

## DERİN ÖTEKTİK ÇÖZÜCÜNÜN *Rheum ribes* KÖKLERİNDEN FENOLİK BİLEŞİK EKSTRAKSİYONU ÜZERİNE ETKİSİ

**Naciye Kutlu Kantar\***

Bayburt Üniversitesi, Gıda İşleme Bölümü, Aydıntepe, Bayburt, Türkiye

Geliş/ Received: 03.11.2022; Kabul/ Accepted: 23.01.2023 Online baskı/ Published online: 02.02.2023

Kutlu Kantar, N. (2023). Derin ötektik çözücünün *Rheum ribes* köklerinden fenolik bileşik ekstraksiyonu üzerine etkisi. GIDA (2023) 48 (1) 199-208 doi: 10.15237/ gida.GD22107

Kutlu Kantar, N. (2023). Impact of deep eutectic solvent on phenolic compound extraction from *Rheum ribes* roots. GIDA (2023) 48 (1) 199-208 doi: 10.15237/ gida.GD22107

### ÖZ

Bu çalışmada ışkın bitkisi (*Rheum ribes*) köklerinden biyoaktif bileşik eldesinde farklı çözücü tipleri değerlendirilmiştir. Yeşil çözücü olarak kolin klorür ve laktik asit ile hazırlanan farklı molar oranda (1:1, 1:2, 1:3) derin ötektik çözücüler ve su kullanılmıştır. Toplam fenolik bileşik miktarı derin ötektik çözücü ile etanol ekstraktına benzer olarak yüksek bulunmuştur. Toplam flavonoid bileşik ekstraksiyonunda en yüksek değer etanol ile elde edilirken ikinci sırada derin ötektik çözücü gelmektedir. Antioksidan aktivite üzerine ise en etkili çözücünün derin ötektik çözücü (1:3) olduğu saptanmıştır. Ek olarak temel bileşen analizi ile farklı çözücüler kullanılarak hazırlanan ışkın ekstraktlarının biyoaktif içerik (toplam fenolik, toplam flavonoid bileşik, antioksidan aktivite) açısından benzerlik/farklılıkları değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, ışkından biyoaktif bileşik ekstraksiyonunda organik çözücülere alternatif olarak derin ötektik çözücünün kullanımı uygun bulunmuştur.

**Anahtar kelimeler:** ışkın, ultrasonik ekstraksiyon, yeşil çözücü, temel bileşen analizi

## IMPACT OF DEEP EUTECTIC SOLVENT ON PHENOLIC COMPOUND EXTRACTION FROM *Rheum ribes* ROOTS

### ABSTRACT

In this study, different solvent types were evaluated in obtaining bioactive compounds from rhubarb (*Rheum ribes*) roots. Deep eutectic solvents prepared with choline chloride and lactic acid in different molar ratios (1:1, 1:2, 1:3) and water were used, as green solvents. The total phenolic compounds were found to be high with deep eutectic solvent similar to the ethanol extract. The highest value is obtained with ethanol for total flavonoid compound extraction, while deep eutectic solvent comes second. For the antioxidant activity, it was determined that the most effective solvent was the deep eutectic solvent (1:3). In addition, the similarities/differences in terms of bioactive compounds (total phenolic, total flavonoid compound, antioxidant activity) of rhubarb extracts prepared using different solvents were evaluated with principal component analysis. As a result, the use of deep eutectic solvent was found to be appropriate as an alternative to organic solvents in bioactive compound extraction from rhubarb.

**Keywords:** Rhubarb, ultrasonic extraction, green solvent, principal component analysis

\* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author

✉: naciye.kutlu@bayburt.edu.tr

☎: (+90) 458 311 4426

☎: (+90) 458 311 4466

Naciye Kutlu; ORCID no: 0000-0002-4075-8823

## GİRİŞ

Geleneksel olarak ışkın ya da ışgın adları ile bilinen *Rheum ribes* bitkisi dağlık bölgelerde yetişmektedir. Bu bitkinin Türkiye, İran, Lübnan başta olmak üzere Rusya, Afganistan, Pakistan gibi ülkelerde yetiştirildiği bilinmektedir (Alaadin vd., 2007). Türkiye’de özellikle Doğu Anadolu Bölgesi’nde yetiştirilen bir bitkidir. Buruk ve ekşi tada sahip olan ışkın bitkisinin kökleri, kabuk kısmı soyularak tüketilebilmektedir. Çiğ olarak tüketilebildiği gibi kavurma, salata ya da çorba yapımında da sıklıkla kullanılmaktadır (Inaltong, 2015; Apuhan ve Beyazkaya, 2019). Işkın farmasötik özellikte bir bitki olup, antimikrobiyal, antihiperlisemi ve antioksidan aktivite gösterdiği yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir (Farzami Sepehr ve Ghorbanli, 2002; Akkuş, 2018; Keser vd., 2020). Ayrıca ışkın bitkisi A, C ve E vitamini bakımından zengin olup selenyum düzeyi beslenme açısından yeterli orandadır (Munzuroğlu vd., 2000).

Yeşil ve sürdürülebilir teknolojiler yoluyla bitkisel matrislerden doğal bileşiklerin geri kazanılması literatürde geniş çapta araştırılmış olup geleneksel ekstraksiyon yöntemlerine kıyasla (sokselet, maserasyon, perkolasyon vb.) birçok avantaja sahiptirler (Reina vd., 2023). Örneğin, yeşil ekstraksiyon teknikleri kullanılarak, yüksek tekrar üretilebilirlik, düşük çözücü tüketimi, yüksek son ürün saflığı ve düşük enerji tüketimi sağlanabilir (Chemat vd., 2020). Ultrasonik destekli ekstraksiyon yönteminde ultrasonik banyo kullanılabilirdiğinden kullanımı hem basit hem de az maliyetlidir (Garcia-Salas vd., 2010). Bu yöntemin prensibi ultrasonların (20 kHz-100 MHz frekans) materyalden geçişine bağlı, sıkıştırma ve genişleme döngülerinin neden olduğu kavitasyon sürecine dayanmaktadır. Kavitasyon kabarcıklarının patlaması, parçacıklar arası çarpışmalara neden olur, bu da hücrelerin bozulmasına ve ekstrakte edilebilir bileşiklerin çözücüye daha fazla difüzyonuna neden olmaktadır (Panzella vd., 2020).

