

**MADIMAKTAN (*Polygonum cognatum* Meissn.) YANIT YÜZEY YÖNTEMİ
KULLANILARAK FENOLİK BİLEŞİK EKSTRAKSİYONUNUN
OPTİMİZASYONU**

Mustafa BAYRAM, Semra TOPUZ*

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Tokat,
Türkiye

Geliş / Received: 27.10.2022; Kabul / Accepted: 30.12.2022; Online baskı / Published online: 18.01.2023

Bayram, M., Topuz, S. (2023). Madımaktan (*Polygonum cognatum* Meissn.) yanıt yüzey yöntemi kullanılarak fenolik bileşik ekstraksiyonunun optimizasyonu. *GIDA* (2023) 48 (1) 118-129 doi: 10.15237/gida.GD22104

Bayram, M., Topuz, S. (2023). Optimization of phenolic compound extraction using response surface method from madimak (*Polygonum cognatum* Meissn.). *GIDA* (2023) 48 (1) 118-129 doi: 10.15237/gida.GD22104

ÖZ

Bu çalışmada, gıda olarak tüketiminin yanı sıra geleneksel halk hekimliğinde de kullanım alanı bulunan madımaktan (*Polygonum cognatum* Meissn.) fenolik bileşik ekstraksiyonunun optimizasyonu amaçlanmıştır. Bu amaçla madımaktan elde edilen fenolik ekstraktların toplam fenolik madde (TFM), toplam flavonoid (TFL) miktarı ve serbest radikal giderme aktivitesi (DPPH) üzerine metanol/su karışımı konsantrasyonu (%0-100), ekstraksiyon süresi (5-120 dk.) ve sıcaklığın (30-70 °C) etkisi araştırılmıştır. TFM, TFL ve DPPH değerleri için optimum işlem koşulları “desirability” fonksiyonu yaklaşımı ile Design Expert Programı, Box-Behnken tasarımı kullanılarak belirlenmiştir. *P. cognatum*’dan fenolik bileşik ekstraksiyonu elde etmek amacıyla yapılan çalışmada metanol konsantrasyonu %40.15, ekstraksiyon süresi 5.00 dk. ve ekstraksiyon sıcaklığı 70.00 °C optimum koşullar olarak belirlenmiştir. Optimum noktalarda elde edilen fenolik ekstraktların TFM, TFL ve DPPH değerleri sırasıyla 45.40 mg GAE/g kuru örnek, 30.36 mg KE/g kuru örnek, 53.40 mg TE/g kuru örnek olarak tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre *P. cognatum* fenolik bileşik ve antioksidan aktivite açısından zengin bir kaynaktır.

Anahtar kelimeler: *Polygonum cognatum* Meissn., fenolik bileşik, optimizasyon, antioksidan aktivite

**OPTIMIZATION OF PHENOLIC COMPOUND EXTRACTION USING
RESPONSE SURFACE METHOD FROM MADIMAK (*Polygonum cognatum*
Meissn.)**

ABSTRACT

In this study, it was aimed to optimize the extraction of phenolic compounds from the madimak (*Polygonum cognatum* Meissn.), which is used in traditional folk medicine as well as nutrition. For this purpose, the effects of methanol/water mixture concentration (0-100%), extraction time (5-120 min.) and temperature (30-70 °C) on total phenolic compounds (TPC), total flavonoid compounds (TFC) and free radical scavenging activity (DPPH) of phenolic extracts obtained from *P. cognatum* were determined. Optimum conditions for TPC, TFC and DPPH values were determined using the

*Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author

✉:semra.topuz@gop.edu.tr

☎: (+90)356 252 1616

☎: (+90)356 252 1729

Mustafa Bayram; ORCID no: 0000-0002-8232-226X

Semra Topuz; ORCID no: 0000-0002-9122-0839

“desirability” function approach, using the Box-Behnken design in the Design Expert Program. In the study carried out to obtain phenolic compound extraction from *P. cognatum*, methanol concentration (40.15%), extraction time (5.00 min.) and extraction temperature (70.00 °C) were determined as optimum conditions. TPC, TFC and DPPH values of phenolic extracts obtained under optimum conditions were determined as 45.40 mg GAE/g dry sample, 30.36 mg QE/g dry sample, 53.40 mg TE/g dry sample, respectively. As a result of the obtained results, *P. cognatum* is a rich source in terms of phenolic compounds and antioxidant activity.

Keywords: *Polygonum cognatum* Meissn., phenolic compound, optimization, antioxidant activity

GİRİŞ

Bugüne kadar Türkiye’de 12476 bitki taksonu bulunduğu ve bunlardan 4080 türün ise endemik olduğu belirlenmiştir. Benzersiz bir biyolojik çeşitlilik oluşturan bu türlerin birçoğu beslenme açısından da önemli bir yere sahiptir (Sefaoğlu, 2021). Ayrıca endemik bitkiler yöreye özgü yiyecek ve içeceklerin hazırlanmasında kullanıldığı gibi, geçmiş yıllardan beri bazı hastalıkların tedavisinde de “geleneksel” ve “doğal ilaç” olarak kullanılabilir (Saraç vd., 2018). Bu bitkilerden biri olan *P. cognatum* Meissn. Polygonaceae familyasına ait yenilebilir çok yıllık otsu bir bitki türüdür (Pekdemir vd., 2020; Pehlivan vd., 2021). Yörelere göre farklı şekillerde isimlendirilen bu bitkinin en yaygın adı “madımak” olmakla birlikte, bitki madımak pancarı, madımalak, badımak, badımalak, mercimelek, mercimenek ve kuş ekmeği olarak da bilinmektedir.

P. cognatum gövdesi toprak üstüne yatık, pembe çiçekli, yeşil yapraklı otsu yabani bir bitkidir. Bitki 15-30 cm uzunluğunda olmakla birlikte gövdesi ince ve odunsudur (Onay, 2019). Yapraklar kısa saplı, elips biçiminde ve çoğunlukla sivri uçludur (Saraç vd., 2018). Bitki deniz seviyesinden 720-3000 m yüksekliklerde, tarla ve yol kenarları, meralar, uçurumlar, yamaçlar ve sanayi alanları gibi tarımsal ve tarım dışı alanlarda doğal olarak yetişmektedir (Pekdemir, 2020). Bitki ilkbahar mevsiminde Nisan ayından başlayarak Haziran ayına kadar hasat edilmektedir. Farklı iklim koşullarına dayanıklı olan bu bitkiye Türkiye’nin Tokat, Sivas ve Erzurum illeri başta olmak üzere Anadolu’nun çeşitli yerlerinde rastlanmaktadır (Demirgöl vd., 2022). Türkiye’nin İç Anadolu Bölgesi’ndeki bazı çiftçiler şehirleşmeye bağlı olarak ticari bir ürüne dönüşmüş bu bitki için artan talebi karşılamak üzere tarımsal çalışmalara da başlamıştır (Önen vd., 2014). *P. cognatum*

