



## Determination of soxhlet extraction conditions of silibinin and rutin components in *Juniperus excelsa* M. Bieb fruits using experimental design method

Levent Nuralın\*<sup>ID</sup>, Metin Gürü<sup>ID</sup>

Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Gazi University, 06570, Çankaya, Ankara, Turkey

### Highlights:

- The optimum soxhlet processing conditions for *juniperus excelsa* fruits were 283.67 min and 64.82% ethanol ratio.
- Soxhlet extraction produced an extract profile rich in rutin
- Soxhlet extraction yield of *juniperus excelsa* fruits was higher than Sc-CO<sub>2</sub> extraction yield.

### Keywords:

- Silibinin silybin
- Rutin trihydrate rutoside
- *Juniperus excelsa*
- Soxhlet extraction
- Response surface experimental design

### Article Info:

Research Article  
Received: 30.09.2020  
Accepted: 10.03.2021

### DOI:

10.17341/gazimmfd.802178

### Acknowledgement:

We would like to thank to Gamze Çiftçi

### Correspondence:

Author: Levent Nuralın  
e-mail: leventnuralin@gazi.edu.tr  
phone: +90 312 582 3530

### Graphical/Tabular Abstract

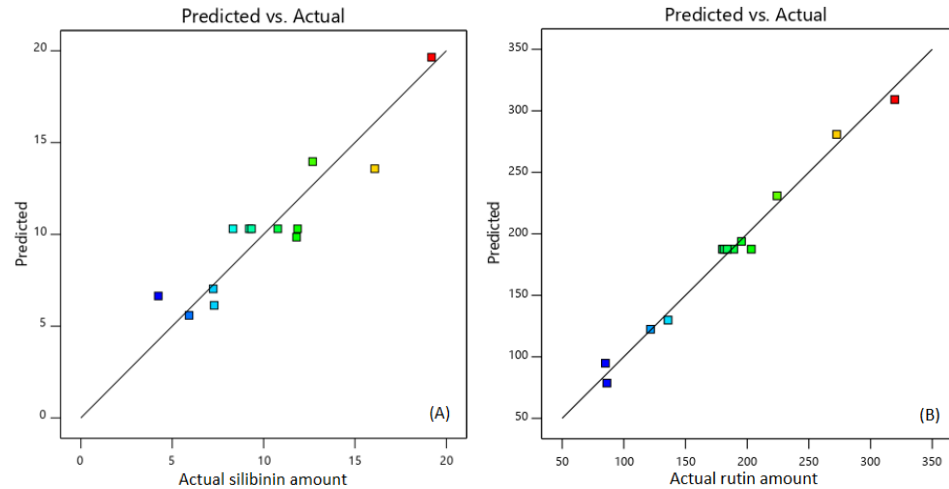


Figure A. Predicted and experimental quantitative data graphs of silibinin and rutin (A and B)

**Purpose:** The aim of this study is to determine the amount of silibinin and rutin substances in *juniperus excelsa* M. Bieb fruits by using soxhlet and Sc-CO<sub>2</sub> extraction methods.

### Theory and Methods:

*Juniper* plants are used in traditional medicine due to its diuretic, anti-inflammatory, pain reliever, liver protector, antimicrobial and antibacterial therapeutic effects. Silibinin compound is a powerful antioxidant and has been found to protect against alcoholic hepatitis and cirrhosis diseases [10]. There are studies on the therapeutic effect of rutin against COVID 19 virus with its high inhibition effect [7]. It has also been reported for rutin, to reduce cancer formation with its strong effect on cervical cancer cells in the treatment of prostate and colon cancers [9]. Experiments were planned as experimental design by using Design Expert 11 (demo) version to find the amounts of silibinin and rutin by Soxhlet method. In this study, potential silibinin and rutin contents of *juniperus excelsa* fruits were extracted by the soxhlet and Sc-CO<sub>2</sub> methods and the amounts of substances were determined by HPLC analysis.

### Results:

According to the experimental design model, regression coefficients were calculated for silibinin and rutin as  $R^2 = 0.86$  and  $R^2 = 0.98$ , respectively. Experimental design model for both compounds were found to be compatible with the experimental data since the differences between the predicted  $R^2$  and adjusted  $R^2$  values were sufficiently low for both compounds. Suggested design models by the program for silibinin and rutin are 2FI and quadratic, respectively. The highest amounts of silibinin and rutin obtained by soxhlet extraction were found as 19.19  $\mu\text{g/g dw}$  and 319.6  $\mu\text{g/g dw}$ , respectively. For the method comparison, the silibinin and rutin amounts obtained by Sc-CO<sub>2</sub> extraction planned in the light of the literature, were found as 17.75  $\mu\text{g/g}$  and 52.45  $\mu\text{g/g dw}$ , respectively.

### Conclusion:

This is the first study to identify silibinin presence and its amounts in *juniperus excelsa* M. Bieb. Optimum conditions of both silibinin and rutin obtaining were observed as 64.82 % ethanol ratio, 283.67 min, 0.3 mm mean particle size and 78.37- 78.86°C. The results of this study could be utilized by pharmaceutical industry engineers and process engineers for design and scale up of silibinin and rutin production.