Çözücü seçimi ekstraksiyon prosedüründe önemli bir basamaktır (Stalikas, 2007). Bu amaçla ekstraksiyon işlemlerinde, fenolik bileşik veriminde olumlu etki gösteren, fakat göreceli olarak uzun süre, yüksek maliyet, düşük kaynama

noktası, tutuşabilirlik, toksisite ve biyolojik olarak parçalanmama gibi birçok dezavantaja sahip olan organik çözücüler (metanol, etanol, hekzan vb.) kullanılmaktadır (Welton, 2015). Yeşil çözücülerin başında gelen su, sadece polar ve hidrofilik bileşikler için etkili bir ekstraksiyon çözücüsüdür (Zainal-Abidin vd., 2017). Bu nedenle, organik çözücülerle aynı mükemmel ekstraksiyon özelliklerini sergileyen ancak düşük maliyetli ve minimum çevresel etkiye sahip yeşil çözücülere yönelik yüksek bir talep sonucunda derin ötektik çözücüler geliştirilmiştir (Tang vd., 2015; Ruesgas-Ramón vd., 2017). Derin ötektik çözücüler, uygun bir sıcaklıkta bir hidrojen bağı alıcısı (HBA) ve bir hidrojen bağı donörü (HBD) karıştırılarak hazırlanırlar (Abbot vd., 2003). Yaygın organik çözücülerle karşılaştırıldığında derin ötektik çözücüler, düşük fiyat, kolay hazırlama ve kolay bulunabilirlik gibi birçok avantaja sahiptirler. Ayrıca çoğu biyolojik olarak parçalanabilir ve çok düşük toksisiteye sahiptir (Radošević vd., 2015).

Bu çalışmada yeşil çözücü ve yeşil ekstraksiyon yönteminin kullanımı amaçlanmıştır. Işkın bitkisinin ekstraksiyonu sırasında derin ötektik çözücü kullanımı üzerine bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Bu amaçla, ultrasonik destekli ekstraksiyon uygulamasında 3 farklı molar oranda derin ötektik çözücü kullanılmış ve su, etanol, metanol ve hekzan kullanılarak karşılaştırma yapılmıştır. Temel bileşen analizi ile farklı çözücüler kullanılarak hazırlanan ışkın ekstraktlarının fitokimyasal içerik (toplam fenolik bileşik, toplam flavonoid bileşik, antioksidan aktivite) açısından benzerlik/farklılıkları değerlendirilmiştir.

## MATERYAL VE YÖNTEM

### Materyal

Işkın bitkisi Bayburt ilinde yerel üreticilerden temin edilmiştir. Analizlerden önce ışkın kökleri soyulmuş, 1.5 cm boyutunda dilimlenerek, 65 °C’de kurutucu (Nüve, FN500, Türkiye) yardımıyla kurutulmuştur. Kurutulmuş ürünler öğütücüden (Aromatic, Fakir Hausgeräte, Almanya) geçirildikten sonra, ekstraksiyon işlemi için buzdolabında +4 °C sıcaklıkta saklanmıştır.

Çalışmada kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıktadır.

### Yöntem

#### Derin ötektik çözücülerin hazırlanması

Çalışmada hidrojen bağ alıcısı (HBA) olarak kuarterner amonyum tuzu olan kolin klorür, hidrojen bağ donörü (HBD) olarak ise laktik asit kullanılarak farklı molar oranlarda (1:1, 1:2, 1:3) hazırlanmıştır. Derin ötektik çözücüler oluşturulduktan sonra, yüksek viskozite olumsuzluğunu bertaraf etmek adına tüm çözücülere kütlece %50 oranında saf su ilave edilmiştir. Karışım daha sonra homojen renksiz bir sıvı elde edilene kadar çalkalamalı inkübatör (Heidolph, Unimax 1010, Almanya) kullanılarak 30 °C ve 180 rpm'de karıştırılmış ve ardından reaksiyona girmemiş serbest asitleri uzaklaştırmak amacıyla, 80 °C'de 12 saat bekletilmiştir (Xu vd., 2016).

#### Ultrasonik destekli ekstraksiyon

Ekstraktlar, ultrasonik destekli ekstraksiyon yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır. Çözücü olarak 3 farklı derin ötektik çözücü, karşılaştırma yapmak amacıyla da saf su, etanol:saf su (%50 v/v), metanol:saf su (%50 v/v), ve hekzan:saf su (%50 v/v) kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan çözücüler Çizelge 1'de sunulmuştur. Katı/çözücü oranı 1/10 g/mL olacak şekilde örnekler hazırlanmıştır. Ekstraksiyon işlemi ultrasonik banyo (Kudos, SK2210HP, Hindistan) kullanılarak %100 güçte 60 dakika boyunca uygulanmıştır. Ekstraksiyon sonunda örnekler 30 dakika boyunca 2282×g hızında santrifüj (Hermle, 326K, Almanya) işlemine tabi tutulmuşlardır. Süpernatantlar toplanmış ve analizler öncesinde koyu renkli cam şişeler içerisinde buzdolabında +4 °C sıcaklıkta bekletilmişlerdir.