bitkisinin yaprakları ve genç sürgünleri kullanılarak yapılan çorba, yahni, salata, börek gibi çok sayıda ürün bu şehirlerin yöresel yemekleri arasında yer almaktadır (Pekdemir, 2020). *P. cognatum* yetiştiği bölgelerde daha çok gıda olarak tüketilmesinin yanı sıra, yöre halkı bitkiyi geleneksel halk hekimliğinde çeşitli amaçlarla da kullanabilmektedir (Koca vd., 2018; Saraç vd., 2018). Şeker hastalığı tedavisinde, böbrek taşlarının düşürülmesinde, bronşit ve guatr hastalığının tedavisinde kullanılabildiği gibi idrar artırıcı ve damarları büzücü özelliğinden dolayı uzun süren kanamaların durdurulmasında da kullanılabilmektedir (Onay, 2019). Bu etkilerinin içeriğinde bulunan biyoaktif bileşiklerden kaynaklandığı düşünülmekte fakat *P. cognatum*’un biyoaktif bileşiklerini inceleyen sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (Demirgöl vd., 2022). *P. cognatum* üzerine yapılan daha önceki çalışmalarda, bu bitkinin fenolik bileşikler, C vitamini ve karotenoidleri içerdiği rapor edilmiştir (Pekdemir vd., 2020; Pehlivan vd., 2021). *P. cognatum* bitkisi kateşol, kateşin, epikateşin, kumarin, gallik asit, *p*-kumarik asit, klorojenik asit, salisilik asit, kafeik asit, gentisik asit, sinapik asit, *t*-sinnamik asit gibi fenolik bileşikler açısından da zengin bir kaynaktır (Yılar, 2007).

Literatürde *P. cognatum* bitkisinden fenolik bileşik ekstraksiyonunun optimizasyonuna yönelik herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada Tokat ve çevre illerde geleneksel halk hekimliğinde ve çeşitli yöresel yemeklerin hazırlanmasında kullanılan *P. cognatum* bitkisinden fenolik bileşik ekstraksiyonunun optimizasyonunu gerçekleştirmek amaçlanmıştır.

MATERYAL ve YÖNTEM

Materyal

Bitkisel materyal

Araştırmada, fenolik bileşik ekstraksiyonu için kurutulmuş *P. cognatum* bitkisi Madımakçı Sebze ve Meyve Dünyası İşletmesi'nden (Merkez, Tokat) temin edilmiştir. Kurutulmuş *P. cognatum* bitkisi (% nem değeri: 6.51 ± 0.10) ekstraksiyon işlemlerinden önce bir öğütücü yardımı ile toz forma getirilmiş ve 0.075 mm^2 gözenek alanına sahip elekten geçirilmiştir. Kullanıma hazır hale getirilen toz örnek ekstraksiyon işlemine kadar cam kavanozlarda, oda sıcaklığında, karanlık bir ortamda depolanmıştır.

Kimyasal materyal ve kullanılan ekipmanlar

Araştırmanın ekstraksiyon ve analiz aşamalarında etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) (Tekkim, Bursa), metanol (CH_3OH) (Tekkim, Bursa), gallik asit ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$) (Sigma-Aldrich, Almanya), sodyum hidroksit (NaOH) (Merck, Almanya), sodyum nitrit (NaNO_2) (Merck, Almanya), sodyum karbonat (Na_2CO_3) (Isolab, Almanya), troloks ((\pm)-6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilroman-2-karboksilik asit) (Sigma-Aldrich, Almanya), kuersetin (BLDpharm, Çin), alüminyum klorür (AlCl_3) (Merck, Almanya), DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) (Sigma-Aldrich, Almanya), Folin-Ciocalteu reaktifi (Carlo Erba, Fransa) kimyasalları kullanılmıştır.

Araştırmanın farklı basamaklarında ise UV-VIS spektrofotometre (PG Instrument, T80+, İngiltere), saf su cihazı (Merck, Millipore, Almanya), hassas terazi (Radwag, AS 220 R2, Polonya), santrifüj (Nüve, Türkiye), öğütücü (Sinbo SCM 2934, Türkiye), su banyosu (Memmert, Almanya), vorteks (Velp Scientifica, İtalya), ısıtıcı manyetik karıştırıcı (Biosan, MSH 300, Letonya) kullanılmıştır.

Yöntem

Fenolik bileşik ekstraksiyonu

Fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu için 500 mg toz haline getirilmiş *P. cognatum* örnekleri hazırlanmıştır. Farklı oranlarda hazırlanan metanol/su karışımlarından (%0-100) 10 mL alınmış ve *P. cognatum* örnekleri üzerine ilave

edilerek çalkalamalı su banyosunda karıştırılmıştır. Hazırlanan karışımlar çeşitli ekstraksiyon sürelerinde (5-120 dk.) ve sıcaklıklarında (30-70 °C) ekstraksiyon işlemine tabi tutulmuştur. Ekstraksiyon işlemlerinden sonra, ekstraktlar 6000 rpm'de 5 dk. santrifüjlenmiş ve kaba filtre kağıdıyla süzülmuştür. Elde edilen filtratlar analizlerde kullanılmıştır. Deneysel tasarım Çizelge 2'de gösterilmiştir.

Toplam fenolik madde tayini

Analiz için ilk aşamada 100 μL ekstrakt üzerine 2 N Folin-Ciocalteu reaktifi (200 μL) ve distile su (2 mL) ilave edilmiştir. Elde edilen bu karışım oda sıcaklığında 3 dk. bekletilmiştir. Daha sonra karışıma %20'lik Na_2CO_3 (1 mL) çözeltisi eklenmiş ve karışım vorteks ile karıştırıldıktan sonra oda koşullarında karanlık bir ortamda 1 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Karışımların absorbans değerleri 765 nm'de spektrofotometre ile ölçülmüştür. Örneklerin TFM değerleri, gallik asit standardı kullanılarak çizilen kalibrasyon grafiği ile yapılan seyreltmeler de dikkate alınarak mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/g kuru örnek olarak hesaplanmıştır (Putnik vd., 2017).