## Boylu ardıç (*Juniperus excelsa* M. Bieb) meyvelerinde silibinin ve rutin bileşenlerinin deneysel tasarım metodu kullanılarak sokslet özütleme şartlarının belirlenmesi

Levent Nuralın\*<sup>ID</sup>, Metin Gürü<sup>ID</sup>

Gazi Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, 06570 Çankaya Ankara, Türkiye

### Ö N E Ç İ K A N L A R

- Boylu ardıç meyveleri için sokslet ekstraksiyonu optimum şartları 283,67 dakika ve %64,82 etanol oranı olmuştur
- Sokslet ekstraksiyonu yöntemi ile daha fazla miktarda rutin ekstrakte edilebilmiştir
- Boylu ardıç meyvelerinde sokslet ekstraksiyonu verimi Sc-CO<sub>2</sub> ekstraksiyonundan yüksektir

### Makale Bilgileri

Araştırma Makalesi

Geliş: 30.09.2020

Kabul: 10.03.2021

### DOI:

10.17341/gazimmfd.802178

### Anahtar Kelimeler:

Silibinin,  
rutin trihidrat,  
boylu ardıç,  
sokslet ekstraksiyonu,  
yüzey cevap deneysel  
tasarım

### ÖZ

Bu çalışmada, boylu ardıç bitkisi meyvelerinde bulunan silibinin ve rutin bileşiklerinin miktarları, sokslet ve süper kritik CO<sub>2</sub> (Sc-CO<sub>2</sub>) ekstraksiyon metodları kullanılarak araştırılmıştır. Ardıç bitkisinin geleneksel tıpta yüz yıllardır tedavi amaçlı kullanılması ve günümüzde önleyici tedavilerin artması ile güncel bilimsel çalışmalarda üzerinde sıklıkla araştırmalar yapılmasına neden olmuştur. Geleneksel tıpta idrar söktürücü, iltihap önleyici, ağrı kesici, karaciğer koruyucu, anti mikrobiyal ve anti bakteriyel etkileri bilinmektedir. Ardıç meyvesinin sokslet ekstraksiyonunda deneysel tasarım yöntemi kullanılmış, Design Expert 11 (Demo) programı kullanılarak deney tasarlanmış ve sonuçlar analiz edilmiştir. Bağımsız parametreler olan etanol/su oranı ve ekstraksiyon süresinin biyoaktif madde verimlerine etkisi araştırılmıştır. Sokslet yöntemi için özütte bulunan silibinin ve rutin etken maddelerinin maksimum miktarını veren matematiksel modeller elde edilmiştir. Çalışmada elde edilen modellerin önerdiği optimum çalışma koşulları ile deneysel sonuçların uyumlu olduğu görülmüştür. Deneysel çalışmalar ile ardıç meyvelerinde en yüksek silibinin ve rutin miktarları sırasıyla 19,19 µg/g ve 319,6 µg/g kuru madde olarak bulunmuştur. Sc-CO<sub>2</sub> ekstraksiyonu ile elde edilen silibinin ve rutin miktarları ise sırasıyla 17,75 µg/g ve 52,45 µg/g kuru madde olarak bulunmuştur.

## Determination of soxhlet extraction conditions of silibinin and rutin components in *Juniperus excelsa* M. Bieb fruits using experimental design method

### H I G H L I G H T S

- The optimum soxhlet processing conditions for *juniperus excelsa* fruits were 283.67 min and 64.82% ethanol ratio.
- Soxhlet extraction produced an extract profile rich in rutin
- Soxhlet extraction yield of *juniperus excelsa* fruits was higher than Sc-CO<sub>2</sub> extraction yield

### Article Info

Research Article

Received: 30.09.2020

Accepted: 10.03.2021

### DOI:

10.17341/gazimmfd.802178

### Keywords:

Silibinin silybin,  
rutin rutoside,  
*juniperus excelsa*,  
soxhlet extraction,  
response surface  
experimental design

### ABSTRACT

In this study, the amounts of silibinin and rutin compounds found in *juniperus excelsa* plant fruits were investigated by using sokslet and supercritical CO<sub>2</sub> (Sc-CO<sub>2</sub>) extraction methods. Due to the fact that the *juniperus excelsa* plant has been used in traditional medicine for centuries for therapeutic purposes and the increase in preventive treatments recently, this has led to intensive research on this plant. In traditional medicine, its diuretic, anti-inflammatory, pain reliever, liver protector, antimicrobial and antibacterial effects are known. Experimental design method was used in the soxhlet extraction of *juniperus excelsa* fruit, the experiments were designed using the Design Expert 11 (Demo) program and the results were analyzed. Ethanol / water ratio and extraction time were selected as independent parameters and their effects on bioactive material yields was investigated. For the Soxhlet method, mathematical models were obtained that give the maximum amount of silibinin and rutin compounds in the extract. It was observed that the optimum study conditions suggested by the models obtained in the study were compatible with the experimental results. As a result of experimental studies, the highest amounts of silibinin and rutin substances in *juniperus excelsa* fruits were found as 19.19 µg/g and 319.6 µg/g dw, respectively. The silibinin and rutin amounts obtained by Sc-CO<sub>2</sub> extraction were found as 17.75 µg/g and 52.45 µg/g dw, respectively.