Çizelge 1. Çalışmada kullanılan çözücüler ve özellikleri

Table 1. Solvents used in the study and their properties

Çözücü <i>Solvent</i>	Özellik <i>Property</i>
DES 1	Kolin klorür:Laktik asit (molar oran 1:1)+%50 saf su
DES 2	Kolin klorür:Laktik asit (molar oran 1:2)+%50 saf su
DES 3	Kolin klorür:Laktik asit (molar oran 1:3)+%50 saf su
Su	Saf su
Etanol	%50 saf su karışımı (v/v)
Metanol	%50 saf su karışımı (v/v)
Hekzan	%50 saf su karışımı (v/v)

#### Toplam fenolik bileşik (TFB)

Toplam fenolik bileşik miktarı belirlenirken McDonald vd. (2001) tarafından önerilen yöntem modifiye edilerek uygulanmıştır. 5 mL Folin-Ciocalteu reaktifi:saf su (1:10 v/v), 4 mL %7.5'lük (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>:saf su w/v) sodyum karbonat ve 1 mL 2 kat seyreltilmiş ekstrakt karıştırılmıştır. Karanlıkta ve oda sıcaklığında 60 dakikalık inkübasyonun ardından 750 nm dalga boyunda spektrofotometre ile (Shimadzu, UV-1201V, Japonya) absorbans değerleri ölçülmüştür. Sonuçlar gallik asit eşdeğeri (GAE) (mg GAE/g kuru madde) olarak verilmiştir.

#### Toplam flavonoid bileşik (TFlaB)

Toplam flavonoid miktarı alüminyum klorür spektrometrik yöntem kullanılarak belirlenmiştir (Chandra vd., 2014). 2 mL seyreltilmiş ekstrakt üzerine 2 mL %2'lik (AlCl<sub>3</sub>:saf su w/v) alüminyum klorür eklenerek, oda sıcaklığında 15 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda 420 nm dalga boyunda spektrofotometre (Shimadzu, UV-1201V, Japonya) ile absorbansları belirlenmiştir. Sonuçlar kuarsetin eşdeğeri (QE) (mg QE/g kuru madde) olarak verilmiştir.

### **Antioksidan aktivite DPPH yöntemi**

Ekstraktların DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radikalini süpürücü etkisi, DPPH ile oluşturdukları rengin 515 nm dalga boyunda ölçümüne ve standart madde ile karşılaştırılması esasına dayanan ve Bao vd. (2005) tarafından tanımlanan yöntemin modifiye edilmiş hali ile belirlenmiştir (Zhou vd., 2009). Bu doğrultuda 100 µL seyreltilmiş ekstrakt üzerine 3.9 mL DPPH ( $6 \times 10^{-5}$  M) solüsyonu eklenmiş ve 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Sonuçlar troloks eşdeğeri (TE) (mg TE/g kuru madde) olarak verilmiştir.

### **CUPRAC yöntemi**

Hazırlanan ekstraktlardan 50 µL alınarak üzerine sırasıyla, 1 mL 10 mM  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  çözeltisi, 1 mL 7.5 mM Neocuproine çözeltisi ve 1 mL 1 M amonyum asetat (pH=7) çözeltisi eklenmiştir. Son hacim 4.1 mL olacak şekilde saf su ilave edilerek, 30 dakika süre ile karanlık ortamda bekletilen örneklerin absorbansları 450 nm dalga boyunda belirlenmiştir (Apak vd., 2004). Sonuçlar troloks eşdeğeri (TE) (mg TE/g kuru madde) olarak verilmiştir.

### **FRAP yöntemi**

Ekstraktların demir indirgeyici antioksidan aktivitelerini (FRAP) belirlemek için Benzie ve Strain (1996) tarafından uygulanan yöntem kullanılmıştır. Bu amaçla 900 µL taze olarak hazırlanan FRAP reaktifi (asetat tampon (pH 3.6), 10 mM TPTZ (2,4,6-Triphridyl-s-triazine) solüsyonu, 20 mM  $\text{FeCl}_3$ , 10:1:1 (v/v/v) oranında karıştırılarak hazırlanmıştır) üzerine 100 µL ekstrakt ilave edilerek, 4 dakika bekletilmiş ve ardından absorbans 593 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Sonuçlar troloks eşdeğeri (TE) (mg TE/g kuru madde) olarak verilmiştir.

### **Temel bileşen ve istatistiksel analiz**

Tüm ekstraktlara ait analiz sonuçları, tekrürlerin ortalaması  $\pm$  standart sapması olarak verilmiştir. Temel bileşen analizi (TBA) ve istatistiksel analizler MINITAB 17.1.1.0 paket programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Değerlendirme sonucu, istatistiksel açıdan önemli bulunan

değerler Tukey testi ile  $P \leq 0.05$  önem derecesine göre belirlenmiştir.