Toplam flavonoid miktarı tayini

Ekstraktların toplam flavonoid bileşik miktarı Gaafar ve Salama (2013)'nın uyguladığı metodun modifikasyonu ile gerçekleştirilmiştir. 500 μL ekstrakt üzerine 2 mL distile su ve 150 μL %5'lik NaNO_2 eklenmiştir. Oda sıcaklığında 5 dk. bekletildikten sonra karışım üzerine 150 μL %10'luk AlCl_3 çözeltisi ilave edilmiştir. Karışım 5 dk. bekletilmiş ve üzerine 1 mL 1 M NaOH çözeltisi ilave edilerek vorteks ile karıştırılmıştır. Daha sonra karışım 1.2 mL distile su ile 5 mL'ye tamamlanmıştır. Karışımın spektrofotometrede 415 nm'de absorbansları ölçülmüştür. Örneklerin toplam flavonoid miktarları kuersetin standardı kullanılarak çizilen kalibrasyon eğrisi kullanılarak hesaplanmış ve sonuçlar mg kuersetin eşdeğeri (KE)/g kuru örnek olarak ifade edilmiştir.

Serbest radikal giderme aktivitesi (DPPH•)

Analiz için ilk aşamada DPPH çözeltisi (0.06 mM) hazırlanmıştır. Sonrasında ise ekstraktların (100 μL) üzerine DPPH çözeltisi (3.9 mL) eklenmiş ve

karıştırma işlemi uygulanmıştır. Elde edilen karışım karanlık bir ortamda, oda sıcaklığında 30 dk. bekletilmiş ve daha sonra karışımın spektrofotometrede 517 nm’de absorbanları ölçülmüştür. Örneklerin serbest radikali giderme aktivitesi troloks standardı kullanılarak çizilen kalibrasyon eğrisi kullanılarak hesaplanmış ve sonuçlar mg troloks eşdeğeri (TE)/g kuru örnek olarak ifade edilmiştir (Blasi vd., 2016).

Optimizasyon ve istatistiksel analiz

Fenolik ekstraksiyonu için bağımsız değişkenler için değer aralıklarının seçiminde ön deneme ve literatür taraması sonucu elde edilen verilerden yararlanılmıştır. Fenolik bileşik ekstraksiyonu metanol konsantrasyonu, ekstraksiyon süresi ve sıcaklık parametreleri bakımından optimize edilmiştir. Fenolik bileşik ekstraksiyonu için uygulanan bağımsız değişkenlerin değerleri sırasıyla Çizelge 1’de verilmiştir.

Çizelge 1. Fenolik bileşik ekstraksiyonunda kullanılan bağımsız değişkenler

Table 1. Independent variables used in phenolic compound extraction

Bağımsız Değişkenler		Sembol	-1	0	+1
Fenolik bileşik ekstraksiyonu	Metanol konsantrasyonu(%)	X ₁	0	50	100
	Ekstraksiyon süresi (dk.)	X ₂	5	62.5	120
	Sıcaklık (°C)	X ₃	30	50	70

En yüksek TFM, TFL ve DPPH değerlerini sağlayacak olan ekstraksiyon koşullarının optimizasyonu Design Expert Programında bulunan Box-Behnken tasarımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. TFM, TFL ve DPPH değerleri üzerine, ekstraksiyon işleminde kullanılan parametrelerin etkisi incelenmiş ve en yüksek TFM, TFL ve DPPH değerlerine sahip olan ekstraktı elde etmeyi sağlayacak ekstraksiyon işlemi ise ‘desirability’ fonksiyon yaklaşımı ile optimize edilmiştir. Fenolik bileşik ekstraksiyonu için optimum koşullar için seçilen model Eşitlik 1’de açıklanmıştır:

$$Y (TFM, TFL, DPPH) = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 \quad \text{Eşitlik 1}$$

Eşitlik 1’de Y bağımlı değişkenleri (TFM, TFL ve DPPH) b₀ sabit, b₁, b₂ ve b₃ lineer terimleri, b₁₁, b₂₂ ve b₃₃ kuadratik terimleri ve X₁, X₂ ve X₃ bağımsız değişkenleri temsil etmektedir. Deneysel olarak elde edilen veriler ile tahminlenen değerler arasında fark olup olmadığı SPSS 22.0 (IBM, ABD) paket programı tek örnek t-testi ile belirlenmiştir. TFM, TFL ve DPPH değerleri üzerine işlem değişkenlerinin etkisini belirlemede uygulanan istatistiksel analizler, regresyon analizi, optimizasyon işlemleri, yanıt yüzey grafikleri ise Design Expert (version 7.0, Stat-Ease Inc., ABD) paket programı yardımıyla gerçekleştirilmiştir.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Fenolik bileşiklerin ekstraksiyonunda kullanılacak çözücünün türü, çözücünün ekstrakte edilecek katı maddeye oranı, çözücü ile ekstrakte edilecek maddenin teması (Şahin, 2011), fenolik bileşiklerin polimerizasyon derecesi, diğer bileşenlerle etkileşimi, ekstraksiyon süresi ve sıcaklığı büyük önem arz etmektedir (Çoklar ve Akbulut, 2016). Yapılan çalışmada *P. cognatum* bitkisinden fenolik bileşik ekstraksiyonu işleminde elde edilen TFM, TFL ve DPPH değerleri üzerine metanol/su karışımı konsantrasyonu (X₁: %0-100), ekstraksiyon süresi (X₂: 5-120 dk.), sıcaklığın (X₃: 30-70 °C) etkisi incelenmiştir. Katı-sıvı oranı yapılan ön denemeler neticesinde belirlenmiş olup, ekstraksiyon işlemi boyunca (katı-sıvı:0.5 g-10 mL) sabit tutulmuştur. *P. cognatum* örneklerinden ekstrakt eldesi farklı metanol konsantrasyonu, süre ve sıcaklıktan oluşan 17 farklı koşulda gerçekleştirilmiştir. Bu koşullar uygulanarak elde edilen ekstraktların TFM, TFL ve DPPH değerleri ise Çizelge 2’de sunulmuştur. Ekstraktların TFM değerleri 17.58-46.11 mg GAE/g kuru örnek, TFL değerleri 14.72-31.27 mg KE/g kuru örnek, DPPH değerleri 23.47-53.71 mg TE/g kuru örnek aralığında değişkenlik göstermektedir.

