,5
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	62,5	250	250	250	250	NS	NS	15,63

Yavşan otu özütlerinin MBC ve MFC değerleri çizelge 5.12’de verilmiştir.

Çizelge 5.12. Yavşan otu özütlerinin minimum bakteri konsantrasyonu (MBC) ve minimum fungus konsantrasyonu (MFC) değerleri (µg/ml)

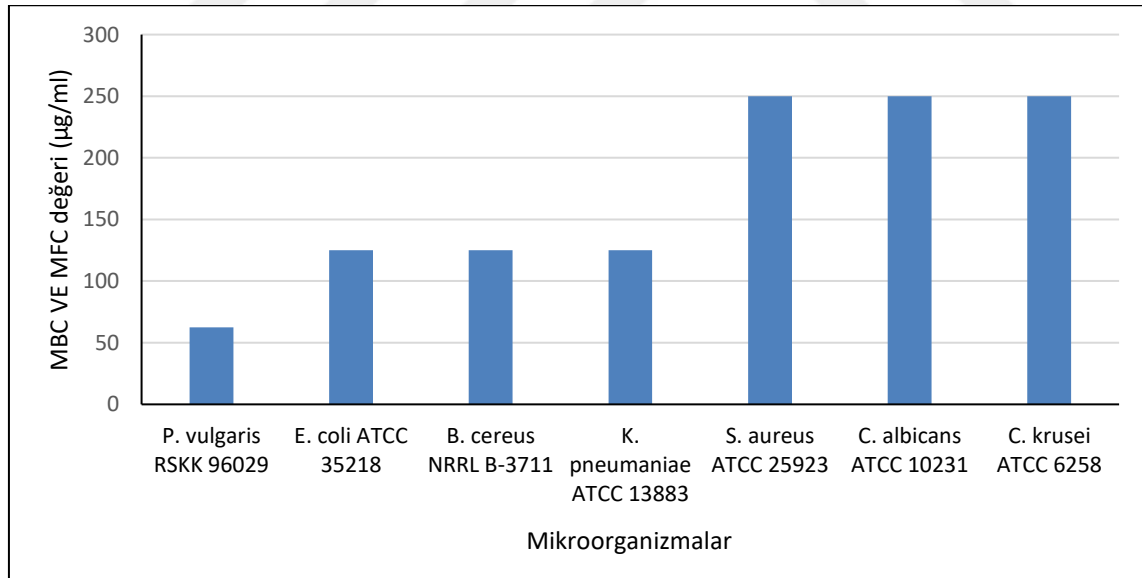
	Yavşan otu özütleri					Pozitif kontrol		
Test mikroorganizmaları	Y6	Y11	Y14	Y21	Ysoxhleth	Amp	Clf	Keto
<i>E. coli</i> ATCC 35218	62,5	31,25	31,25	31,25	62,5	>125	>125	-
<i>B. cereus</i> NRRL B-3711	31,25	62,5	62,5	62,5	62,5	31,25	125	-
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	62,5	62,5	31,25	62,5	31,25	62,5	125	-
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	31,25	31,25	31,25	125	125	125	15,63	-
<i>P. vulgaris</i> RSKK 96029	62,5	31,25	31,25	31,25	31,25	>125	125	-
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	62,5	31,25	31,25	31,25	31,25	NS	NS	31,25
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	62,5	62,5	62,5	62,5	125	NS	NS	<0,98

SCCO₂ özütlemesi sonucu elde edilen optimum örnek olan Y21’nin MIC değerleri sütun grafiği şekil 5.16’da verilmiştir.



Şekil 5.16. SCCO₂ özütlemesi sonucu elde edilen optimum örnek olan Y21'in MIC değerleri sütun grafiği

SCCO₂ özütlemesi sonucu elde edilen optimum örnek olan Y21'nin MBC ve MFC değerleri sütun grafiği şekil 5.17'de verilmiştir.



Şekil 5.17. SCCO₂ özütlemesi sonucu elde edilen optimum örnek olan Y21'nin MBC VE MFC değerleri sütun grafiği

5.4. Yavşan Otu Özütlerinin Yağ Asidi İçeriklerinin Gaz Kromatografisi Sonuçları

Yavşan otunun süperkritik karbondioksit özütlemesi ve soxhleth özütlemesi sonrasında elde edilen özütlerin, gaz kromatografisi ile bulunan yağ asidi içeriklerine ait gaz kromatogramı ve her bir yağ asidinin kalitatif ve kantitatif değerlendirilmesi çizelge 5.13 ve çizelge 5.14’de verilmiştir.

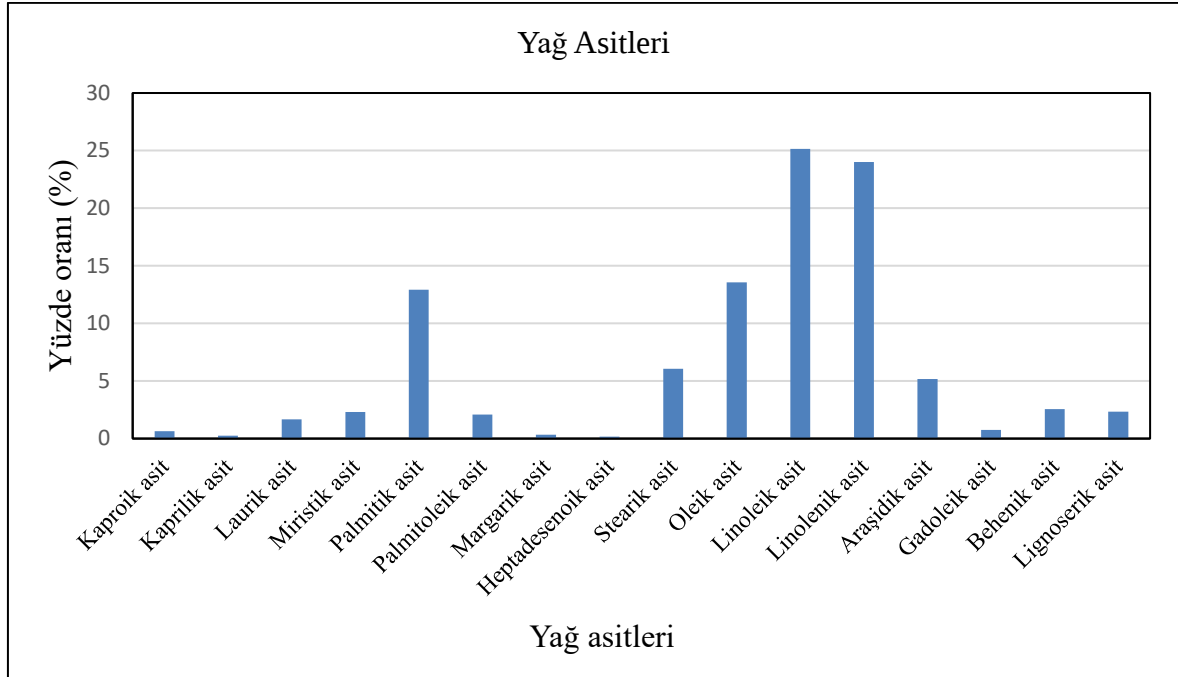
Çizelge 5.13. Yavşan otundan SCCO₂ özütlemesi optimum örneğinin gaz kromatografisi ile elde edilen yağ asidi içerikleri