## 1. GİRİŞ (INTRODUCTION)

Geleneksel tıpta sıklıkla kullanılan birçok farklı bitkisel kaynak, günümüzde önleyici tedavi ve önleyici tıp alanlarında da kullanılmaktadır. Önleyici tedavi, hastalık tedavisinin aksine hastalık meydana gelmeden hastalığın önlenmesini amaçlar. Bitkisel kaynakların hastalıklara karşı tedavi edici etkileri araştırılmaya devam edilirken, antioksidan içerikli doğru beslenme alışkanlıkları önleyici tedavileri desteklemektedir. Ardıç bitkisi *Cupressaceae* ailesinden bitkiler sınıfında olan ve 70 kadar farklı türü bulunan kuzey yarım kürede dağılım gösteren bir bitkidir [1]. Ardıç bitkisi üzerine yapılan araştırmalarda bitkinin flavonoidler, reçineler, uçucu yağlar, tanen, lignan ve triterpen bakımından zengin içeriğe sahip olduğu tespit edilmiştir [2]. Ardıç türlerinden, *Juniperus communis* L. and *Juniperus oxycedrus* meyvelerinden etanol, etil asetat ve cloroform ile alınan ekstraktlarda toplam antioksidan ve fenolik içerik analizleri yapılmış, bu iki türden *Juniperus communis* L. türünün yüksek antioksidan aktivite gösterdiği ve 189,82 mg GAE fenolik içeriğe sahip olduğu tespit edilmiştir [3]. Ardıç bitkisi meyvelerinde rutin, luteolin, apigenin, quercetin, nepetin, bilobetin, amentoflavon, ve skutellarein flavonoidleri tespit edilmiştir. [4]. Epilepsi hastalığına karşı geleneksel tıpta kullanılan ve aralarında *Juniperus oxycedrus* L. meyvelerinin de bulunduğu 14 farklı bitkiden elde edilen Sokslet yöntemiyle alınan özütlerde catechin, epicatechin, rutin, naringin, myricetin, luteolin, naringenin and apigenin varlığı tespit edilmiştir [5]. Türk geleneksel tıbbında kullanılan ardıç türlerinin doğal anti kanser bileşikler olarak kullanılabilceğini gösteren bir araştırmada 5-100 mu g/ml derişimlerdeki *Juniperus communis* ekstraktlarının cervix carcinoma kanser hücrelerinin çoğalmasını azalttığı, IC50 değerinin 32,96 olduğu tespit edilmiştir [6].

Bu çalışmada Ardıç meyvesinde bulunan rutin ve silibinin miktarları araştırılmıştır. Bilgisayar simülasyonu ile COVID-19 virüsünün ana proteazına karşı yerleştirilen 51 farklı fitokimyasal içerisinde en yüksek inhibisyon etkisini Rutin bileşiği göstermiş, tümleşik 11 modelin 9'unda ticari ilaç olarak kullanılan "lopinavir" aktif maddesinden daha iyi

tedavi edebileceği görülmüştür [7]. Rutin bileşiğinin, diyabet kaynaklı görme kayıplarının tedavisinde ağız yoluyla alımı ile görüş keskinliğini 3-6 ay içinde belirgin oranda artırdığı tespit edilmiştir [8]. Rutin'in prostat ve kolon kanserlerinin yanı sıra cervical kanser hücrelerinin canlılığını azalttığı, oksidatif oksijen oluşumunu azalttığı ve dolayısı ile kanser hücresi oluşumuna engel olduğu, hücre yaşam döngüsünün (apoptosis) sağlıklı olarak tamamlanmasına destek olduğu ve bu sayede kanser oluşumunu azalttığı bildirilmiştir [9]. Silibinin bileşiği, silimarin bitkisinden adımlı alan ve bu bitkide bulunan 4 temel bileşikten biridir. Silibinin bileşiğinin güçlü bir antioksidan olduğu ve karaciğer hasarları olan alkolik hepatit ve siroz hastalıklarına karşı koruma sağladığı bilgisi literatürde mevcuttur [10] (Şekil 1).

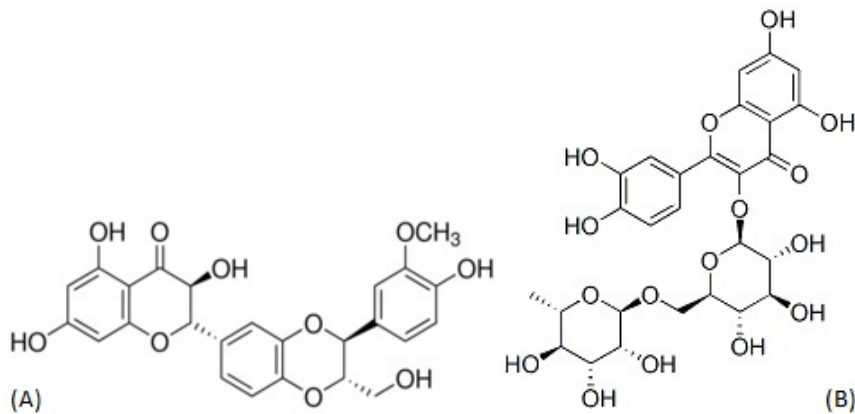
*Juniperus excelsa* (boylu ardıç) bitkisinin kozalak tohumlarının makaron yöntemiyle metanol/su çözücüsünde 72 saatlik ekstraksiyonu ile elde edilen ekstraktlarda farklı bileşenlerin yanında rutin miktarı 3,87 mg/g olarak tespit edilmiştir [11]. Bir başka araştırmada *Juniperus procera* (sedir ağacı) bitkisi yapraklarından petrol eteri ile alınan özütlerde silibinin varlığı yanında, CCl<sub>4</sub> ile zarar görmüş karaciğer hücreleri üzerinde bu özütlerin hepatoprotektif etki gösterdiği tespit edilmiştir [12].

Bu çalışmada daha önce yapılan tüm çalışmalardan farklı ve özgün olarak *juniperus excelsa* M. Bieb (boylu ardıç) bitkisi meyveleri sokslet ve Sc-CO<sub>2</sub> yöntemleriyle ekstrakte edilmiştir. Kanser tedavisinde aktif şekilde ilaç hammaddesi olarak kullanılan silibinin ile rutin bileşiklerinin miktarları bu meyvede araştırılmış ve sokslet yöntemi için planlanan deneysel tasarım yöntemi ile maksimum ekstraksiyon şartları belirlenmiştir.