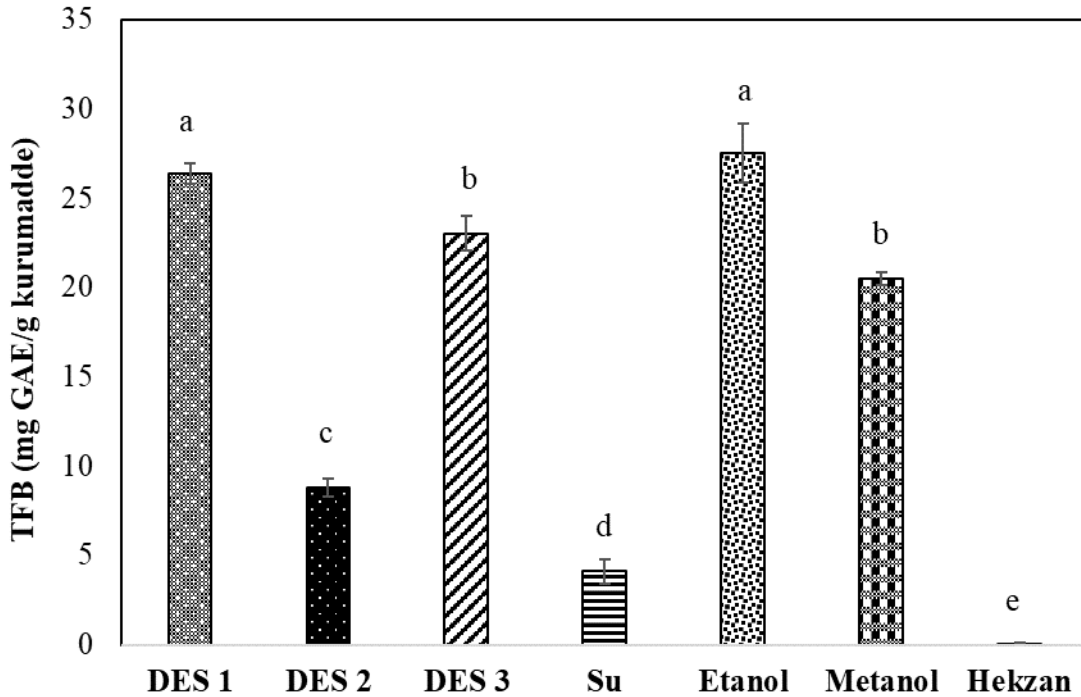
## **SONUÇLAR VE TARTIŞMA**

### **Çözücülerin toplam fenolik bileşik üzerine etkisi**

Farklı çözücülerin ışıktan toplam fenolik bileşik (TFB) ekstraksiyonuna etkisi Şekil 1'de sunulmuştur. Değerler incelendiğinde 1:1 molar oranda hazırlanan derin ötektik çözücü (DES 1), diğer molar oranda hazırlanan derin ötektik çözücülere göre istatistiksel olarak daha yüksek TFB verimi sağlanmıştır ( $P < 0.05$ ). Bu bulgu derin ötektik çözücülerin hazırlanması sırasında molar oranın ekstraksiyon üzerine etkili olduğunu göz önüne sermiştir. Molar oranı değişimi ile yoğunluk etkilenebilmekte ve ekstraksiyon verimliliğini değiştirebilmektedir (Cui vd., 2017). Su ve diğer organik çözücüler (etanol, metanol ve hekzan) ile karşılaştırıldıklarında, etanol ve DES 1 ile en yüksek miktarda TFB ekstrakte edilmiştir. Etanol ile 27.53, DES 1 ile 26.40 mg GAE/g kuru madde elde edilmiş olup bu iki çözücü arasında istatistiksel olarak fark yoktur ( $P > 0.05$ ). Bu durum uygun koşullarda hazırlanan derin ötektik çözücülerin etkinliğinin organik çözücüler kadar iyi olduğunun kanıtıdır. Metanol ve DES 3 ile ekstrakte edilebilen TFB miktarları sırasıyla 20.49 ve 23.04 mg GAE/g kuru madde olarak ikinci en yüksek grubu oluşturmaktadırlar. DES 2, su ve hekzan düşük verimler sağlamış ve TFB miktarları sırasıyla 8.81, 4.10 ve 0.07 mg GAE/g kuru madde olarak bulunmuştur. Yapılan çalışmalar incelendiğinde, Bayram vd. (2022) kantaron bitkisinden biyoaktif bileşik ekstraksiyonu sırasında 10 farklı derin ötektik çözücü kullanmıştır. Sonuçlar su, etanol ve metanol ekstraktları ile karşılaştırılmıştır. TFB için en yüksek verim, etanol ve metanol ekstraktlarında elde etmişler fakat bireysel fenolik bileşikler incelendiğinde, klorojenik asit, kumarik asit, kuersetin ve rutin gibi bileşiklerin derin ötektik çözücüler kullanımıyla daha yüksek miktarda ekstrakte edilebildiğini bildirmişlerdir. Diğer bir çalışmada Wojeicchowski vd. (2021) biberiye bitkisinden fitokimyasal ekstraksiyonunda derin ötektik çözücülerini kullanmışlardır. Sonuçta HBD olarak asetik asit, laktik asit, etilen glikol ve 1,2-propandiol kullanılan çözücülerde TFB miktarı

açısından maksimum verim elde edilmiştir. Ayrıca çalışmada derin ötektik hazırlanırken sulu (%30 eklenmiş) ve susuz çözücüler kullanılmış ve su eklenerek hazırlanan derin ötektik çözücü ile %68 daha fazla miktarda TFB ekstraksiyonu sağlandığı rapor edilmiştir. Ek olarak Bubalo vd. (2016), derin ötektik çözücüler kullanarak en iyi ekstraksiyon yöntemi belirleme üzerine bir

çalışma yapmışlar ve ultrasonik destekli ekstraksiyonun mikrodalga destekli ve geleneksel yöntemlere göre daha olumlu etki sağladığını belirtmişlerdir. Sonuç olarak bu çalışmada, ışık köklerinden TFB ekstraksiyonunda organik çözücülere alternatif olarak yeşil çözücünün kullanımı (DES 1) uygun bulunmuştur.



Şekil 1. Farklı çözücüler ile elde edilen ekstraktların toplam fenolik bileşik (TFB) miktarları  
 Figure 1. Total phenolic compound (TPC) amounts of extracts obtained with different solvents