TFM (46.11 mg GAE/g kuru örnek), TFL (31.27 mg KE/g kuru örnek) ve DPPH (53.71 mg TE/g kuru örnek) miktarında en yüksek değer deney

5'te (%50 (h/h), 5 dk, 70 °C) tespit edilmiştir. Literatürde, Elazığ yöresinde toplanan *P. cognatum* bitkisinin etanol, metanol, aseton ve hegzan ekstraktlarının TFM değerleri sırasıyla 24.58, 19.26, 10.76, 4.35 mg GAE/g ekstrakt olarak belirlenmiştir (Pekdemir vd., 2020). Aynı çalışmada TFL değerleri sırasıyla 0.48, 0.97, 0.40, 0.23 mg kateşin eşdeğeri (KAE)/g ekstrakt olarak tespit edilmiştir. Bir başka çalışmada %80 etanol ile ekstrakte edilen kurutulmuş *P. cognatum* bitkisinin TFM değeri 1.24 mg GAE/g olarak tespit edilmiştir (Demirgöl vd., 2022). Türkiye'nin Orta Karadeniz ve Orta Anadolu bölgelerinden toplanan *P. cognatum* bitkilerinin TFM değerleri sırasıyla 67.30 GAE mg/g ve 58.59 GAE mg/g olarak, TFL değerleri ise sırasıyla 50.88 KAE mg/g ve 32.86 KAE mg/g olarak belirlenmiştir (Marangoz, 2020). Mayıs ayında Ardahan ilinde toplanan taze *P. cognatum* bitkisinin TFM ve TFL değerleri sırasıyla 2.24 mg GAE/g, 0.26 mg rutin eşdeğeri (RE)/g olarak belirlenmiştir (Murathan, 2018).

Çalışmamızda elde edilen sonuçlara göre, %50 metanol konsantrasyonunda yapılan ekstraksiyon işlemlerinde TFM, TFL ve DPPH değerlerinin saf su ve %100 metanol konsantrasyonlarında gerçekleştirilen ekstraksiyon işlemlerine kıyasla daha yüksek olduğu saptanmıştır. Ayrıca aynı çizelgede saf su ile elde edilen ekstraktların TFM, TFL ve DPPH değerlerinin %100 metanol ile elde edilen ekstraktlardan daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 2). Çalışmada 17 farklı koşulda ekstrakte edilen *P. cognatum* bitkisinin TFM, TFL ve DPPH değerlerinin birbirinden farklı oldukları tespit edilmiştir. Bundan dolayı verilerin optimize edilmesi gerekmektedir. Ekstraksiyon işlemleri için oluşturulan ve optimizasyon çalışmasında regresyon analizi ile elde edilen ikinci dereceden polinomial modeller TFM için Eşitlik 2, TFL için Eşitlik 3 ve DPPH için Eşitlik 4 ile verilmiştir.

$$\begin{aligned} \text{TFM (mg GAE/g)} = & 33.74 + 0.31X_1 - 0.04X_2 - \\ & 0.01X_3 + 1.23 \times 10^{-3}X_1X_2 + 2.46 \times \\ & 10^{-3}X_1X_3 - 8.71 \times 10^{-4}X_2X_3 - 5.92 \times 10^{-3}X_1^2 + \\ & 2.86 \times 10^{-4}X_2^2 + 7.58 \times 10^{-4}X_3^2 \end{aligned} \quad \text{Eşitlik 2}$$

$$\begin{aligned} \text{TFL (mg KE/g)} = & 24.30 + 0.11X_1 - 0.04X_2 + \\ & 0.04X_3 + 9.45 \times 10^{-4}X_1X_2 + 1.82 \times \\ & 10^{-3}X_1X_3 - 7.23 \times 10^{-4}X_2X_3 - 2.95 \times 10^{-3}X_1^2 + \\ & 3.72 \times 10^{-4}X_2^2 - 2.19 \times 10^{-5}X_3^2 \end{aligned} \quad \text{Eşitlik 3}$$

$$\begin{aligned} \text{DPPH (mg TE/g)} = & 32.19 + 0.71X_1 - 0.08X_2 + \\ & 0.04X_3 + 1.14 \times 10^{-3}X_1X_2 + 6.00 \times \\ & 10^{-4}X_1X_3 - 5.20 \times 10^{-4}X_2X_3 - 8.53 \times 10^{-3}X_1^2 + \\ & 4.19 \times 10^{-4}X_2^2 + 6.36 \times 10^{-4}X_3^2 \end{aligned} \quad \text{Eşitlik 4}$$

TFM, TFL ve DPPH değerleri üzerine ekstraksiyonda kullanılan işlem değişkenlerinin etkisi varyans analizi (ANOVA) çizelgesinde sunulmuştur (Çizelge 3). TFM, TFL ve DPPH analizleri için oluşturulan kuadratik modeller istatistiksel olarak %99 seviyesinde anlamlıdır ($P < 0.01$). Her üç analiz için model uygunsuzluğu ise %95 seviyesinde istatistiksel olarak anlamsızdır ($P > 0.05$). Model uygunsuzluğu değerlerinin istatistiksel anlamda önemsiz olması, TFM, TFL ve DPPH için oluşturulan ikinci dereceden polinomial denklemlerin başarısını göstermektedir.

Elde edilen veriler değerlendirildiğinde; TFM, TFL ve DPPH için oluşturulan modellerde metanol konsantrasyonu (X_1) ve sıcaklığın (X_3) lineer etkisinin %95 seviyesinde anlamlı olduğu ($P < 0.05$) ancak ekstraksiyon süresinin (X_2) lineer etkisinin istatistiksel olarak bir öneminin bulunmadığı belirlenmiştir ($P > 0.05$). Ayrıca TFM, TFL ve DPPH için oluşturulan modellerde metanol konsantrasyonu-süre interaksyonunun ($X_1.X_2$) etkisinin %95 seviyesinde anlamlı olduğu ($P < 0.05$), ekstraksiyon süresi-sıcaklık interaksyonunun ($X_2.X_3$) istatistiksel olarak bir öneminin bulunmadığı bulgulanmıştır ($P > 0.05$) (Çizelge 3). Metanol konsantrasyonu-sıcaklık interaksyonunun ($X_1.X_3$) TFM ve TFL üzerinde önemli bir etkisi saptanırken ($P < 0.05$), DPPH üzerine herhangi bir etkisi saptanmamıştır ($P > 0.05$). TFM, TFL ve DPPH için oluşturulan modellerde metanol konsantrasyonunun kuadratik etkisinin (X_1^2) önemli olduğu tespit edilirken ($P < 0.05$), ekstraksiyon süresinin kuadratik etkisi (X_2^2) ile sıcaklığın kuadratik etkisinin (X_3^2) istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir etkisi tespit edilememiştir ($P > 0.05$) (Çizelge 3).