## 2. DENEYSEL ÇALIŞMA (EXPERIMENTAL STUDY)

### 2.1. Ham Maddeler ve Kimyasallar (Raw Materials and Chemicals)

Bu araştırmada kullanılan boylu ardıç meyveleri Isparta ili Akkeçili köyünden kasım ayında toplanmıştır. Referans maddeler olan rutin trihidrat ( $\geq$  %98) ve silibinin ( $\geq$  %98),



Şekil 1. Silibinin (A) ve Rutin (B) bileşiklerinin moleküler yapıları (Molecular structures of silibinin (A) and rutin (B) compounds)

çözücü olarak kullanılan analitik saflıktaki etanol ( $\geq$  %99,99), mobil faz olarak kullanılan analitik saflıktaki metanol ( $\geq$  %99,99) ve asetonitril ( $\geq$  %99,99) Sigma Aldrich firmasından temin edilmiştir. Mobil faz karışımlarında tampon olarak kullanılan analitik saflıktaki formik asit ( $\geq$  %99,99) ise Merck firmasından (Almanya) temin edilmiştir. Deneysel, ekstraksiyon işlemlerinde ve likit kromatografi de mobil faz olarak kullanılan deiyonize saf su, Siemens marka (Almanya) SG pure model saf su cihazında üretilmiştir.

## 2.2. Numune Hazırlama (Sample Preparation)

Araştırmada kullanılan ardıçlar olgunlaşmış meyvelerden seçilmiştir. Ardıç meyveleri 30°C'deki Binder marka (Alman) etüvde 72 saat boyunca kurutulmuştur. Kurutulmuş ardıç meyveleri Resch marka (Alman) bitki değirmeni kullanılarak öğütülmüş ve elek analizi ile sınıflandırılmıştır. Deneysel kullanılan partikül büyüklüğü bu tür bitkilerin ekstraksiyon şartlarına uygun olarak 0,25-0,35 mm aralığındadır [5]. Hazırlanan kuru ve toz haldeki numuneler sokset ve Sc-CO<sub>2</sub> yöntemleri kullanılarak ekstrakte edilmiş, elde edilen ekstraktlar 0.2 µm lik şırınga tipi mikro filtreden geçirilerek HPLC cihazında analiz için hazırlanmış ve analize kadar -11°C'deki derin dondurucuda tutulmuştur. Numunelerin nem içeriği özdeş numunenin etüvde 105°C de 120 dakika süreyle kurutulması ile %6,66 olarak ölçülmüş ve tüm sonuçlar gram kuru madde başına µg veya mg madde miktarı olarak verilmiştir.

## 2.3. Sokset Ekstraksiyonu (Sohxlet Extraction)

Sokset ekstraksiyonu işlemi için laboratuvar ölçekli 250 ml hacimli balon ile 100 ml hacimli sokset aparatı kullanılmıştır. Deneysel tasarım yöntemince önerilen her bir deney koşulunda, 5 gram öğütülmüş ardıç meyvesi kullanılmıştır. Geri soğutma sırasında su sarfiyatının azaltılması için kapalı çevrim su pompası kullanılmıştır (Şekil 2). Tüm deneyler çeker ocak içerisinde gerçekleştirilmiştir ve alınan ekstraktların toplam hacimleri kaydedilmiştir.

## 2.4. Sc-CO<sub>2</sub> Ekstraksiyonu (Sc-CO<sub>2</sub> Extraction)

Bu çalışma ile planlanan sokset ekstraksiyonu yanında, metotlar arası verimlerin mukayese edilebilmesi amacıyla Sc-CO<sub>2</sub> ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, Speed SFE model Applied Separations (USA) marka süper kritik ekstraksiyon cihazı, yardımcı çözücü pompası ve 24 ml iç hacimli ekstraktör kullanılmıştır. Planlanan Sc-CO<sub>2</sub> yöntemi deney şartları için, Korsika bölgesinde yetişen aralarında *juniperus communis* bitkisi bulunan 4 endemik bitki üzerinde yapılan çalışmada Sc-CO<sub>2</sub> ekstraksiyon şartları 180 dakika ve 6,5 g numune olarak uygulanmıştır [13]. Sc-CO<sub>2</sub> yöntemi ile elma çekirdeklerinin toplam antioksidan miktarının araştırıldığı bir çalışmada, 0,1-1 mm aralığındaki toz numuneler için deneysel tasarımla belirlenen optimum Sc-CO<sub>2</sub> çalışma şartları 240 bar, 40°C, 1 l/min CO<sub>2</sub> akış hızı ve 140 dakika süre olarak bulunmuştur [14]. Bu çalışmalar

ışığında, Sc-CO<sub>2</sub> ekstraksiyon deney koşulları, 0,25-0,35 mm partikül boyutu, 250 bar basınç, 40°C sıcaklık, 5 l/min CO<sub>2</sub> akış hızı, 120 dakika deney süresi ve %5 w/w etanol ilavesi için 0,57 ml/min akış hızında etanolün yardımcı çözücü olarak ekstraktöre beslendiği paralel iki deney şeklinde gerçekleştirilmiştir. Deneysel alınan ekstraktların hacimleri ölçülerek HPLC analizlerine kadar -11°C deki derin dondurucuda saklanmıştır. Her bir deneyde 5 g numune içerisindeki silibinin ve rutin miktarları, referans maddelerin farklı derişimlerine ait HPLC verilerinden elde edilen kalibrasyon eğrisi kullanılarak hesaplanmış ve gram kuru madde başına µg veya mg birimlerinde verilmiştir.