Yağ Asiti		% Bileşen
C 8:0	Kaproik asit	0,63
C 10:0	Kaprilik asit	0,26
C 12:0	Laurik asit	1,66
C 14:0	Miristik asit	2,32
C 16:0	Palmitik asit	12,92
C16:1	Palmitoleik asit	2,09
C 16:1	Margarik asit	0,33
C 17:0	Heptadekanoik asit	0,18
C 18:0	Stearik asit	6,07
C 18:1 (9t)	Oleik asit	13,57
C 18:2	Linoleik asit	25,14
C18:3	Linolenik asit	24,01
C 20:0	Araşidik asit	5,18
C 20:1	Gadoleik asit	0,74
C 22:0	Behenik asit	2,55
C 24:0	Lignoserik asit	2,35
TOPLAM		100,00
Yağ Asiti		% Bileşen
SFA; Çift bağ içermeyen, doymuş yağ asidi.		34,12
MUFA Tek, çift bağ içeren, doymamış yağ asidi.		16,73
PUFA; İki veya iki den fazla çift bağ içeren doymamış yağ asididir.		49,15
TOPLAM		100,00

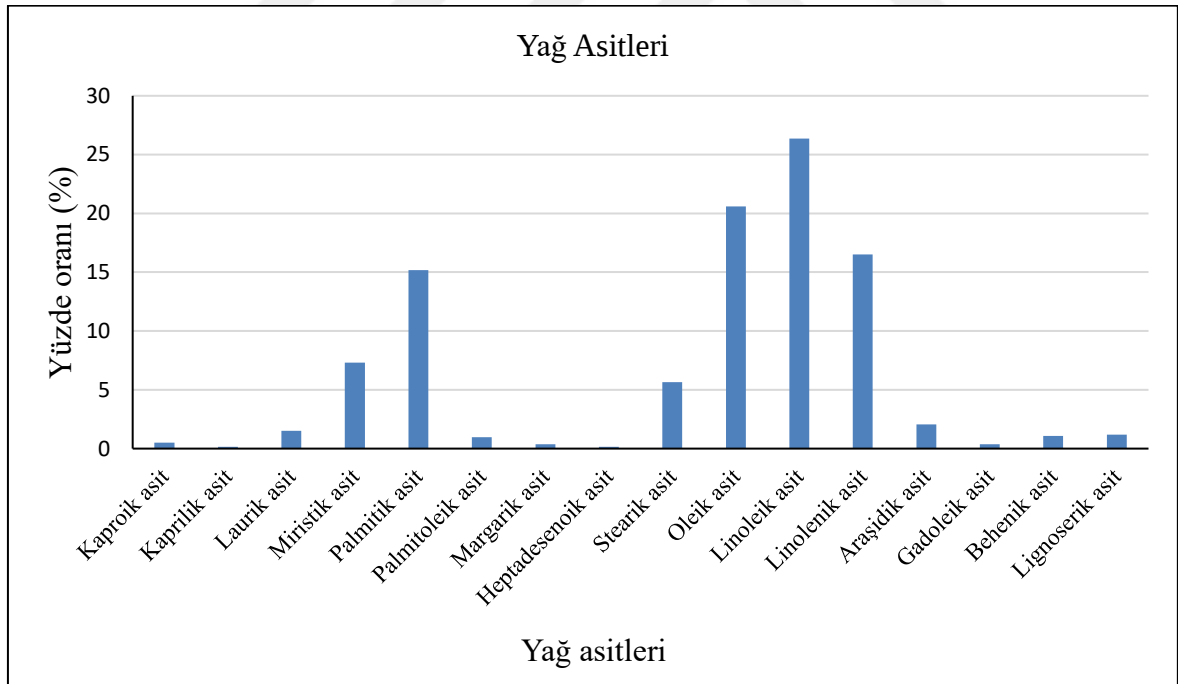
Çizelge 5.14. Yavşan otundan soxhleth özütlemesi örneğinin gaz kromatografisi ile elde edilen yağ asidi içerikleri

Yağ Asidi		% Bileşen
C 8:0	Kaproik asit	0,51
C10:0	Kaprilik asit	0,16
C 12:0	Laurik asit	1,50
C14:0	Miristik asit	7,31
C 16:0	Palmitik asit	15,18
C 16:1	Palmitoleik asit	0,98
C 16:1	Margarik asit	0,38
C 17:0	Heptadekanoik asit	0,16
C 18:0	Stearik asit	5,65
C 18:1 (9t)	Oleik asit	20,60
C 18:2	Linoleik asit	26,37
C 18:3	Linolenik asit	16,50
C 20:0	Araşidik asit	2,07
C 20:1	Gadoleik asit	0,36
C 22:0	Behenik asit	1,08
C 24:0	Lignoserik asit	1,19
TOPLAM		100,00
Yağ Asiti		% Bileşen
SFA; Çift bağ içermeyen, doymuş yağ asidi.		34,81
MUFA; Tek, çift bağ içeren, doymamış yağ asidi.		22,32
PUFA; İki veya iki den fazla çift bağ içeren doymamış yağ asididir.		42,87
TOPLAM		100,00

Gaz kromatografisi ile elde edilen yağ asitleri içeriğinin yüzde olarak belirtildiği sütun grafikler şekil 5.18 ve şekil 5.19’da verilmiştir.



Şekil 5.18. Yavşan otundan SCCO₂ özütlemesi sonrasında elde edilen optimum örneğin sütun grafiği



Şekil 5.19. Yavşan otundan soxhlet özütlemesi sonrasında elde edilen örneğin yağ asitleri içeriği sütun grafiği

Nengroo ve arkadaşları tarafından Keşmir'den beş şifalı bitkinin yağ asidi ve antioksidan aktiviteleri üzerine yapılan bir çalışmada, bu bitkilerden soxhlet özütlemesi ile yüksek oranda özüt elde edilmiştir. Yağ asidi içeriği gaz kromatografisi-kütle spektrometresi ile

belirlenmiş olup, oleik ve linoleik asit yüksek miktarda bulunan doymamış yağ asitleri ve palmitik asit yüksek miktarda bulunan doymuş yağ asidi olarak tesbit edilmiştir [74].

Yine bitki özütü ile yapılan bir çalışmada, özütteki yağ asidi içeriğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Yöntem olarak gaz kromatografisi kullanılmış ve sonuç olarak sanayi açısından önemli olan uzun zincirli (24 karbonlu) doymuş ve yine uzun zincirli doymamış yağ asitlerine sahip olduğu tespit edilmiştir [72].

Bizim alışmamızda kullandığımız Yavşan otu bitkisinin özellikle esansiyel yağ asidi içeriği bakımında daha zengin olduğu söylenebilir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yüksek lisans tez konusu kapsamında yavşan otundan süper kritik karbondioksit özütlemesi yöntemiyle önemli flavonoidler olan quercetin, kaempferol, apigenin ve rutin bileşiklerinin en yüksek verimde özütlenmesi amaçlanmış ve ayrıca soxhleth özütlemesi yöntemiyle de incelenmiştir. Sonra elde edilen özütlerle antioksidan aktivite tayini ve mikrobiyal aktivite tayini yapılmıştır. Daha sonra optimum özüt ve soxhleth yöntemiyle elde edilen özütün yağ asidi içeriklerine bakılmış. Deneysel çalışmaların sonuçları aşağıda özetlenmiştir.