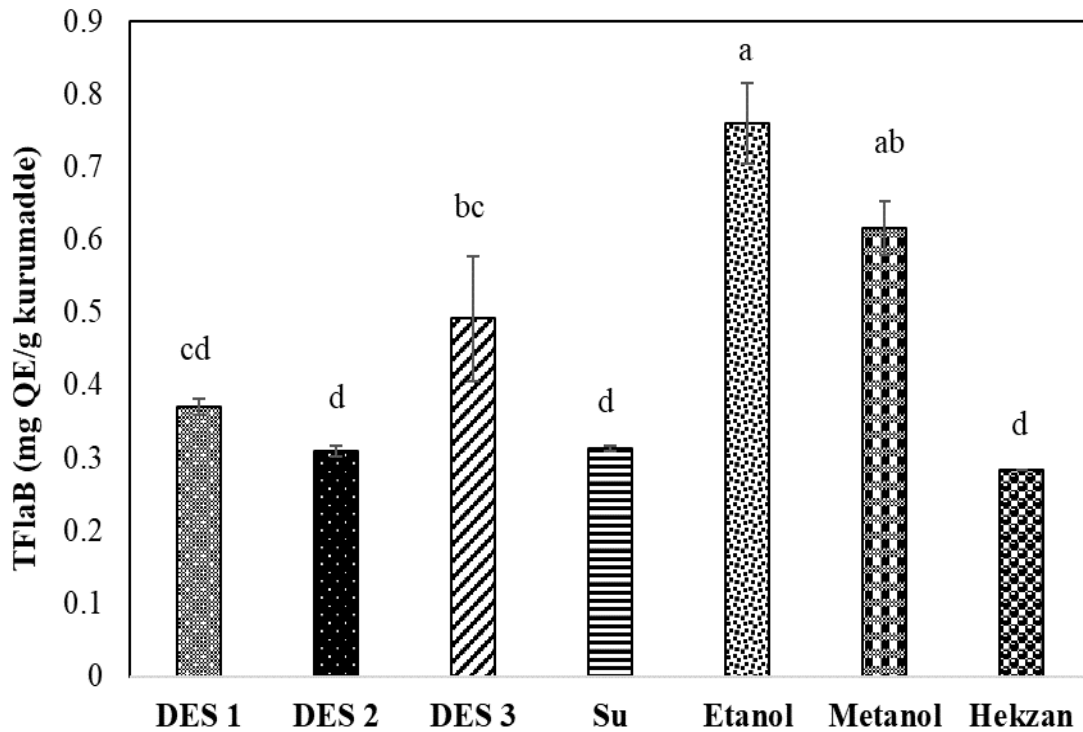
#### Çözücülerin toplam flavonoid bileşik üzerine etkisi

Farklı çözücülerin ışıkından toplam flavonoid bileşik (TFlaB) ekstraksiyonuna etkisi Şekil 2’de verilmiştir. TFlaB ekstraksiyonunda derin ötektik çözücülerin etkisi, TFB ekstraksiyonundaki gibi yüksek bulunmamıştır. En yüksek değer etanol ekstraktı ile 0.76 mg QE/g kuru madde olarak bulunmuştur. İkinci en yüksek değer metanol ekstraktında elde edilmiş olup (0.62 mg QE/g kuru madde), bu değer DES 3 ekstraktı (0.50 mg QE/g kuru madde) ile istatistiksel olarak benzer bulunmuştur ( $P > 0.05$ ). Derin ötektik çözücülerin molar oranının 1:3’den 1:2’ye düştüğünde TFlaB değerinde yaklaşık %37, 1:1’e

düştüğünde ise yaklaşık %25 oranında bir azalma görülmüştür. Molar oranın bu denli etkili olduğu başka çalışmalar da bulunmaktadır. Örneğin, Li vd. (2015), yeşil çay yapraklarından kateşin ekstrakte edebilmek için, bu çalışmada olduğu gibi farklı molar oranda (1:1, 1:2, 1:3, 1:4) kolın klorür:laktik asit ile oluşturulan derin ötektik çözücüler kullanmışlardır. Sonuçta molar oranın 1:1’den 1:2’ye çıkarıldığında ekstraksiyon veriminin arttığı ancak 1:2’den 1:4’e çıkarılmasıyla ekstraksiyon veriminin azaldığını rapor etmişlerdir. Bu durumun laktik asit oranına bağlı olarak viskozitenin değişmesi ve kütle transferini etkilemesinden kaynaklı olabileceği belirtilmiştir. Bu çalışmada DES 2, su ve hekzan ekstraktlarında

en düşük değerler elde edilmiş ve bu değerlerin istatistiksel olarak benzer olduğu saptanmıştır. TFlaB ekstraksiyonunda, derin ötektik çözücü başarısız gibi görünse de metanol kullanımı yerine DES 3'ün tercih edilebilirliği önerilmektedir. Bajkacz ve Adamek (2018) yaptıkları bir çalışmada, farklı HBD, HBA ve molar oranda 17 adet derin ötektik çözücü hazırlanmış ve 10 farklı materyalden (kızılcık, goji meyvesi, üzüm, erik, portakal kabuğu, soğan, brokoli, hardal, biberiye ve karabiber) flavonoid ekstraksiyonu gerçekleştirmişlerdir. En yüksek flavonoid ekstraksiyonu kolin klorür:laktik asit kombinasyonu ile elde edilmiştir. Fakat çalışmada

diğer organik çözücüler ile bir karşılaştırma yapılmamıştır. Zhao vd. (2015) flavonoid ekstraksiyonunda, alkol, asit veya amin bazlı derin ötektik çözücülerin verimlerinin, şeker bazlı derin ötektik çözücülerden daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir. Bunun nedeni olarak ise şeker bazlı derin ötektik çözücülerin daha yüksek viskoziteye sahip olduğunu ve kütle transferini sınırladığını belirtmişlerdir. Yu vd. (2022), derin ötektik çözücülerin etkinliğinin polariteye de bağlı olduğunu ve asit bazlı HBD'lerin yüksek polaritesinden dolayı polar bileşikler ekstrete etmek için daha uygun olduğunu bildirmişlerdir.



Şekil 2. Farklı çözücüler ile elde edilen ekstraktların toplam flavonoid bileşik (TFlaB) miktarları  
Figure 2. Total flavonoid compound (TFlaC) amounts of extracts obtained with different solvents

#### Çözücülerin antioksidan aktivite üzerine etkisi

Farklı çözücülerin ışığın antioksidan aktivitesi üzerine etkisi Çizelge 2'de görülmektedir. Antioksidan aktivite değerleri 3 farklı yöntem (DPPH, FRAP ve CUPRAC) ile belirlenmiştir. DPPH değerleri değerlendirildiğinde, en yüksek değere DES 1 ve DES 2 ile erişilmiştir.