Şekil 2. Sokset deney düzeneği (Sohxlet experimental setup)

## 2.5. Karakterizasyon ve HPLC Analizi (Characterization and HPLC Analysis)

Sokset ekstraksiyonu sonucu elde edilen ekstraktlarda rutin ve silibinin varlığının ve miktarlarının araştırılması için kromatografik yöntem kullanılmıştır. Analizlerde 170U UV detektörlü dört kanallı, Dionex 680 model (Amerikan) HPLC cihazı kullanılmıştır. Analizler için ODS 3D C18 3 mm x 25 cm 2,7 µm tipte Sigma marka HPLC kolonu kullanılmıştır. HPLC cihazı ile yapılan karakterizasyon işlemi, referans rutin ve silibinin maddelerinin farklı derişimlerinin analizleri, kalibrasyonları ve numunelere ait kromatogramlarda aynı maddelere ait pik alanlarının tespiti ve miktarlarının hesaplanması şeklinde gerçekleştirilmiştir. Flavonoidlerin ve fenollerin karakterizasyonunda, biyoaktif maddelerin miktarlarının hesaplanmasında bu yöntem literatürde sıklıkla kullanılmıştır [15]. Uygulanan gradiyent HPLC metodunda, mobil fazlar A, %20 asetonitril %79,9 deiyonize saf su ve %0,1 formik asit içermektedir. B mobil fazı ise, %100 asetonitrilden oluşmaktadır. Çalışma verileri, silibinin ve rutin'in en yüksek absorbans ile gözlemlendiği 254 nm ve kontrol amaçlı ikinci dalga boyu olarak 335 nm dalga boylarında alınmıştır. Mobil faz akış hızı 1 ml/min sabit akışta çalışılmıştır. Analiz programı gradiyent olup

kısaca t: 0-1 min %100 A, t:1-18 min %50 A ve %50 B, t:18-22,5 min %50 A ve %50 B, 22,5-24 min %100 A, 24-25 min %100 A şeklinde uygulanmıştır. Flavonoid analizleri için benzer C18 tip kolonlar ile benzer gradiyent analiz programları literatürde karaçam kabuğunda taksifolin miktarı analizinde [16] ve iğde çekirdeğinde quercetin miktarı analizlerinde de kullanılmıştır [17].

### 3. DENEYSEL TASARIM (EXPERIMENTAL DESIGN)

Geleneksel optimizasyon yöntemlerinin çok sayıda deneye gereksinim duymaları, zaman madde ve iş gücü sarfiyatının yüksek olması, bağımsız parametrelerin birbirlerine olan etkilerinin belirlenememesi gibi olumsuz yönleri bulunmaktadır. Bu sorunların önüne geçebilmek için bu çalışmada merkezi birleşik tasarımın kullanıldığı yüzey cevap deneysel tasarım metodu kullanılmıştır. Yüzey cevap metodunda merkezi birleşik tasarım en sık kullanılan deneysel tasarım yöntemidir [18] ve Q miktarsal cevaba ait Eş. 1 ile verilmiştir.

$$Q = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{1 \leq i < j}^k \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (1)$$

Burada  $\beta_0$  sabit, k değişken sayısı,  $\beta_i$  doğrusal değişkenlerin katsayısı,  $X_i$  ve  $X_j$  değişkenler,  $\beta_{ii}$  quadratik değişkenlerin katsayısı,  $\beta_{ij}$  etkileşimli değişkenlerin katsayısı ve  $\varepsilon$  ise deneylerden kaynaklanan artıştır. Sokslet ekstraksiyonu ile silibinin ve rutin elde edilmesi, bu tasarım ile tespit edilecek bağımlı değişkenlerdir. Bu çalışmanın bağımsız parametreleri olarak etanol/su karışımının etanol oranı (% EtOH) ve işlem süresi (t) olarak seçilmiştir. Çalışma aralıkları, etanol oranı için %70-95 ve işlem süresi için 60-300 dakika olarak seçilmiştir. Bu çalışma aralıkları için merkezi birleşik (central composite) tasarım ile program tarafından belirlenen çalışma aralıkları Tablo 1'de verilmiştir. Etanol/su oranının değişmesi ile karışımın kaynama sıcaklığı 78,37°C den etanol oranı düştükçe 100°C

ye kadar çıkabilmektedir. Programın önerdiği çalışma aralıkları bakımından etanol oranı % 64,8 w/w'nin altına inilmeyerek bu orandaki karışım için, kaynama noktası olan 78,89°C nin üzerine çıkılmaması ve flavonoidlerin yüksek sıcaklıklara maruz kalmaması sağlanmıştır. Çalışma süresinin 300 dakika ile sınırlandırılması ise endüstriyel üretimler için Ar-Ge niteliğinde olan bu araştırmanın enerji maliyetleri açısından uygulanabilir olması içindir. Deneysel tasarımda kullanılan kodlanmış ve numerik (kodlanmamış) bağımsız değişkenler 5 seviyeli olarak Tablo 1'de verilmiştir.

**Tablo 1.** Kodlanmış ve kodlanmamış bağımsız değişkenler (Coded and uncoded independent parameters)

Kodlanmış değişkenler	Etanol oranı w/w (%)	Zaman (min)
-2	64,8	10,3
-1	70	60
0	82,5	180
1	90	300
2	100	349,7

### 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMALAR (RESULTS AND DISCUSSIONS)

#### 4.1. Model Uyumu ve Deneysel Veriler (Model Fitting and Experimental Data)

Deneysel çalışmalar ile silibinin ve rutin için alınan miktarsal sonuçlar Tablo 2'de verilmiştir. Design Expert programı ile silibinin ve rutin'e ait varyans analizi sonucu (ANOVA) deneysel korelasyon katsayısı ( $R^2$ ) ve programca önerilen korelasyon katsayısının (Adj.  $R^2$ ) değerlerinin birbirlerine uyumu tespit edilmiş ve silibinin ve rutin için veri analizleri bölümlerinde sunulmuştur.