Çizelge 2. Fenolik bileşik ekstraksiyonuna ait deneysel tasarım ve elde edilen TFM, TFL ve DPPH değerleri

Table 2. Experimental design of phenolic compound extraction and obtained TPC, TFC and DPPH values

No	MeOH (%) (X ₁)	Süre (dk.) (X ₂)	Sıcaklık (°C) (X ₃)	TFM (mg GAE/g kuru örnek)	TFL (mg KE/g kuru örnek)	DPPH (mg TE/g kuru örnek)
1	50	62.5	50	41.83 (±1.02)	26.11 (±0.38)	48.64 (±0.79)
2	0	120	50	30.11 (±1.02)	23.07 (±0.23)	30.37 (±0.98)
3	50	62.5	50	40.10 (±2.17)	28.96 (±1.33)	50.86 (±1.61)
4	100	62.5	70	28.43 (±0.47)	22.57 (±1.21)	31.57 (±2.74)
5	50	5	70	46.11 (±0.96)	31.27 (±0.48)	53.71 (±1.01)
6	0	62.5	30	30.88 (±1.07)	22.68 (±0.53)	28.36 (±2.15)
7	100	5	50	18.53 (±0.51)	15.58 (±0.45)	24.07 (±2.20)
8	50	120	30	41.77 (±1.29)	29.18 (±1.07)	51.64 (±0.64)
9	100	62.5	30	17.58 (±0.84)	14.72 (±0.30)	23.47 (±2.48)
10	50	5	30	39.47 (±0.53)	27.33 (±0.24)	51.31 (±1.28)
11	0	5	50	33.86 (±1.46)	24.66 (±0.87)	34.54 (±0.97)
12	100	120	50	28.87 (±0.37)	24.86 (±0.80)	33.01 (±0.61)
13	50	120	70	44.40 (±1.91)	29.79 (±1.43)	51.64 (±0.86)
14	50	62.5	50	42.32 (±0.22)	28.77 (±0.27)	50.92 (±0.65)
15	0	62.5	70	31.91 (±0.41)	23.24 (±0.36)	34.06 (±0.66)
16	50	62.5	50	42.50 (±0.81)	28.99 (±0.37)	51.34 (±0.75)
17	50	62.5	50	41.69 (±0.90)	28.04 (±0.78)	50.41 (±0.42)

Çizelge 3. TFM, TFL ve DPPH değerleri için lineer, kuadratik ve interaksiyon terimlerinin etkisini gösteren ANOVA tablosu

Table 3. ANOVA table showing the effect of linear, quadratic and interaction terms for TPC, TFC and DPPH values

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı			Kareler Ortalaması		
		TFM	TFL	DPPH	TFM	TFL	DPPH
Model	9	1201.49	338.07	2026.54	133.50	37.56	225.17
X ₁	1	139.15	31.70	28.92	139.15	31.70	28.92
X ₂	1	6.46	8.13	1.15	6.46	8.13	1.15
X ₃	1	55.97	21.00	32.80	55.97	21.00	32.80
X ₁ X ₂	1	49.63	29.50	42.97	49.63	29.50	42.97
X ₁ X ₃	1	24.13	13.28	1.44	24.13	13.28	1.44
X ₂ X ₃	1	4.01	2.76	1.44	4.01	2.76	1.44
X ₁ ²	1	921.09	228.20	1914.45	921.09	228.20	1914.45
X ₂ ²	1	3.77	6.36	8.10	3.77	6.36	8.10
X ₃ ²	1	0.39	0.00032	0.27	0.39	0.00032	0.27
Kalıntı	7	8.94	14.71	26.03	1.28	2.10	3.72
Model Uygunsuzluğu	3	5.34	8.78	21.57	1.78	2.93	7.19
Saf Hata	4	3.60	5.93	4.46	0.90	1.48	1.11
Toplam	16	1210.42	352.78	2052.57			

Çizelge 3. Devam

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	F Değeri			P-Değeri		
		TFM	TFL	DPPH	TFM	TFL	DPPH
Model	9	104.57	17.88	60.56	< 0.0001	0.0005	< 0.0001
X ₁	1	108.99	15.09	7.78	< 0.0001	0.0060	0.0270
X ₂	1	5.06	3.87	0.31	0.0592	0.0899	0.5958
X ₃	1	43.84	10.00	8.82	0.0003	0.0159	0.0208
X ₁ X ₂	1	38.87	14.04	11.56	0.0004	0.0072	0.0114
X ₁ X ₃	1	18.90	6.32	0.39	0.0034	0.0402	0.5534
X ₂ X ₃	1	3.14	1.32	0.39	0.1195	0.2891	0.5534
X ₁ ²	1	721.48	108.61	514.93	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
X ₂ ²	1	2.95	3.03	2.18	0.1295	0.1255	0.1835
X ₃ ²	1	0.30	0.00015	0.073	0.5990	0.9905	0.7945
Kalıntı	7						
Model							
Uygunsuzluğu	3	1.98	1.97	6.45	0.2596	0.2601	0.0518
Saf Hata	4						
Toplam	16						

TFM, TFL ve DPPH için oluşturulan modelin, regresyon katsayısı (R²), düzeltilmiş regresyon katsayısı (Adj-R²) 1 değerine oldukça yakındır. Bu durum tahmin edilen değerler ve gerçek değerler arasında mükemmel bir korelasyon olduğunun göstergesidir. Ayrıca elde edilen düşük varyasyon katsayısı (CV) değerleri, deneysel sonuçların

kesinliğini ve güvenilirliğini göstermektedir. Çizelge 3 ve Çizelge 4'te belirtilen sonuçlar doğrultusunda önerilen modellerin, *P. cognatum* bitkisinden fenolik bileşik ekstraksiyonunun optimizasyonu için uygun olduğu anlaşılmaktadır.

Çizelge 4. TFM, TFL ve DPPH değerleri için elde edilen istatistiksel parametreler