İstatistiksel olarak etanol, metanol ve DES 3 ekstraktları birbirine benzer bulunmuştur ( $P > 0.05$ ). En düşük DPPH değeri ise hekzan ile elde edilmiştir. En yüksek FRAP ve CUPRAC değerleri, DES 1, DES 3 ve etanol ekstraktlarında elde edilmiştir. Hekzan ise yine en düşük antioksidan aktiviteyi sağlamıştır. Benzer olarak derin ötektik çözücünün antioksidan aktivite

üzerine bu olumlu etkisi Wu vd. (2020) tarafından da kanıtlanmıştır. L-prolin ve gliserol ile oluşturulan derin ötektik çözücünün *Moringa oleifera* yapraklarından ultrasonik destekli ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen antioksidan aktivite gösteren bileşiklerin miktarı, etanol ve su ile elde edilen değerlere göre daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir. Bu çalışmada da olduğu gibi molar oranın DPPH üzerine etkili olduğu Zannou ve Koca (2020) tarafından da belirtilmiştir. Derin ötektik çözücülerini oluşturan bileşenlerin oranlarının, viskozitenin değişimi kavitasyonun etkisini geliştirerek güçlü H-bağ

etkileşimleri sağladıkları için biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonunda önemli olduğu bildirilmiştir. Bayram vd. (2022) 10 farklı derin ötektik çözücü kullanarak kantaron bitkisinden antioksidan aktivite değerlerini CUPRAC ve ABTS yöntemi ile belirlemiş ve yapılan bu çalışmaya benzer şekilde kolin klorür:asetik asit kombinasyonu ile yüksek değerler elde edilmiştir. Sonuçlardan görüldüğü üzere yeşil çözücülerden biri olan derin ötektik çözücünün, antioksidan aktivite üzerine etkisi önemli bulunmuş ve organik çözücüler yerine kullanılabilirleri uygun görülmüştür.

Çizelge 2. Farklı çözücüler ile elde edilen ekstraktların antioksidan aktivite (DPPH, FRAP ve CUPRAC yöntemi ile) değerleri

Table 2. Antioxidant activity (by DPPH, FRAP, and CUPRAC method) amounts of extracts obtained with different solvents

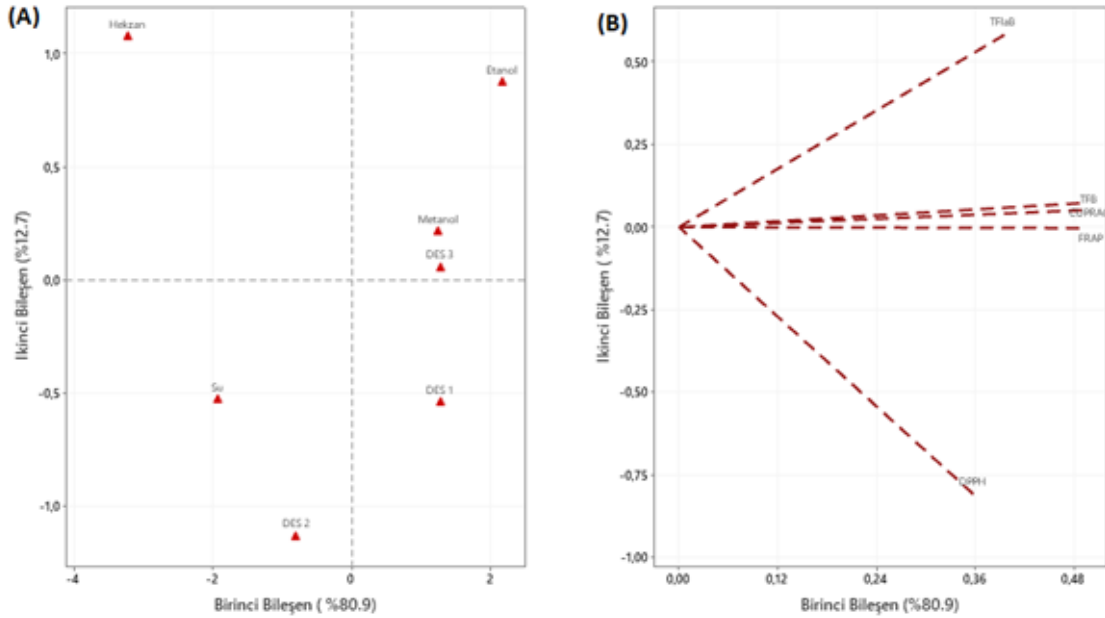
Çözücü Solvent	DPPH (mg TE/g)	FRAP (mg TE/g)	CUPRAC (mg TE/g)
DES 1	0.857±0.02 <sup>ab</sup>	52.073±0.46 <sup>a</sup>	80.817±1.67 <sup>ab</sup>
DES 2	0.911±0.02 <sup>a</sup>	23.873±0.39 <sup>c</sup>	32.917±2.24 <sup>c</sup>
DES 3	0.799±0.06 <sup>bc</sup>	52.610±1.22 <sup>a</sup>	78.733±2.92 <sup>ab</sup>
Su	0.749±0.02 <sup>c</sup>	6.460±0.23 <sup>d</sup>	13.517±0.59 <sup>d</sup>
Etanol	0.818±0.00 <sup>abc</sup>	53.873±0.57 <sup>a</sup>	82.950±1.91 <sup>a</sup>
Metanol	0.853±0.01 <sup>abc</sup>	41.548±1.34 <sup>b</sup>	74.883±2.57 <sup>b</sup>
Hekzan	0.318±0.01 <sup>d</sup>	0.035±0.01 <sup>e</sup>	2.750±0.02 <sup>e</sup>

Aynı sütundaki farklı harflere ait (a, b, c, d, e) değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır ( $P < 0.05$ )  
Values of different letters (a, b, c, d, e) in the same column are statistically different from each other ( $P < 0.05$ )