Bu çalışmanın faktörleri ekstraksiyon süresi ve etanol oranıdır. Dönüşümlü merkezi kompozit tasarım ile çalışma koşulları belirlenen 13 deneye ait silibinin ve rutin miktarları

**Tablo 2.** Deneysel tasarım çalışma şartlarında silibinin ve rutin'e ait cevaplar (Responses for rutin and silibinin at the experimental design conditions)

Deney No	Faktör 1 A: Etanol oranı (% w/w)	Faktör 2 B: Zaman (min)	Cevap Silibinin $\mu\text{g/g}$ kuru madde	Cevap Rutin $\mu\text{g/g}$ kuru madde	Özütlenen hacim (ml)
1	82,5	349,7	12,6848	195,342	154
2	82,5	180	9,2136	183,771	156
3	100	180	7,2423	85,0933	159
4	95	300	7,2959	135,823	152
5	82,5	180	11,8599	179,909	153
6	82,5	180	8,3244	189,062	151
7	95	60	11,8063	86,2192	153
8	64,8	180	16,0810	319,607	152
9	70	60	5,9245	224,237	146
10	82,5	10,3	4,2425	121,623	149
11	82,5	180	10,7778	181,433	150
12	82,5	180	9,3421	203,329	156
13	70	300	19,1879	272,539	152

ile ekstraksiyon sonrası elde edilen özüt hacimleri derişim hesaplarında kullanılmak üzere ölçülerek Tablo 2’de verilmiştir.

Silibinin ve rutin bileşiklerinin en yüksek ekstraksiyon verimi için deneysel şartların belirleneceği çalışma için program ile ulaşılan Anova test sonuçlarına göre silibinin ve rutin bileşikleri için önerilen modellerin p değerlerinin 0,05’ten küçük olduğu ve bulunan modellerin deneysel verileri yeterince temsil ettiği sonucu görülmüştür.

#### 4.2. Silibinin için Veri Analizi (Data Analysis for Silybinin)

Design Expert programında silibinin için Tablo 2’de verilen deneysel değerler analiz edildiğinde, program tarafından önerilen değerlendirme modelinin etkileşimli iki faktör (2FI) modeli olduğu görülmüştür. Bu modelin Anova veri analiz tablosu Tablo 3’te verilmiştir.

Silibinin eldesinde Etanol oranının (A) ve zamanın (B) önemli olduğunu ( $0,001 \leq p \leq 0,05$ ) ve bu iki parametrenin çarpımlarının (A\*B) ise çok önemli olduğu ( $p \leq 0,001$ ) p değerinden anlaşılmaktadır. Terimler ve bunlara ait p değerleri Tablo 3’te verilmiştir. Silibinin miktarını belirleyen model eşitliği Tablo 2 ve 3’teki veriler kullanılarak son kareler yöntemiyle hesaplanmış ve Eş. 2 ile verilmiştir.

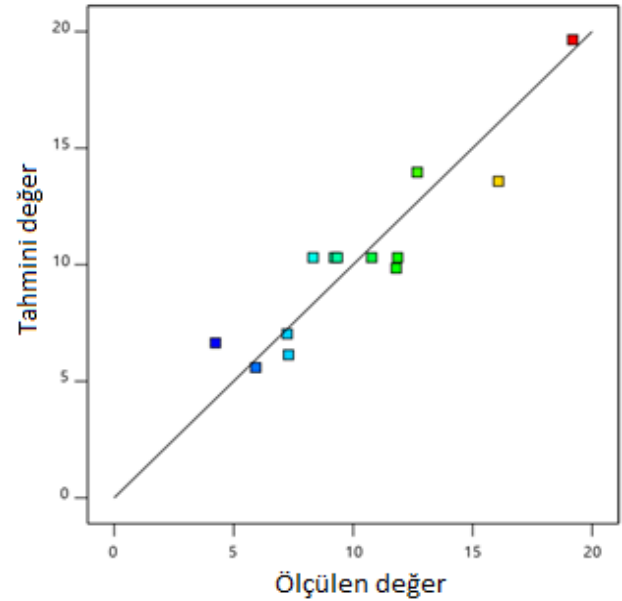
$$S = -22,2926 + 0,3481A + 0,2659B - 0,0029A*B \quad (2)$$

Silibinin’e ait modelin Anova analizi ile elde edilen regresyon katsayısı ( $R^2$ ) 0,86 olarak bulunmuştur. Düzeltilmiş regresyon katsayısı (adj.  $R^2$ :0,82) ile öngörülen regresyon katsayısı (pre  $R^2$ : 0,65) aralarındaki farkın 0,2’den küçük olması nedeni ile aralarında modele uygun oldukları ve bu modelin deneysel verileri temsil ettiği tespit edilmiştir. Programca öngörülen ve deneysel olarak alınan veriler Şekil 3 ile verilmiştir.

Programının önerdiği iki faktör etkileşimli (2FI) modele göre maksimum silibinin ve rutin için çalışma şartları %64,82 etanol oranı ve 283,67 dakika ekstraksiyon süresidir, bu koşullarda öngörülen silibinin miktarı 21,24  $\mu\text{g/g}$  dır. Deneysel çalışmalar ile ulaşılan en yüksek silibinin miktarı ise 19,19  $\mu\text{g/g}$  dır.

#### 4.3. Silibinin için Yüzey Cevap Analizi (Response Surface Analysis for Silybinin)

Eş. 2’ye göre bağımsız parametrelerin birbirleriyle etkileşimlerini ve maksimum silibinin eldesi için gereken deneysel şartların gösterildiği üç boyutlu yüzey cevap grafiği Şekil 4’te verilmiş olup, topografik grafikte z eksen silibinin’in miktarını, x ve y eksenleri ise bağımsız parametreleri temsil etmektedir.