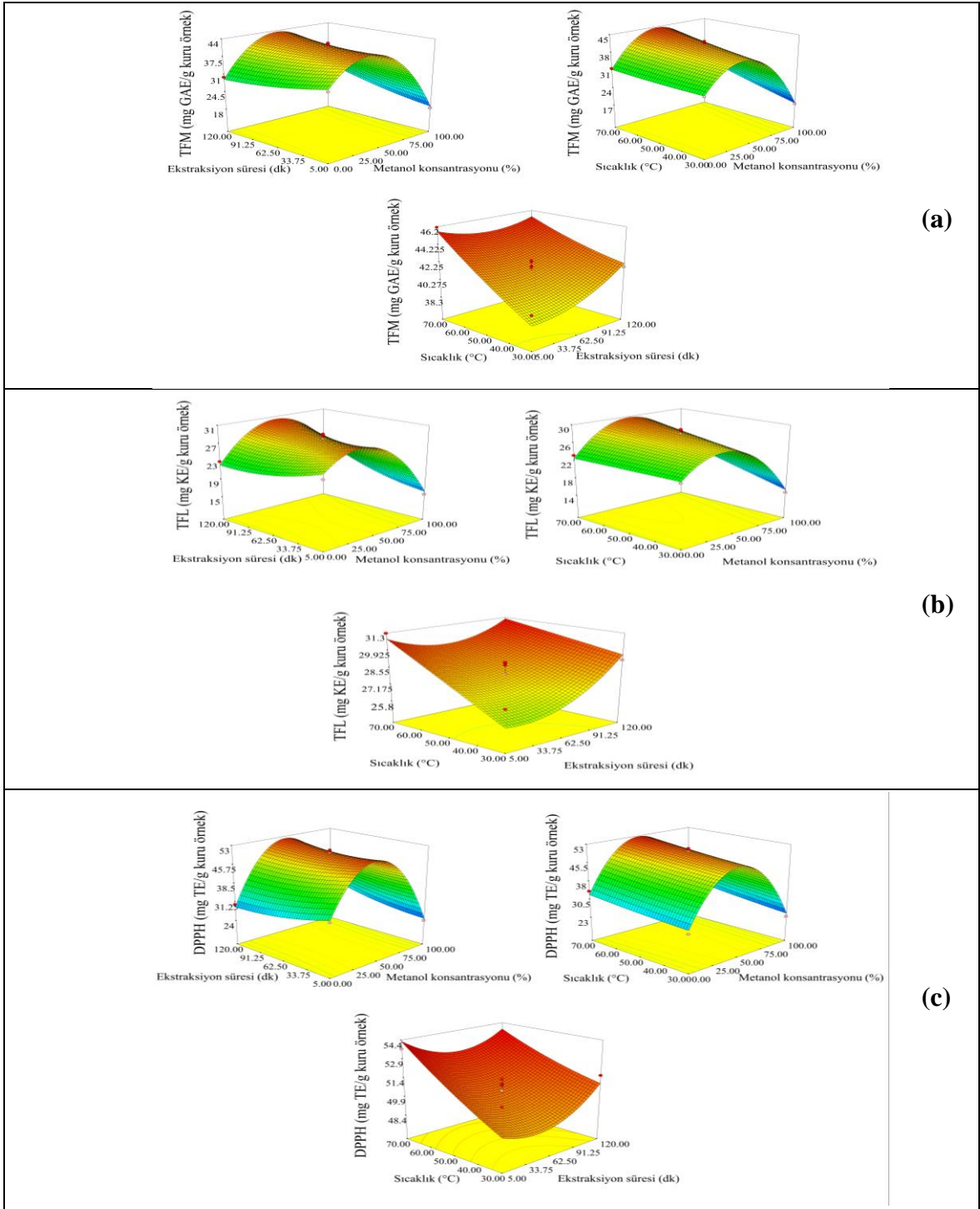
Table 4. Statistical parameters obtained for TPC, TFC and DPPH values

Parametre	TFM	TFL	DPPH
R ²	0.9926	0.9583	0.9873
Adj- R ²	0.9831	0.9047	0.9710
Yeterli Tahminleme	32.030	14.231	19.936
PRESS	91.02	149.69	352.05
C.V (%)	3.20	5.73	4.68

Şekil 1'de *P. cognatum* bitkisinden elde edilen ekstraktların TFM, TFL ve DPPH değerlerine metanol konsantrasyonu, ekstraksiyon süresi ve sıcaklığın etkisini gösteren 3D yanıt-yüzey grafikleri gösterilmiştir.

Sabit sıcaklıkta (ekstraksiyon sıcaklığı için orta nokta: 50 °C sıcaklık) süre ve metanol konsantrasyonu değişiminin TFM, TFL ve DPPH üzerine etkisi incelendiğinde, metanol konsantrasyonunda ki artışın TFM, TFL ve DPPH değerlerini arttırdığı ama belli bir

aşamadan sonra ise azalma meydana geldiği tespit edilmiştir. Sabit ekstraksiyon süresinde (ekstraksiyon süresi: 62.5 dk.) sıcaklık ve metanol konsantrasyonu değişiminin TFM, TFL ve DPPH üzerine etkisi de sabit sıcaklıkta olan değişime benzer şekildedir. Sabit çözücü konsantrasyonunda (metanol konsantrasyonu için orta nokta: %50 metanol konsantrasyonu) sıcaklık ve ekstraksiyon süresi değişiminin TFM, TFL ve DPPH üzerine etkisi incelendiğinde ise sıcaklık ve metanol konsantrasyonunda ki artışın TFM, TFL ve DPPH değerlerini arttırdığı tespit edilmiştir.