### Temel bileşen analizi

Temel bileşen analizi, genel olarak kullanılan bir veri sıkıştırma ve görselleştirme aracıdır (Karoui vd., 2010). Bu çalışmada farklı çözücüler kullanılarak hazırlanan ışkın ekstraktlarının biyoaktif bileşik analizlerinden elde edilen verileri sınıflandırmak ve elde edilen sonuçlar arasındaki farklılıkları/benzerlikleri yorumlamak için temel bileşen analizi gerçekleştirilmiştir. Temel bileşen analizi ile beş değişken (TFB, TFlaB, FRAP, CUPRAC ve DPPH) iki ana bileşene indirgenmiştir. Analiz sonucu elde edilen sonuçlar sırasıyla Şekil 3A ve Şekil 3B'de sunulmuştur. Birinci temel bileşen ve ikinci temel bileşen toplam varyansın sırasıyla %80.9 ve %12.7'sini açıklamaktadır. Elde edilen sonuçlar veri varyansının yüksek bir miktarının %93.6 temel bileşen analizi ile açıklandığını göstermiştir. Şekil

3A'da sol alt karede yer alan su ve DES 2 ekstraktları birinci ve ikinci temel bileşenle negatif, sol üst karede yer alan hekzan ekstraktı birinci temel bileşenle negatif ikinci temel bileşenle pozitif korelasyon göstermiştir. Sağ üst karede bulunan etanol, metanol ve DES 3 ekstraktları birinci ve ikinci temel bileşenle pozitif, sağ alt karede yer alan DES 1 ekstraktı ise birinci temel bileşenle pozitif ikinci temel bileşenle negatif korelasyon gösterdiği belirlenmiştir. Şekil 3B'de görüldüğü üzere, DES 3'ün TFB, CUPRAC ve FRAP değişkenleri üzerine etkisi yüksek bulunmuştur. Özetle Şekil 3 A ve B'de sunulan veriler, Şekil 1, 2 ve Çizelge 2'de verilen sonuçları doğrulamaktadır. Sonuç olarak, organik çözücülere (etanol ve metanol) alternatif olarak DES 3 çözücüsünün kullanımı önerilmektedir.



Şekil 3. Temel bileşen analiz sonuçları A) İki temel bileşene ait skor grafiği B) İki temel bileşene ait yüklenme grafiği

Figure 3. Principal component analysis results A) Score graph of two principal components B) Loading graph of two principal components

## SONUÇ

Çalışma sonucunda, etanol ve DES 1 ile en yüksek miktarda TFB ekstrakte edildiği tespit edilmiştir. Etanol ile 27.53 mg GAE/g kuru madde, DES 1 ile 26.40 mg GAE/g kuru madde elde edilmiş olup bu iki değer istatistiksel olarak birbirine benzer bulunmuştur. TFlaB verimi en yüksek etanol ile elde edilmiş olup ikinci en yüksek değer DES 3 ekstraktında saptanmıştır. Derin ötektik çözücünün molar oranı, 1:3'den 1:2'e düştüğünde TFlaB değerinde yaklaşık %37, 1:1'e düştüğünde ise yaklaşık %25 oranında bir azalma görülmüştür. En yüksek DPPH değerleri DES 1 ve DES 2 çözücülerinin kullanımıyla, en yüksek FRAP ve CUPRAC değerleri ise DES 1, DES 3 ve etanol çözücülerinin kullanımıyla elde edilmiştir. Temel bileşen analizi ile kullanılan çözücülerin ışkın ekstraktlarının biyoaktif içerik (toplam fenolik bileşik, toplam flavonoid bileşik, antioksidan aktivite) açısından benzerlik/farklılıkları değerlendirilmiş ve derin ötektik çözücülerden DES 3'ün etanole en yakın değerleri sağlayan çözücü olduğu görülmüştür. Sonuç olarak, ışkından biyoaktif bileşik ekstraksiyonunda

organik çözücülere alternatif olarak derin ötektik çözücünün kullanımı uygun bulunmuştur.

## KAYNAKLAR

- Abbott, A.P., Capper, G., Davies, D.L., Rasheed, R.K., Tambyrajah, V. (2003). Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. *Chemical Communications*, 1:70-71.
- Akkuş, Y. (2018). *Rheum ribes* (Işkın Otu)'nin Metanol Ekstresinin Düzenli Aerobik Yüzme Egzersizi Uygulanan Rat Dokularında Antioksidan ve Histopatolojik Etkileri. Doktora tezi, Atatürk Üniversitesi, Kış Sporları ve Spor Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, Türkiye s. 84.
- Alaadin, A.M., Al-Khateeb, E.H., Jäger, A.K. (2007). Antibacterial activity of the Iraqi *Rheum ribes* root. *Pharmaceutical Biology*, 45(9):688-690.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S.E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26):7970-7981.