Yavşan otunda yapılan deneysel çalışmalarda çıkan özüt miktarının en yüksek miktarda olduğu sonuç, 0,655 mm, 55 °C, 260 bar, 5 L/dak CO₂ parametreleridir. QRKA flavonoidlerinin en yüksek miktarda olduğu sonuç, 0,655 mm, 55 °C, 260 bar, 7L/dak CO₂ parametreleridir.

En yüksek özüt miktarı elde etmek için yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen en yüksek özüt miktarı 48,96 mg/g ve QRKA miktarı 13,72 µg/g'dır.

En yüksek QRKA miktarı elde etmek için yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen en yüksek özüt miktarı 32,8 mg/g ve QRKA miktarı 13,66 µg/g'dır.

Antioksidan aktivite tayini için 2 yöntemle çalışılmıştır:

DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) yöntemi ile yapılan çalışmada özütlerin antioksidan aktivite tayinine bakılmış ve standart maddeler olan BHA ve BHT ile kıyaslandığında düşük antioksidan özellik gösterse de antioksidan özelliklerinin var olduğu görülmüştür.

Toplam fenolik madde tayini (Folin-Ciocalteu) yöntemi ile yapılan çalışmada özütlerin antioksidan aktivite tayinine bakılmış, yavşan otunun fenolik madde içeriği 1,0 mg/ml için 78,13- 492,95 mg GAE/100g yavşan otu aralığında, 0,4 mg/ml için ise 29,01-207,92 mg GAE/100g yavşan otu aralığında değiştiği görülmüştür.

Antimikrobiyal aktivite tayini için yavşan otundan elde edilen özütlerin antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi için beş adet bakteri ve iki adet fungus ile bulunan minimum

inhibisyon konsantrasyonu (MIC) ve minimum bakterisidal konsantrasyonu (MBC), minimum fungusidal (MFC) sonuçlarına bakılmıştır. Pozitif kontrol olarak bilinen standart antibiyotiklerden olan ampisilin, kloramfenikol için bulunan MIC ve MBC değerleri ve ketokonazol için bulunan MFC değerleri incelendiğinde, yavşan otundan elde edilen özütlerin farklı basınç, sıcaklık, parçacık boyutu ve CO₂ akış hızının optimum değerlerine karşılık beş bakteri üzerindeki MIC değerlerinin oldukça düşük değerler olduğu görülmektedir. Bu sonuçların, pozitif kontrol için kullanılan ampisilin ve kloramfenikol ile kıyaslandığında daha iyi olduğu görülmüştür.

Yavşan otu özütlerinin çalışılan beş bakteri üzerine gösterdiği MBC değerlerinin pozitif kontrol olarak kullanılan Ampisilin ve Kloramfenikole karşı kıyaslandığında bazı bakteriler için benzer etki gösterirken bazılarında ise daha iyi MBC değerlerine sahip olduğu görülmüştür.

Yine yavşan otu özütlerinin çalışılan iki fungus üzerine gösterdiği MIC değerleri incelendiğinde bulunan değerlerin pozitif kontrol olarak kullanılan ketokonazole göre daha düşük etkili olduğu görülmüştür.

Bitki özütlerindeki etken maddeler, mikroorganizmaların hücre yapısını farklı şekillerde etkileyerek antimikrobiyal etki gösterebilirler. Etken maddeler, mikroorganizmanın bünyesindeki enzim aktivitelerini inhibe edebilir, protein sentezini durdurabilir, genetik madde olan DNA'nın yapısını etkileyerek DNA'yı bozabilir. Ayrıca hücre zarının geçirgenliğini bozabilirler.

Bitki özütlerindeki etken maddeler, yukarıda bahsedilen yollardan herhangi birini veya birkaçını etkilemiş olabilirler ve bu şekilde mikroorganizmanın canlılığını yok etmiş olabilir. Tam olarak mekanizmayı aydınlatmak için daha ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Yavşan otu özütlerinin yağ asitleri içeriği incelendiğinde C 8:0 (kaproik asit) ile C 24:0 (lignoserik asit) arasında birçok doymuş ve doymamış yağ asitlerinin varlığı gözlenmiştir. Gerek SCCO₂ yöntemi ve gerek soxheth özütleme yönteminin her ikisinde de doymamış yağ asitleri olan C 18:2 (linoleik asit) ve C 18:3 (linolenik asit) yağ asitlerinin Yavşan otunda bol miktarda olduğu görülmüştür.

Gaz kromatografisi analizi sonuçlarına göre; Yavşan otu bitkisinin yapraklarından elde edilen özüte ait kromatogramda 16 sinyal alınmıştır. Çizelge 5.13 ve 5.14 incelendiğinde Linoleik asit bileşiğinin tüm sıcaklıklarda en fazla özütlenen bileşen olduğu görülmektedir. Bununla beraber, farklı sıcaklıklarda elde edilen özüt kompozisyonlarının birbirinden farklılıklar gösterdiği gözlemlenmiştir. Başlangıç sıcaklığı olan 120 °C’de kısa zincirli dört tane yağ asidinin(kaproik asit, kaprilik asit, laurik asit ve miristik asit) sinyali görülmüştür. Sıcaklık 175 °C’ye çıkarıldığında palmitik asit (16:0), palmitoleik asit, margarik asit, heptadekanoik asidin sinyali görülmüştür. Sıcaklık 210 °C’ye artırılırken stearik asit (18:0), oleik asit (18:1) ve linoleik asit (18:2) sinyalleri gözlenmiştir. Son olarak sıcaklık 230 °C’de sabitlenmiştir. Bu sıcaklığa kadar ise araşidik asit (20:0), gadoleik asit (20:1), behemik asit (22:0), lignoserik asit (24:0) görülmüştür. Sıcaklık programlaması yapılarak farklı zamanlarda sinyal veren yağ asitlerinin tamamının açık bir şekilde nitel ve nicel analizi hedeflenmiştir. Bulunan sonuçlar her iki farklı özütleme türü için de hemen hemen benzerdir.

SCCO₂ ve soxhleth özütlemesi sonrası elde edilen yağ asidi içerikleri karşılaştırıldığında, küçük farklılıklarla beraber hemen hemen benzer içeriklere sahip olduğu söylenebilir. Yöntemsel değişikliğin yağ asidi içeriği üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı söylenebilir.

Yavşan otu Türkiye’nin özellikle Kuzey Anadolu, Güney Doğu Anadolu ve İç Anadolu bölgesinde bol miktarda yetişmektedir. Ormanlık yerlerin kenarlarında, güneş gören yerlerde, ormanlık yerlerin seyrek ağaçlı bölgelerinde, çimenlik ve meralarda, hatta duvar çatlaklarında bile yetişebilen bir bitkidir. Bu potansiyeli göz önüne alındığında, fenolik antioksidanların üretimi için önemli bir kaynak olabileceği görülecektir. Bu fenolik antioksidanlar, piyasada ticari ürün halinde sunulmaktadır. Oldukça değerli ürünler olup, fiyatları da yüksektir. Ülkemizde ve Dünya’da gıda takviyeleri ve vitaminlere olan talep de hızla artmaktadır.

Deneysel çalışmalar sonunda süper kritik karbondioksit yöntemi ile oldukça başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Süper kritik karbondioksit yöntemi, ekonomik olması ile beraber atık madde bırakmaması ve toksik çözücü içermemesi açısından oldukça avantajlı bir yöntem olduğu görülmüştür. Yavşan otundan süper kritik karbondioksit yöntemiyle oldukça bol miktarda fenolik flavonoidler elde edilmiş ve bu yöntemin üstünlüğü ve avantajları görülmüştür.