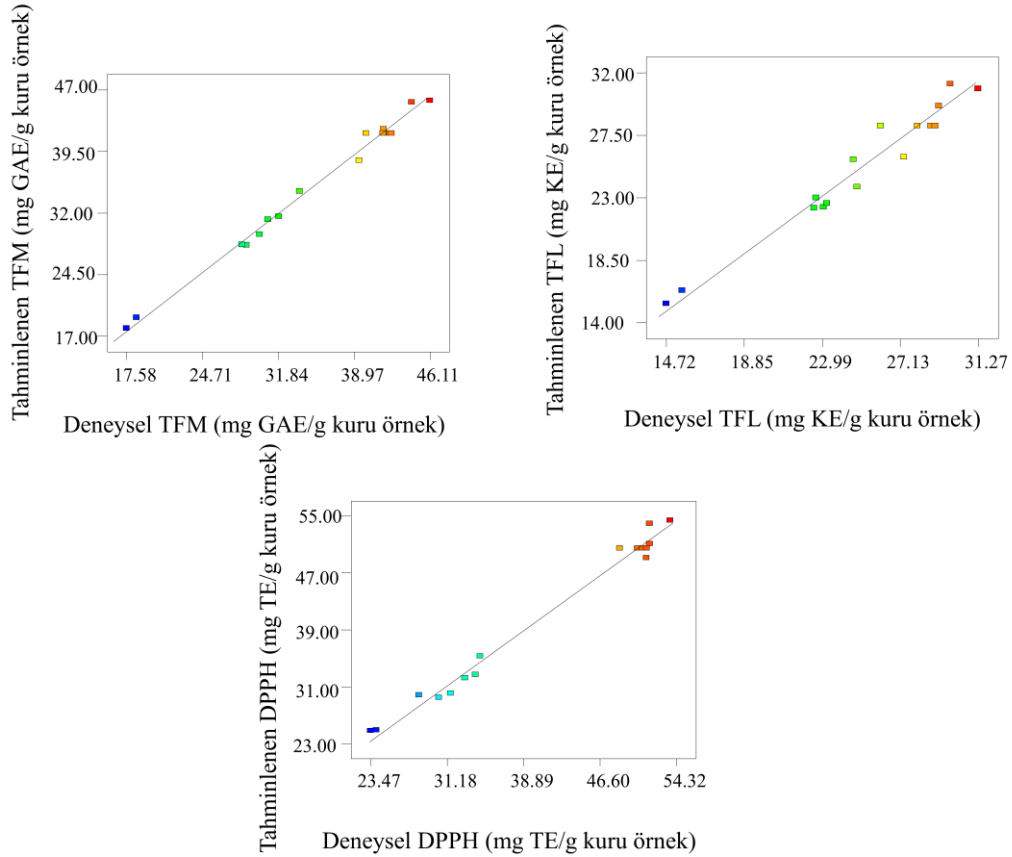


Şekil 1. *P. cognatum* bitkisinden fenolik ekstraksiyonu sonucu elde edilen TFM (a), TFL (b) ve DPPH (c) değerlerine ekstraksiyon parametrelerinin etkisini gösteren yanıt yüzey grafikleri

Figure 1. Response surface graphs showing the effect of extraction parameters on TPC (a), TFC (b) and DPPH (c) values obtained as a result of phenolic extraction from *P. cognatum* plant

Şekil 2’de ise TFM, TFL ve DPPH değerleri için deneysel verilerden elde edilen veriler ile program tarafından oluşturulan polinomial modellerden tahminlenen veriler kıyaslanmıştır. Elde edilen grafikler değerlendirildiğinde tahminlenen veriler

ile deneysel verilerin 45° doğrusu üzerinde toplanma eğiliminde olduğu belirlenmiştir. Bu durum oluşturulan modellerin uygunluğunu desteklemektedir.



Şekil 2. TFM, TFL ve DPPH değerleri açısından deneysel veriler ile tahminlenen veriler arasındaki ilişki
Figure 2. Relationship between experimental data and predicted data in terms of TPC, TFC and DPPH values

P. cognatum bitkisinden ekstraksiyon işlemi ile yüksek miktarda TFM, TFL değeri ve DPPH aktivitesi elde edilmesi için yapılan optimizasyon çalışmasında program tarafından tahmin edilen optimum koşullar tespit edilmiştir. Program tarafından “desirability” fonksiyonu yaklaşımına göre optimum noktayı belirleyen ve birbirine oldukça yakın olan 10 adet çözüm noktası tespit edilmiştir. Önerilen bu çözümlerden programın seçtiği %40.15 metanol konsantrasyonu, 5.00 dk., 70.00 °C sıcaklık ekstraksiyon için optimum işlem koşulları olarak belirlenmiştir (Çizelge 5).

Literatürde, *Salvia officinalis* L. bitkisinden klasik çözücü ekstraksiyon yöntemiyle fenolik bileşik ekstraksiyonu için optimum ekstraksiyon koşulları; %60 etanol konsantrasyonu, 53.93 °C sıcaklık, 84.84 dk. ekstraksiyon süresi olarak tespit edilmiştir (Yağcıoğlu, 2015). Yeşil çay fabrika atıklarından fenolik bileşik ekstraksiyonu için optimum koşullar ise %62.63 etanol konsantrasyonu, 51.51 °C sıcaklık, 39.34 dk. olarak belirlenmiştir (Bostancı, 2016). *Psidium myrtoides* meyvesinden fenolik bileşik ekstraksiyonu için optimum koşullar %40 etanol

konsantrasyonu, 50 °C sıcaklık, 30 dk. olarak (Freitas, 2021), portakal yapraklarından fenolik bileşik ekstraksiyonu için optimum işlem koşulları

ise %90 metanol konsantrasyonu, 60 °C sıcaklık, 180 dk. olarak belirlenmiştir (Uysal vd., 2018).

Çizelge 5. Optimizasyon koşulları ve optimum koşullarda elde edilen ekstraktın TFM, TFL ve DPPH sonuçları

Table 5. Optimization conditions and TPC, TFC and DPPH results of the extract obtained under optimum conditions

Optimum Koşullar		
Metanol konsantrasyonu (%)	Ekstraksiyon süresi (dk.)	Sıcaklık (°C)
40.15	5.00	70.00
Optimum Koşullarda Program Tarafından Tahminlenen Değerler		
TFM (mg GAE/g kuru örnek)	TFL (mg KE/g kuru örnek)	DPPH (mg TE/g kuru örnek)
46.14	31.12	54.39
Optimum Koşullarda Deneysel Verilerden Elde Edilen Değerler		
TFM (mg GAE/g kuru örnek)	TFL (mg KE/g kuru örnek)	DPPH (mg TE/g kuru örnek)
45.40±0.79	30.36±0.81	53.40±0.63

P. cognatum bitkisinden fenolik bileşik ekstraksiyonunda (%40.15 metanol konsantrasyonu, 5.00 dk., 70.00 °C sıcaklık) TFM, TFL ve DPPH değerleri sırası ile 46.14 mg GAE/g kuru örnek, 31.12 mg KE/g kuru örnek, 54.39 mg TE/g kuru örnek olarak tahminlenmiştir. TFM, TFL ve DPPH değerleri için üç tekrarlı optimum nokta doğrulama denemeleri gerçekleştirilmiştir. Bu denemeler neticesinde değerler sırası ile 45.40 mg GAE/g kuru örnek, 30.36 mg KE/g kuru örnek, 53.40 mg TE/g kuru örnek olarak tespit edilmiştir. Elde edilen deneysel veriler ile tahminlenen veriler arasında tek örnek t-testi gerçekleştirilmiş ve değerler arasında istatistiksel olarak bir fark bulunmadığı belirlenmiştir ($P > 0.05$).

SONUÇ

Bitkisel materyallerden fenolik bileşiklerin ekstrakte edilmesi sürecinde, ekstraksiyon etkinliğini etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Bu faktörlerin belirlenmesinde ve ekstraksiyon işlemi için uygun deneysel tasarımın oluşturulmasında yanıt-yüzey yöntemi etkin bir şekilde kullanılabilir. Bu çalışma ile *P. cognatum* bitkisinden fenolik bileşik ekstraksiyonu üzerine metanol konsantrasyonu, ekstraksiyon süresi ve sıcaklığın etkisi belirlenmiş, bu parametrelerin en yüksek TFM, TFL ve DPPH değerlerinin elde edildiği noktada optimizasyonu sağlanmıştır. Optimizasyon çalışmalarının sonunda *P. cognatum* bitkisinden fenolik bileşik

ekstraksiyonu için %40.15 metanol konsantrasyonu, 5.00 dk., 70.00 °C optimum koşullar olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde *P. cognatum* bitkisinin yüksek miktarda fenolik bileşik ihtiva ettiği ve antioksidan aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Ekstraksiyon işlemleri neticesinde elde edilecek *P. cognatum* ekstraktının sahip olduğu biyoaktiviteden dolayı gıdalarda kullanım potansiyelinin bulunabileceği belirlenmiştir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Yazarlar, bu araştırma makalesi ile ilgili olarak başka kişiler ve/veya kurumlar arasında çıkar çatışması olmadığını beyan etmektedir.