- Apuhan, A.K., Beyazkaya, T. (2019). Bingöl'ün yenilebilir yabancı bitkilerinin gastronomi turizmüne etkisi üzerine bir araştırma. *Tourism and Recreation*, 1(1):31-37.
- Bajkacz, S., Adamek, J. (2018). Development of a method based on natural deep eutectic solvents for extraction of flavonoids from food samples. *Food Analytical Methods*, 11(5):1330-1344.
- Bao, J.S., Cai, Y.Z., Sun, M., Wang, G., Corke, H. (2005). Anthocyanins, flavonols, and free radical scavenging activity of chinese bayberry (*Myrica rubra*) extracts and their color properties and stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53:2327–2332.
- Bayram, S., Kutlu, N., Gerçek, Y.C., Çelik, S., Bayram, N.E. (2022). Bioactive compounds of deep eutectic solvents extracts of *Hypericum perforatum* L.: Polyphenolic-organic acid profile by LC-MS/MS and pharmaceutical activity. *Food Bioscience*, 49:101926.
- Benzie, I.F., Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem.*, 239(1):70-76.
- Bubalo, M. C., Ćurko, N., Tomašević, M., Ganić, K.K., Redovniković, I.R. (2016). Green extraction of grape skin phenolics by using deep eutectic solvents. *Food Chemistry*, 200:159-166.
- Chandra, S., Khan, S., Avula, B., Lata, H., Yang, M.H., ElSohly, M.A., Khan, I.A. (2014). Assessment of total phenolic and flavonoid content, antioxidant properties, and yield of aeroponically and conventionally grown leafy vegetables and fruit crops: a comparative study. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014:253875.
- Chemat, F., Vian, M.A., Fabiano-Tixier, A.S., Nutrizio, M., Jambak, A.R., Munekata, P.E., Lorenzo, J.M., Barba, F.J., Binello, A., Cravotto, G. (2020). A review of sustainable and intensified techniques for extraction of food and natural products. *Green Chemistry*, 22(8):2325-2353.
- Cui, Y., Li, C., Yin, J., Li, S., Jia, Y., Bao, M. (2017). Design, synthesis and properties of acidic deep eutectic solvents based on choline chloride. *Journal of Molecular Liquids*, 236:338-343.
- Farzami Sepehr, M., Ghorbanli, M. (2002). Effects of nutritional factors on the formation of Anthraquinones in callus cultures of *Rheum ribes*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 68(2):171-175.
- Garcia-Salas, P., Morales-Soto, A., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. (2010). Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. *Molecules*, 15(12):8813-8826.
- Inaltong, T. (2015). Türkiye'nin otları Erişim adresi: <http://www.turkishcuisine.org/ingredients-7/ingredients-used-inturkishcuisine-66/wild-greens-and-herbs-188.html>.
- Karoui, R., Downey, G., Blecker, C. (2010). Mid-infrared spectroscopy coupled with chemometrics: a tool for the analysis of intact food systems and the exploration of their molecular structure– quality relationships– a review. *Chemical Reviews*, 110(10):6144-6168.
- Keser, S., Keser, F., Karatepe, M., Kaygılı, O., Tekin, S., Turkoglu, I., Demir, E., Yilmaz, O., Kirbag, S., Sandal, S. (2020). Bioactive contents, in vitro antiradical, antimicrobial and cytotoxic properties of rhubarb (*Rheum ribes* L.) extracts. *Natural Product Research*, 34(23):3353-3357.
- Li, J., Han, Z., Zou, Y., Yu, B. (2015). Efficient extraction of major catechins in *Camellia sinensis* leaves using green choline chloride-based deep eutectic solvents. *RSC Advances*, 5(114):93937-93944.
- McDonald, S., Prenzler, P.D., Antolovich, M., Robards, K. (2001). Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. *Food Chemistry*, 73(1):73-84.
- Munzuroğlu, Ö., Karataş, F., Gür, N. (2000). A study of the levels of vitamins A, E and C and selenium in rhubarb (*Rheum ribes* L.). *Turkish Journal of Biology*, 24(3):397-404.
- Panzella, L., Moccia, F., Nasti, R., Marzorati, S., Verotta, L., Napolitano, A. (2020). Bioactive phenolic compounds from agri-food wastes: An

- update on green and sustainable extraction methodologies. *Frontiers in Nutrition*, 7:60.
- Radošević, K., Bubalo, M.C., Srček, V.G., Grgas, D., Dragičević, T.L., Redovniković, I.R. (2015). Evaluation of toxicity and biodegradability of choline chloride based deep eutectic solvents. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 112:46-53.
- Reina, L.J.C., López, G.D., Durán-Aranguren, D.D., Quiroga, I., Carazzone, C., Sierra, R. (2023). Compressed fluids and Soxhlet extraction for the valorization of compounds from Colombian cashew (*Anacardium occidentale*) nut shells aimed at a cosmetic application. *The Journal of Supercritical Fluids*, 192:105808.
- Ruesgas-Ramón, M., Figueroa-Espinoza, M.C., Durand, E. (2017). Application of deep eutectic solvents (DES) for phenolic compounds extraction: Overview, challenges, and opportunities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(18):3591-3601.
- Stalikas, C.D. (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*, 30(18):3268-3295.
- Tang, B., Zhang, H., Row, K.H. (2015). Application of deep eutectic solvents in the extraction and separation of target compounds from various samples. *Journal of Separation Science*, 38(6):1053-1064.
- Welton, T. (2015). Solvents and sustainable chemistry. *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 471(2183):20150502.
- Wojeicchowski, J.P., Marques, C., Igarashi-Mafra, L., Coutinho, J.A., Mafra, M.R. (2021). Extraction of phenolic compounds from rosemary using choline chloride-based deep eutectic solvents. *Separation and Purification Technology*, 258:117975.
- Wu, L., Li, L., Chen, S., Wang, L., Lin, X. (2020). Deep eutectic solvent-based ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from *Moringa oleifera* L. leaves: Optimization, comparison and antioxidant activity. *Separation and Purification Technology*, 247:117014.
- Xu, G.C., Ding, J.C., Han, R.Z., Dong, J.J., Ni, Y. (2016). Enhancing cellulose accessibility of corn stover by deep eutectic solvent pretreatment for butanol fermentation. *Bioresource Technology*, 203:364-369. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.11.002>.
- Yu, Q., Wang, F., Jian, Y., Chernyshev, V.M., Zhang, Y., Wang, Z., Yuan, Z., Chen, X. (2022). Extraction of flavonoids from Glycyrrhiza residues using deep eutectic solvents and its molecular mechanism. *Journal of Molecular Liquids*, 363:119848.
- Zainal-Abidin, M.H., Hayyan, M., Hayyan, A., Jayakumar, N.S. (2017). New horizons in the extraction of bioactive compounds using deep eutectic solvents: A review. *Analytica Chimica Acta*, 979:1-23.
- Zannou, O., Koca, I. (2020). Optimization and stabilization of the antioxidant properties from Alkanet (*Alkanna tinctoria*) with natural deep eutectic solvents. *Arabian Journal of Chemistry*, 13(8):6437-6450.
- Zhao, B.Y., Xu, P., Yang, F.X., Wu, H., Zong, M.H., Lou, W.Y. (2015). Biocompatible deep eutectic solvents based on choline chloride: characterization and application to the extraction of rutin from *Sophora japonica*. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 3(11):2746-2755.
- Zhou, S., Fang, Z., Lü, Y., Chen, J., Liu, D., Ye, X. (2009). Phenolics and antioxidant properties of bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) pomace. *Food Chemistry*, 112:394-399.