Özetle, bu çalışmada kullanılan Yavşan otu özütünün tedavide kullanılabilecek yeni bir ilaç etken maddesi veya bir antimikrobiyal etken madde olarak kullanılabilmek potansiyelinin yüksek olduğu görülmüştür. Ayrıca farklı referans standart maddelerin temini ile yavşan otundan çıkan özütlerden başka ilaç etken maddelerinin de varlığının araştırılması literatüre olumlu katkılar sağlayacaktır.



KAYNAKLAR

1. Perez, F. V., Cesar, G. F. (2018). Research trends in flavonoids and health. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 646 ,107-112
2. Husain, N., Kumar, A. (2012). Reactive oxygen species and natural antioxidants a review. *Advances in Bioresearch*, 3(4), 164-175
3. Chen Allen Y., Chen Yi, C. (2013). A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention. *Food Chemistry*, 138(4), 2099-2107.
4. İnternet: Acı Yavşan Otuunun Faydaları. (2017). URL: <https://www.makaleler.com/aci-yavsan-otunun-faydalari>, Son Erişim Tarihi. 07.02.2017
5. Yaşar, S., Güler G., Beram A., Coşkun D., Ozansoy D. (2017). Acı Yavşan otu (*Artemisia absinthium* L.) yaprak uçucu bileşenleri. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 8(2), 148-152
6. Prakash, A. (2001). Antioxidant activity. *Medallion Laboratories Analytical Progress*, 19(2), 1-4
7. Sen,S., Chakraborty, R., Sridhar, C., Reddy, Y.S.R., De, B. (2010). Free radicals, antioxidants, disease and phytomedicines: Current Status and Future Prospect. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 3(1), 92-100.
8. Panovska, K.T., Kulevanova, S., Stefova, M. (2005). In vitro antioxidant activity of some teucrium species (lamiaceae). *Acta Pharm*, 55, 207– 214.
9. Kirschweng, B., Tátraaljai, D. Földes, E., Pukánszky, B. (2017). Natural antioxidants as stabilizers for polymers. *Polymer Degradation and Stability*, 145, 25-40.
10. Chongtham N., Madho S. B., Harjit K. B., Oinam S. (2018). Bamboo: A rich source of natural antioxidants and its applications in the food and pharmaceutical industry. *Trends in Food Science & Technology*, 77, 91-99.
11. Li Ş., Guowei C., Chao Z., Man W., Shuyan W., Qing L. (2014). Research progress of natural antioxidants in foods for the treatment of diseases. *Food Science and Human Wellness*, 3(3-4), 110-116
12. Vareltsis K., Koufidis D., Gavriilidou E., Papavergou E., Vasiliadou S. (1997). Effectiveness of natural rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extract on the stability of filleted and minced fish during frozen storage. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung A*, 205, 93- 96.
13. Wang, T., Li, Q., Bi, K. (2018). Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13(1), 12-2
14. Hoensch, H. P., Oertel, R. (2015). The value of flavonoids for the human nutrition: Short review and perspectives. *Clinical Nutrition Experimental*, 3, 8-14.

15. Lin, J., Gao, Y., Li, H. (2014). *DNA protective effect of mangosteen xanthenes: an in vitro study on possible mechanisms*. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 4, 147-153.
16. Nuralın, L. (2018). *Yağlı tohumlardan süper kritik karbon dioksit yöntemiyle ilaç etken bileşenlerinin özütlenmesi*. Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara
17. Sogut, O. Ö., Akgun, M. (2007), Treatment of textile wastewater by SCWO in a tube reactor, *Journal of Supercritical Fluids*, 43(1), 106-111.
18. Arslan, T., (2010). *Tekstil atık sularının süperkritik su ortamında gazlaştırılması*. Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
19. Şenyay, Ö. D. (2013). *Bazı hidrolitik enzimlerin süperkritik karbondioksit ortamında kararlılığı ve yapısal bozunmalarının incelenmesi*. Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir
20. Cansell F., Aymonier C., Loppinet-Serani A. (2003), Review on materials science and supercritical fluids. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 7(4-5), 331–340.
21. Eckert, C. A., Chandler, K. (1998). Tuning Fluid Solvents for Chemical Reactions. *Journal of Supercritical Fluids*, 13, 187-195.
22. Laboureur, L., Ollero, M., Süper, D. (2015). Lipidomics by supercritical fluid chromatography. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 13868–13884.
23. Clifford, A. A., Williams, J.R. (2000). Introduction to supercritical fluids and their applications. *Supercritical Fluid Methods And Protocols*, 13, 1-17
24. Wang S. M., Ling, Y. C., Giang Y. S., (2003). Forensic Applications of Supercritical Fluid Extraction and Chromatography, *Forensic Science Journal*, 2, 5-18.
25. İçen, H., (2008). *Süperkritik karbon dioksit özütleme metodu ile atık çay lifleri saplarından kafein eldesi*. Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
26. Önem, E., (2015). *Bitkisel tabaklama işleminde süperkritik akışkan teknolojisinin kullanımı üzerine araştırmalar*. Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
27. Froning, G. W., Wehling, R.L. Cuppett, S. L., Pierce M. M., Niemann, L., Siekman, D. K. (1990). Extraction of Cholestrol and Other Lipids from Dried Egg Yolk Using SC-CO₂. *Journal of Food Science*, 55(1), 95–98.
28. Yang, Y., Liang, Y., Yang, J., Ye, F., Zhou, T., Li, G. (2019). Advances of supercritical fluid chromatography in lipid profiling. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 9(1), 1-8
29. Baiker, A. (1999). Supercritical Fluids in Heterogeneous Catalysis. *Chemical Reviews*. 99, 453-473.

30. Dinçer, S., Acaralı, N. B., Uzun, İ. N., Deniz, S. (2007). A Second Option in Special Separation Operations: Supercritical Fluid Processes, *Sigma Journal of Engineering and Natural Sciences*, 25(2), 106-128.
31. Emel, S. D. (2003). *Yüksek basınçlarda CO₂-Stiren ikili sistemin faz davranışı*. Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
32. F. Galip. (2007). *Böğürtlen (rubus sp.) meyvesinin karbon dioksit ile süper kritik ekstraksiyonundan doğal boyar madde eldesi ve uygulanabilirliği*. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 201575.
33. McHugh, M. A., Krukonis, V. J. (1994). Supercritical fluid extraction principles and practice, 2nd Ed.. McGraw Hill, Butterworth-Heinemann, Boston Mass. 5-18.
34. Giebauf A., Magor W., Steinberger D. J. (1999). A study of hydrolases stability in supercritical carbon dioxide, *Enzyme and Microbial Technology*, 4, 577-583.
35. Roy B. C., Goto M., Hirose T. (1996). Temperature and pressure effects on supercritical CO₂ extraction of tomato seed oil, *International Journal of Food Science and Technology*, 31, 137-141.
36. Salgın, U. (2004). *Kapsidiolün Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu*, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 299
37. Sovova, H., Zarevucka, M., Vacek, M., Stransky, K. (2000). Solubility of Two Vegetable Oils in Supercritical CO₂. *Journal of Supercritical Fluids*, 20, 15-28
38. Snyder, M. J., Friedrich, J. P., Christianson, D. D. (1984). Effect of moisture and particle size on the extractability of oils from seeds with supercritical CO₂. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 61(12), 1851-1856.
39. Martinez, M. L., Mattea, M. A., Maestri, D. W. (2008). Pressing and supercritical carbon dioxide extraction of walnut oil. *Journal of Food Engineering*, 88, 399-404
40. Atanur, O. M. (2008). *Ganoderma lucidum mantarlarından konvansiyonel ve süperkritik ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen ekstraktların bileşenlerinin tanımlanması*. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
41. Gürü, M., İçen, H. (2004). Obtaining of caffeine from Turkish Tea fiber and stalk wastes. *Bioresource Thecnology*, 94, 17-19.
42. Park, H. S., Choi, H. K., Lee, S. J., Park, K. W., Choi, S. G., Kim, K. H. (2007), Effect of mass transfer on the removal of caffeine from green tea by supercritical carbon dioxide. *J. of Supercritical Fluids*, 42, 205-211.
43. Bjornsson, W.J., MacDougall, K. M., Melanson, J. E., O'leary, S. J. B., McGinn, P. J. (2012). Pilot-Scale Supercritical Carbon dioxide extractions for the recovery of triacylglycerols from microalgae: A practical tool for algal biofuels research. *Journal of Applied Phycology*, 24(3), 547-555.