YAZAR KATKILARI

Mustafa BAYRAM çalışma konusunun belirlenmesinde, deney tasarımının oluşturulmasında, verilerin değerlendirilmesinde ve makale taslağının oluşturulmasında, kontrolünde katkı sağlamıştır. Semra TOPUZ deney tasarımının oluşturulmasında, analizlerin planlanması ile gerçekleştirilmesinde ve makale metninin oluşturulmasında görev almıştır.

KAYNAKLAR

Blasi, F., Urbani, E., Simonetti, M.S., Chiesi, C., Cossignani, L. (2016). Seasonal variations in antioxidant compounds of *Olea europaea* leaves

- collected from different Italian cultivars. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 89: 202-207.
- Bostancı, Ş. (2016). Yeşil çay fabrika atıklarından farklı yöntemlerle antioksidan bileşiklerin ekstraksiyonu. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim, Dalı Doktora Tezi, Samsun, Türkiye, 184 s.
- Çoklar, H., Akbulut, M. (2016). Alıç (*Crataegus orientalis*) meyvesinin antioksidan aktivitesi ve fenolik bileşiklerinin ekstraksiyonu üzerine farklı çözümlerin etkisi. *Derim* 33(2): 237-248.
- Demirgöl, F., Divriklioğlu-Kundak, M., Sağdıç, O. (2022). Bioactive properties, antibacterial activity, and color features of *Polygonum cognatum*: The effects of frozen storage and cooking process. *Food Science and Technology*, 42.
- Freitas, T.S.M., de Rodrigues, G.M., Fakhouri, F.M., da Silva, C., Cardoso, C.A.L., Velasco, J.I., Filgueiras, C.T., dos Santos Garcia, V.A. (2021). Application of the Box-Behnken experimental design for the extraction of phenolic compounds from araçá-roxo (*Psidium myrtilloides*). *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(3): e15260.
- Gaafar, A.A., Salama, Z.A. (2013). Phenolic compounds from artichoke (*Cynara scolymus* L.) by-products and their antimicrobial activities. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, 3(12): 1-6.
- Koca, İ., Lüle, F., Koyuncu, T. (2018). Effect of microwave and hot-air drying techniques on the color properties and specific energy requirement of madımak plants (*Polygonum cognatum* Meissn.). *Journal of Biological and Environmental Sciences*, 12(36): 123-132.
- Marangoz, N. (2020). Türkiye'nin farklı bölgelerinden temin edilen madımak örneklerinin bazı biyoaktif özelliklerinin belirlenmesi. Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, Türkiye, 56 s.
- Murathan, Z.T. (2018). Kuzeydoğu Anadolu Bölgesi ekolojik koşullarında yetişen bazı tıbbi bitkilerin biyokimyasal içeriği ve antioksidan özelliklerinin belirlenmesi. *Balikesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 20(2): 51-60.
- Onay, E. (2019). Diyabetik ratlarda madımak (*Polygonum cognatum* Meissn.) etanol ekstraktının bazı biyokimyasal parametreler ve histopatolojik değişimler üzerine etkisi. Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veterinerlik Biyokimyası Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Erzurum, Türkiye, 108 s.
- Önen, H., Altuntaş, E., Özgöz, E., Bayram, M., Özcan, S. (2014). Moisture effect on physical properties of knotweed (*Polygonum cognatum* Meissn.) seeds. *Gaziösmenpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 31(2): 15-24.
- Pehlivan, M., Çöven, H.İ.K., Cerci, B., Eldem, A., Öz, T., Savlak, N., Soyöz, M., Pirim, İ. (2021). The cytotoxic effect of *Polygonum cognatum* and chemotherapeutic effect of doxorubicin on glioblastoma cells. *European Journal of Therapeutics*, 27(1): 50-54.
- Pekdemir, S., Çiftci, M., Karatepe, M. (2020). Elazığ'da yetişen *Polygonum cognatum* Meissn (madımak) bitki ekstraktlarının in vitro biyolojik aktiviteleri ve bazı fitokimyasal bileşenlerinin belirlenmesi. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 18: 368-378.
- Putnik, P., Barba, F. J., Španić, I., Zorić, Z., Dragović-Uzelac, V., Kovačević, D.B. (2017). Green extraction approach for the recovery of polyphenols from Croatian olive leaves (*Olea europaea*). *Food and Bioproducts and Processing*, 106: 19-28.
- Saraç, H., Daştan, T., Demirbaş, A., Daştan, S.D., Karaköy, T., Durukan, H. (2018). Madımak (*Polygonum cognatum* Meissn.) bitki özütlerinin besin elementleri ve in vitro antikanserojen aktiviteleri yönünden değerlendirilmesi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 340-347.
- Sefaoğlu, F. (2021). Halk ilacı çiriş (*Asphodelus aestivus*). *Doğanın İnsanlığa Sunduğu Tıbbi Bitkiler*, Gül, V. (Ed.), İksad Yayınevi, Ankara, Türkiye, s. 81-101.
- Şahin, S. (2011). Zeytin ağacı yapraklarından süperkritik-CO₂ ile ekstrakt eldesi ve bileşimindeki oleuropein miktarının incelenmesi.

İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Doktora Tezi, İstanbul, Türkiye, 212 s.

Uysal, S., Cvetanović, A., Zengin, G., Đurović, S., Zeković, Z., Aktumsek, A. (2018). Effects of orange leaves extraction conditions on antioxidant and phenolic content: Optimization using response surface methodology. *Analytical Letters*, 51(10): 1505-1519.

Yağcıoğlu, P. (2015). Farklı ekstraksiyon metotları ile adaçayı (*Salvia officinalis* L.) bitkisinden

antioksidan ekstraksiyonunun optimizasyonu. İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, Türkiye, 121 s.

Yılar, M. (2007). *Polygonum cognatum* Meissn. (madımdak)'in allelopatik potansiyelinin belirlenmesi. Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Tokat, Türkiye, 87 s.