Şekil 3. Silibinin’in modelce tahmin edilen ve ölçülen miktar veri grafiği

(Experimental and model predicted quantitative data graph of silybinin)

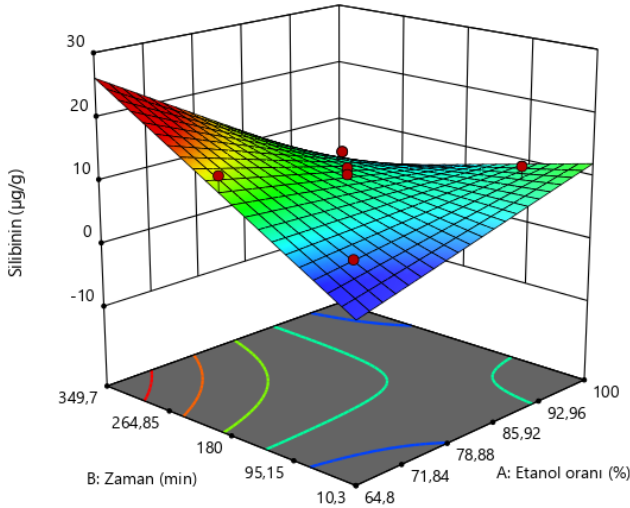
Silibinin miktarı için parametrelerin etkilerini 2 boyutlu olarak gösteren ve program tarafından oluşturulan kontur grafiği Şekil 5’te verilmiştir kırmızı bölge verimin en yüksek olduğu bölgedir.

Şekil 4 ve 5’ten görülebileceği gibi ve silibinin miktarı ekstraksiyon süresi artıka artmıştır. Anova analizi ile de sürenin önemli parametre olduğu p değerinden tespit edilmiştir. Silibinin’in sudaki ve EtOH/MeOH içerisindeki

Tablo 3. Silibinin eldesinde 2FI (İki Faktör Etkileşimli) model için varyans analizi (Varians analysis in obtaining silybinin for 2FI (Two Factors Interacting) model)

	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Kareler ortalaması	F-değeri	p-değeri	
Model	175,32	3	58,44	18,84	0,0003	Önemli
A-etanol oranı	42,82	1	42,82	13,81	0,0048	Önemli
B-İşlem süresi	53,52	1	53,52	17,25	0,0025	Önemli
A*B	78,97	1	78,97	25,46	0,0007	Çok Önemli
Artık	27,91	9	3,10			
Uyum eksikliği	20,04	5	4,01	2,04	0,2554	Önemli değil
Saf hata	7,87	4	1,97			
Toplam	203,24	12				

çözünürlükleri incelendiğinde suda <50 µg/ml gibi çok düşük oranda çözüldüğü ancak polar protik çözücüler olan EtOH ve MeOH içerisinde yavaşça çözüldüğü bilgisi literatürde mevcuttur [19]. Silibinin'in etanolde sudan daha çok çözünmesi nedeni ile Etanol oranının artması ile özütlelerdeki silibinin miktarı deneysel sonuçlardan da görülebileceği şekilde artmıştır.



**Şekil 4.** Silibinin için çalışma parametrelerinin 3 boyutlu gösterimi

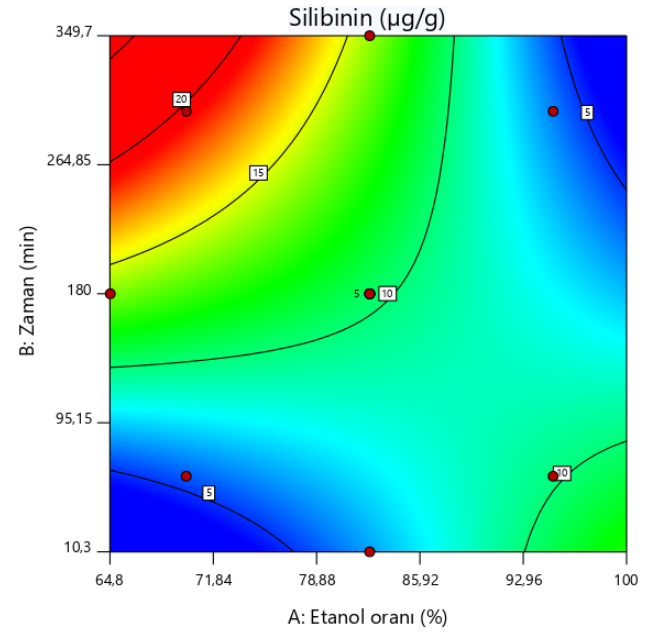
(3D presentation of operating parameters for Silybinin)

#### 4.4. Rutin için Veri Analizi (Data Analysis for Rutin)

Design Expert programında rutin için Tablo 2'de verilen deneysel değerler analiz edildiğinde, program tarafından önerilen değerlendirme modelinin Quadratic model olduğu görülmüştür. Bu modelin rutin için Anova veri analizi Tablo 4'te verilmiştir.

Rutin miktarını veren model denklemi Eş. 3'te verilmiştir. Denklemdaki lineer terimlerden p değeri 0,001'den küçük olan etanol oranının (A) çok önemli parametre olduğu, zamanın (B) ve zamanın karesinin (B<sup>2</sup>) ise p değeri 0,001 ≤

$p \leq 0,05$  arasında olduğu için önemli parametre olduğu görülmektedir. Etkileşimli terim olan A\*B ile quadratic terimler olan A<sup>2</sup> ise p değeri 0,05 ten büyük olduğu için önemli değildir. Rutin miktarını belirleyen model eşitliği Tablo 2 ve 4'teki veriler kullanılarak son kareler yöntemiyle hesaplanmış ve önemli olmayan terimler çıkarılarak Eş. 3 ile verilmiştir.