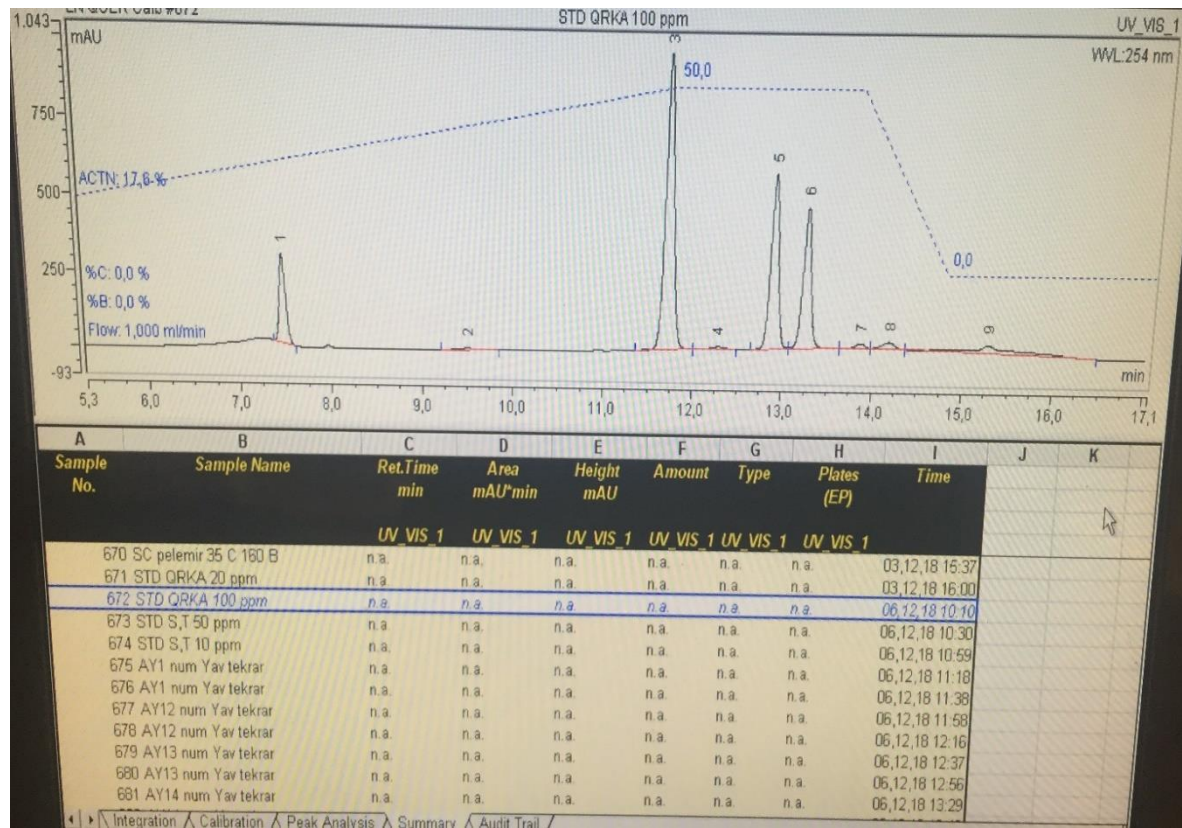
44. Solana, M., Rizza, C. S., Bertucco, A. (2014). Exploiting microalgae as a source of essential fatty acids by supercritical fluid extraction of lipids: Comparison between *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella protothecoides* and *Nannochloropsis salina*, *The Journal of Supercritical Fluids*, 92, 311-318.
45. Garcia Alba, L. (2013). *Algae Biorefinery: An experimental study on liquid fuels production and nutrients recycling*. Doctor of Philosophy Thesis, University of Twente, Enschede.
46. Mendes, R. L., Nobre, B. P., Cardoso, M. T., Pereira, A. P., Palavra, A. F. (2003). Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with pharmaceutical importance from microalgae. *Inorganica Chimica Acta*, 356, 328-334.
47. Cheung, P. C. (1999). Temperature and pressure effects on supercritical carbon dioxide extraction Of N-3 fatty acids from red seaweed. *Food Chemistry*, 65(3), 399-403.
48. Bayraktar, N. E. (2018). *Süperkritik karondioksit ekstraksiyonu ile mikroalglerden biyodizel amaçlı yağ eldesi*. Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul
49. Saldana, M. D. A, Mohamed, R. S., Mazzafera, P. (2000). Supercritical carbon dioxide extraction of methylxanthines from mate tea leaves. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 17(3), 251-259.
50. Lang, Q., Wai, M. C. (2001). Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies-a practical review. *Talanta*, 53, 771-782.
51. Nikolova, M. T., Taskova, R. M., Peev, D. R. (2005). Exudate flavonoid aglycones of *Veronica*: Ecological and systematic implications. *Biochemical Systematics and Ecology*, 33, 1258-1268.
52. Anggrianto, A., Salea, R., Veriansyah, B., Tjandrawinata, R. R. (2014). Application of supercritical fluid extraction on food processing black-eyed pea (*Vigna unguiculata*) and peanut (*Arachis hypogaea*). *Procedia Chemistry*, 9, 265–272.
53. Yi, J., Wang, Z., Bai, H., Yu, X., Jing, J., Zuo, L. (2015) Optimization of Purification, Identification and Evaluation of the in Vitro Antitumor Activity of Polyphenols from *Pinus Koraiensis* Pinecones. *Molecules*, 20, 10450-10467.
54. Faramarz, S., Dehghan, G., Jahanban-Esfahlan, A. (2015). Antioxidants in different parts of oleaster as a function of genotype. *Bio Impacts*, 5(2), 79-85.
55. Fernandez–Ponce, M. T., Casas, L., Mantell, C., Rodríguez, M., De la Ossa, E. M. (2012). Extraction of antioxidant compounds from different varieties of *Mangifera indica* leaves using green Technologies. *Journal of Supercritical Fluids*, 72, 168–175.
56. Döker, O., Salgın, U., Yıldız, N., Aydoğmus, M., Calımlı, A. (2010). Extraction of Sesame Seed Oil Using Supercritical CO₂ and Mathematical Modeling, *Journal of Food Engineering*, 97, 360–366.

57. Mitra, P., Ramaswamy, H. S., Chang, K. S. (2009). Pumpkin (*Cucurbita maxima*) Seed Oil Extraction Using Supercritical Carbon Dioxide and Physicochemical Properties of the Oil, *Journal of Food Engineering*, 98, 208-213.
58. Kiriamiti, H. K., Rascol, E., Marty, A., Condoret, J. S. (2001). Extraction Rates of Oil From High Oleic Sunflower Seeds with Supercritical Carbon Dioxide, *Chemical Engineering and Processing*, 41, 711-718.
59. Uquiche, E., Huerta E., Sandoval, A., Valle, J., M. (2012). Effect of Boldo (*Peumus boldus* M.) Pretreatment on Kinetics of Supercritical CO₂ Extraction of Essential Oil. *Journal of Food Engineering*, 109(2), 230-237.
60. Lasekan, O., Abdulkarim, S. M. (2012). Extraction of Oil from Tiger Nut (*Cyperus esculentus* L.) with Supercritical Carbon Dioxide (SC- CO₂), *LWT - Food Science and Technology*, 47(2), 287-292.
61. Ksouda, G., Hajji, M., Sellimi, S., Merlier, F., Falcimaigne-Cordin, A., Nasri, M., Thomasset, B. (2018). A systematic comparison of 25 Tunisian plant species based on oil and phenolic contents, fatty acid composition and antioxidant activity. *Industrial Crops & Product*, 123, 768-778.
62. Naves, V. M. L., Dos Santos, M. H., Ribeiro, I. S., Da Silva, C. A., Silva, N. C., Da Silva, M. A., Da Silva, G. A., Dias, A. L. T., Lonta, M., Dias, D. F. (2019). Antimicrobial and antioxidant activity of *Garcinia brasiliensis* extracts. *South African Journal of Botany*, 124, 244-250.
63. Kozłowska, M., Gruczynska, E., Scibisz, I., Rudzinska, M. (2016). Fatty acids and sterols composition and antioxidant activity of oils extracted from plant seeds. *Food Chemistry*, 213, 450-456.
64. Wang, L. F., Zhang, H. Y. (2003). A theoretical investigation on DPPH radical-Scavenging mechanism of edaravone. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 13(21), 3789-3792
65. Uribe, J. A. R., Perez, J. I. N., Kauil, H. C., Rubio, G. R., Alcocer, C. G. (2011). Extraction of oil from Chia seeds with supercritical CO₂. *Journal of Supercritical Fluids*, 56, 174-178.
66. Çelik H. T., Gürü, M. (2014). Extraction of oil and silybin compounds from milk thistle seeds using supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*, 100, 105-109.
67. Reverchon, E., Marrone C. (2001). Modeling and simulation of the supercritical CO₂ extraction of vegetable oils. *Journal of Supercritical Fluids*, 19, 161-175
68. Machmudah, S., Shotipruk, A., Goto, M., Sasaki, M., Hirose, T. (2006). Extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using supercritical CO₂ and ethanol as entrainer. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 45, 3652-3657.
69. Salgın, U. (2007). Extraction of Jojoba Seed Oil Using Supercritical CO₂+Ethanol Mixture In Green and High-Tech Separation Process, *Journal of Supercritical Fluids*, 39, 330-337.

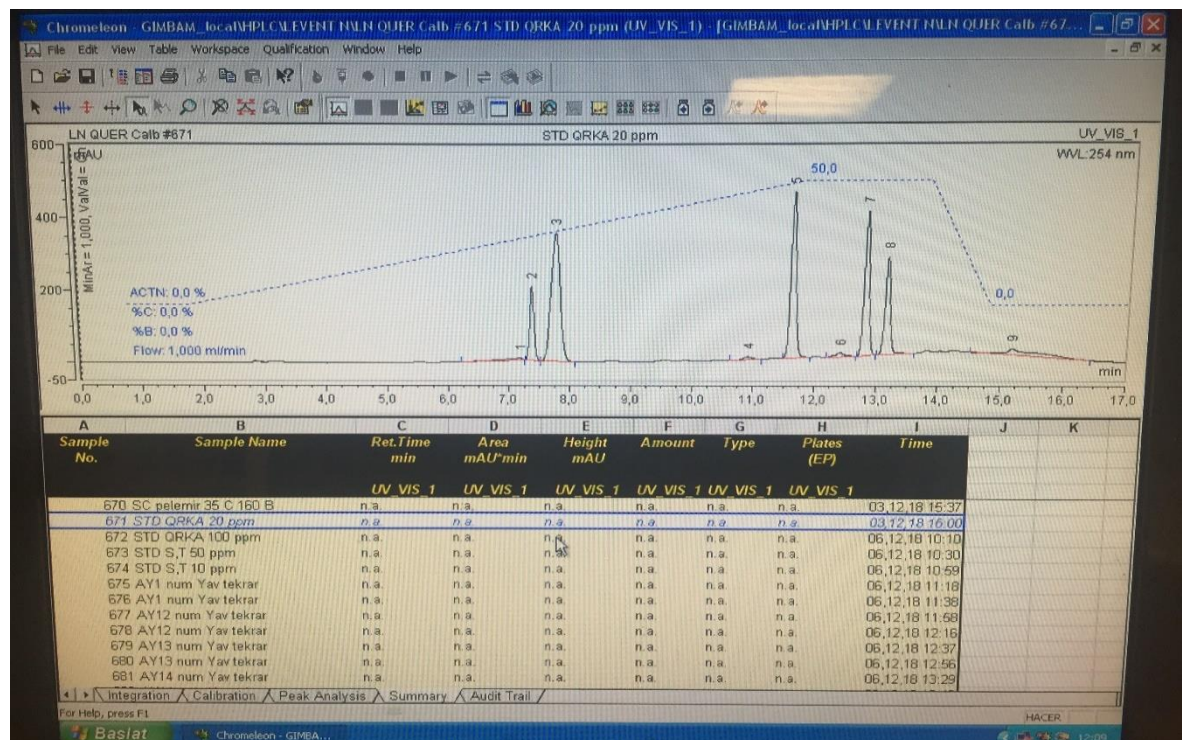
70. Reverchon E., Kaziunas, A., Marrone C. (2000). Supercritical CO₂ extraction of Hiprose Seed Oil: experiments and mathematical modelling. *Chemical Engineering Science*, 55(12), 2195–2201.
71. Benabderrahim, M. A., Yahia, Y., Bettaieb, I., Elfalleh, Z., Nagaz, K. (2019). Antioxidant activity and phenolic profile of a collection of medicinal plants from Tunisian arid and Saharan regions. *Industrial Crops and Products*, 138, 1114275.
72. Hacıabdullahoğlu, A. (2014). *Kızılçam (Pinus brutia, Turkish pine) bitki kabuklarının çözücü ekstraksiyon yöntemi ile antioksidan aktiviteleri, antimikrobiyal etkileri ve yağ asidi kompozisyonlarının incelenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
73. Abdi, R. T., Dego, K. D. (2019). Antimicrobial activity of *Persicaria pensylvanica* extract against *Staphylococcus aureus*. *European Journal of Integrative Medicine*, 29, 100921
74. Nengroo, Z. R., Rauf, A. (2019). Fatty acid composition and antioxidant activities of five medicinal plants from Kashmir. *Industrial Crops and Products*, 140, 111596.



EK-1. Yavşan otuna ait örnek kromatogramlar

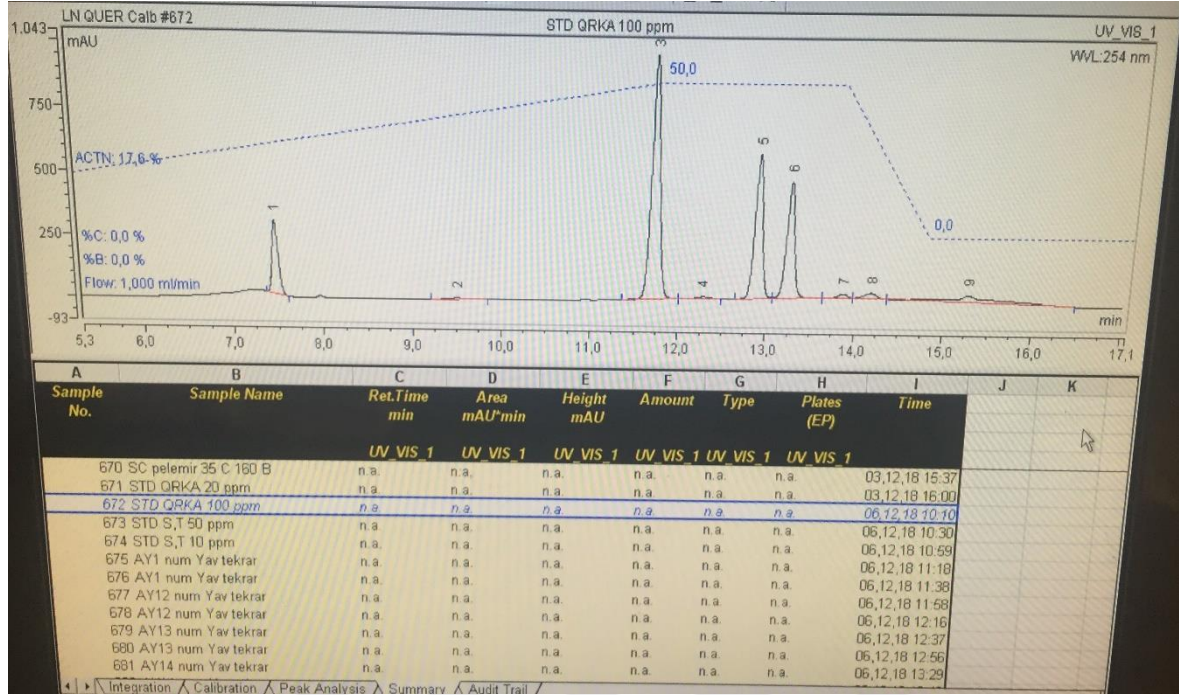


Resim 1.1. QRKA bileşiklerine ait 10 ppm'lik bir karışım standardın HPLC analizi

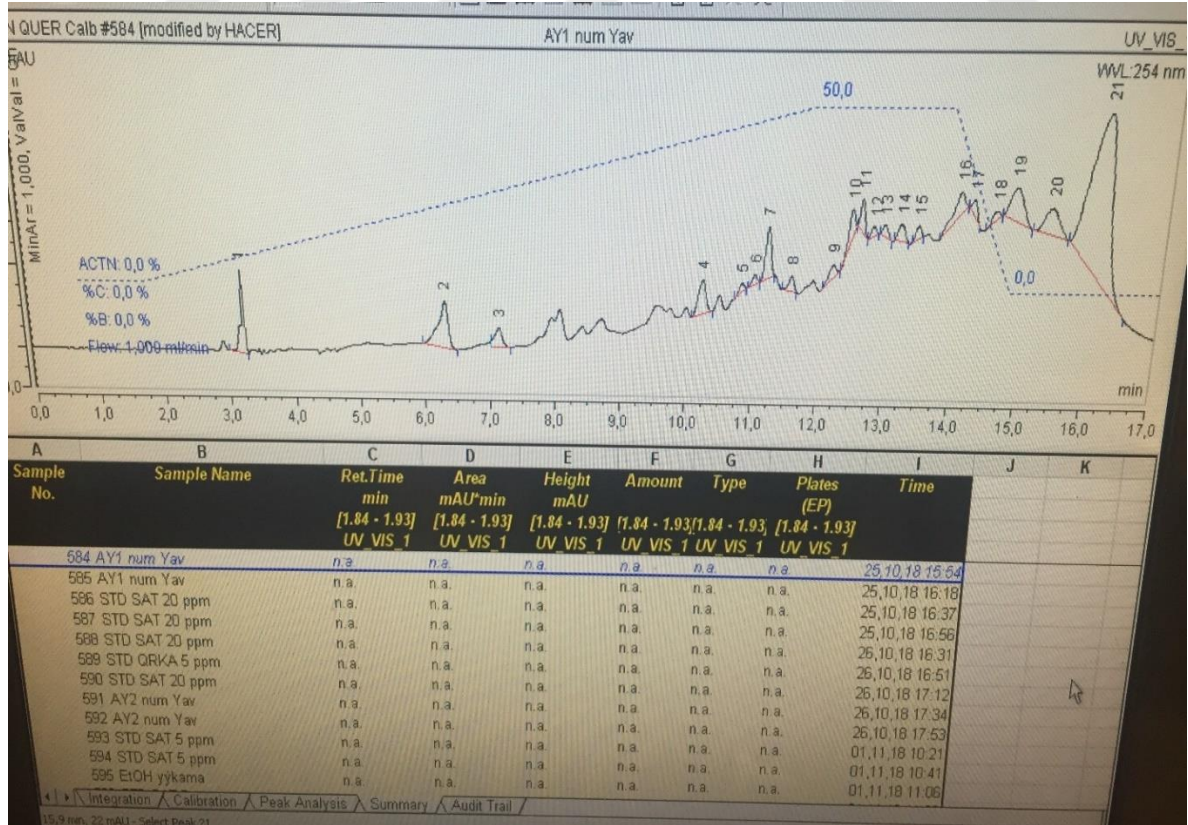


Resim 1.2. QRKA bileşiklerine ait 20 ppm'lik bir karışım standardın HPLC analizi

EK-1. (devam) Yavşan otuna ait örnek kromatogramlar

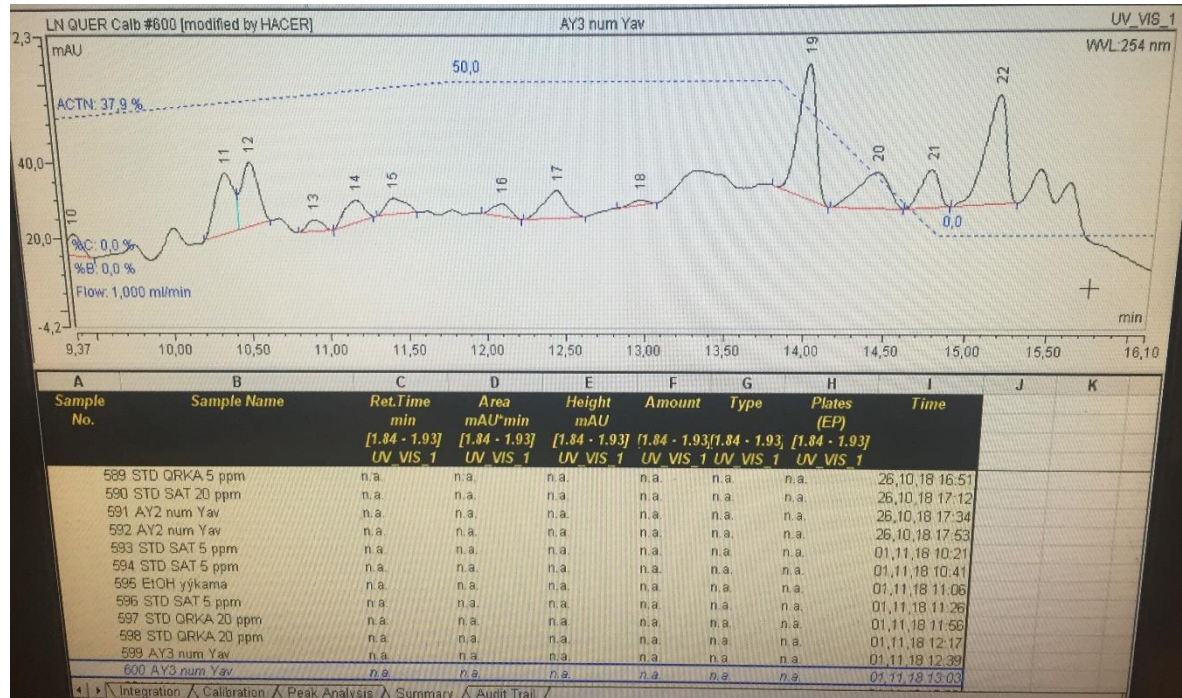


Resim 1.3. QRKA bileşiklerine ait 100 ppm'lik bir karışım standardın HPLC analizi



Resim 1.4. Yavşan otu 1 örneğine ait HPLC analizi

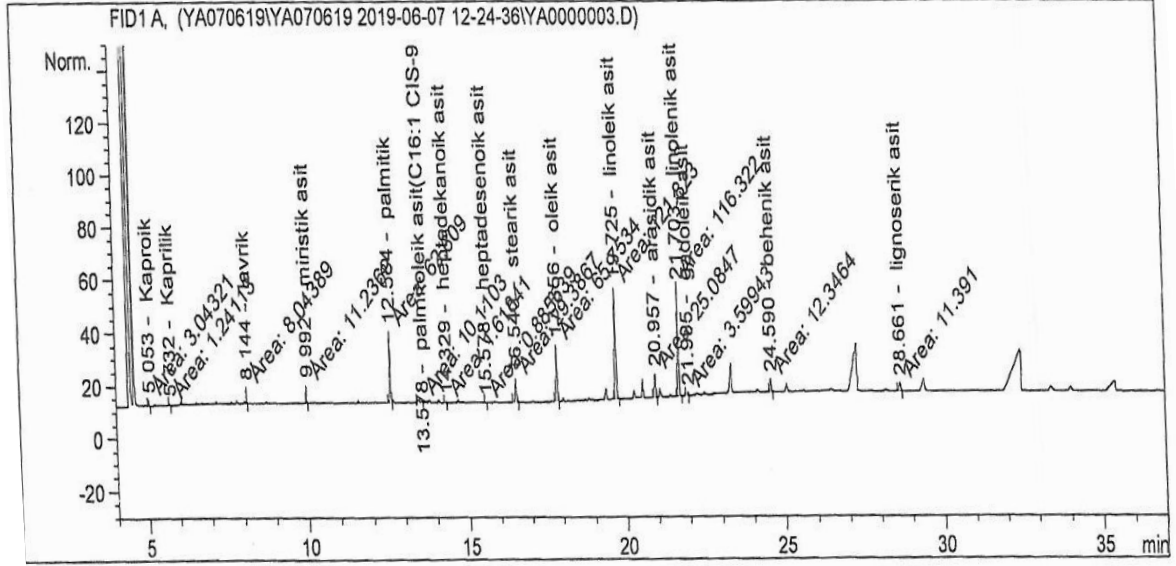
EK-1. (devam) Yavşan otuna ait örnek kromatogramlar



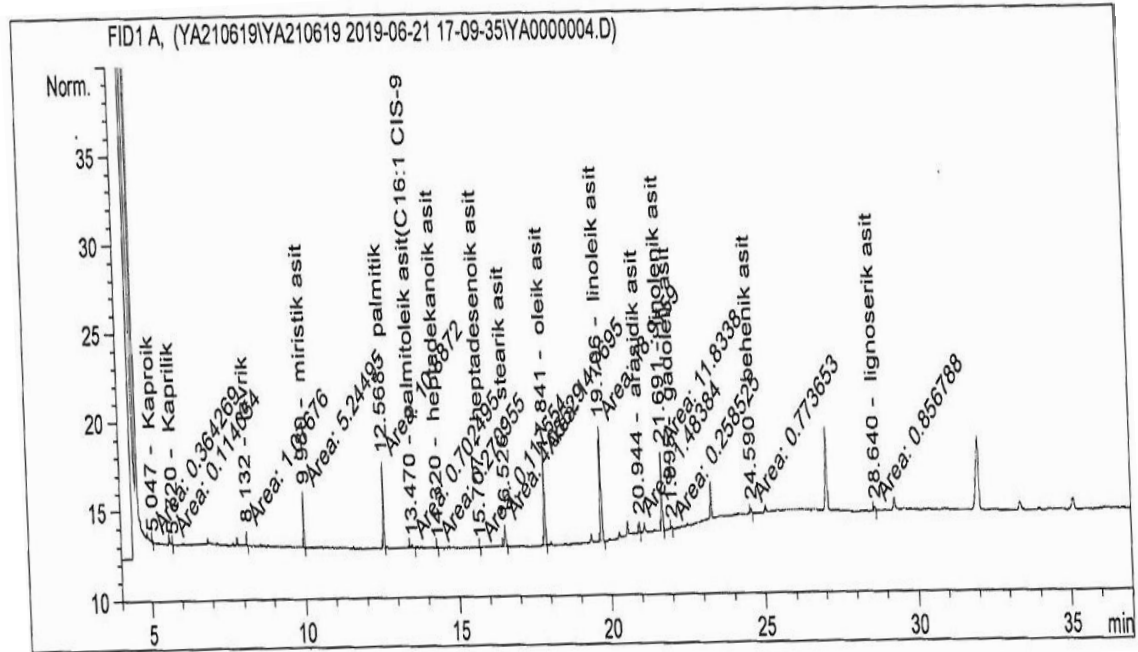
Resim 1.5. Yavşan otu 1 örneğine ait HPLC analizi

EK-2. Yavşan otu örneklerinin yağ asidi içerikleri örnekleri

Yavşan otu örneklerinin gaz kromatografisi ile edilen yağ asidi içeriğinin kromatogramı Resim 2.1 ve Resim 2.2’de verilmiştir.



Resim 2.1. Yavşan otundan SCCO₂ özütlemesi sonrasında elde edilen optimum örneğin gaz kromatogramı



Resim 2.2. Yavşan otundan soxhlet özütlemesi sonrasında elde edilen gaz kromatogramı

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : YILDIZ, Ahmet Said
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 044.11.1990, Ermenek/Karaman
Medeni hali : Bekar
Telefon : 0 (555) 717 88 72
e-mail : asyildiz70@gmail.com.tr



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi / Kimya Bölümü	Devam Ediyor
Lisans	Gazi Üniversitesi / Eczacılık Fakültesi	2014
Lise	Özel Enderun Lisesi	2009

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2016-Halen	Eczane	Serbest Eczacı

Yabancı Dil

İngilizce

Hobiler

Kitap okuma, Yüzme, Yürüyüş



GAZİ GELECEKTİR..