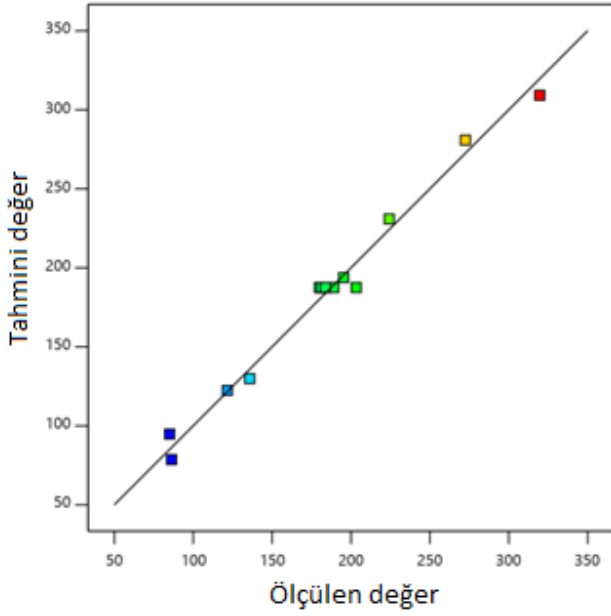
**Şekil 5.** Silibinin için kontur grafiği (Contour graph for silybinin)

$$R = 935,71 - 13,75A + 0,559B - 0,001B^2 \quad (3)$$

Rutin'e ait quadratic modelin Anova analizi ile elde edilen regresyon katsayısı (R<sup>2</sup>) 0,98 olarak bulunmuştur. Düzeltilmiş regresyon katsayısı (Adj. R<sup>2</sup>:0,97) ile öngörülen regresyon katsayısı (Pre. R<sup>2</sup>: 0,93) ve aralarındaki fark 0,2'den küçük olduğu için önerilen quadratic modele uygun oldukları ve bu modelin deneysel verileri temsil ettiği tespit edilmiştir. Programca öngörülen ve deneysel olarak ölçülen veriler Şekil 6 ile verilmiştir.

**Tablo 4.** Rutin eldesinde quadratic model için varyans analizi (Variance analysis in obtaining rutin for the quadratic model)

	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Kareler ortalaması	F-değeri	p-değeri	
Model	53166,75	5	10633,35	96,37	< 0,0001	Çok önemli
A-etanol oranı	45963,07	1	45963,07	416,58	< 0,0001	Çok önemli
B-İşlem süresi	5108,55	1	5108,55	46,30	0,0003	Önemli
A*B	0,4236	1	0,4236	0,0038	0,9523	Önemli değil
A <sup>2</sup>	365,32	1	365,32	3,31	0,1116	Önemli değil
B <sup>2</sup>	1500,60	1	1500,60	13,60	0,0078	Önemli değil
Artık	772,34	7	110,33			
Uyum eksikliği	411,01	3	137,00	1,52	0,3394	Önemli değil
Saf hata	361,33	4	90,33			
Toplam	53939,09	12				



**Şekil 6.** Rutin'in modelce tahmin edilen ve ölçülen miktar veri grafiği  
(Experimental and model predicted quantitative data graph of rutin)

Design expert programının önerdiği quadratik modele göre maksimum silibinin ve rutin için çalışma şartları %64,82 etanol oranı ve 283,67 dakika ekstraksiyon süresi şeklindedir, bu koşullarda öngörülen rutin miktarı 319,65  $\mu\text{g/g}$  dir. Deneysel çalışmalar ile ulaşılan en yüksek rutin miktarı ise 319,61  $\mu\text{g/g}$  dir.

Boylu ardıcın makaron tekniği ile, 72 süreyle ekstraksiyonu ile bitkinin kozalak tohumlarında rutin miktarının 3,87 mg/g olarak bulunduğu bilgisi literatürde mevcuttur [11]. Bu çalışmada uygulanan sokslet yöntemi verileri ile literatürde bulunan rutin miktarı arasında yaklaşık 12 kat kadar fark bulunmasının muhtemel nedeni, bitki tohumunda meyvesinden daha yüksek miktarda rutin'in bulunması ve/veya 72h süreyle uygulanan makaron tekniğinin metanol/su çözücüsü ile ekstraksiyonda daha verimli bir yöntem olmasından kaynaklanmaktadır.

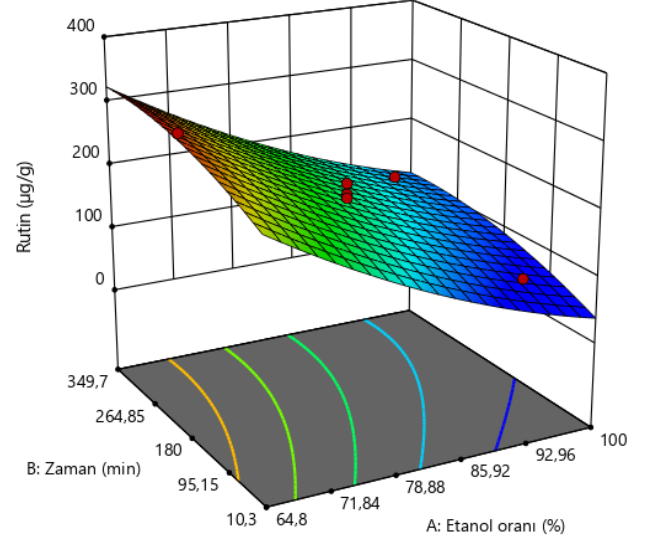
#### 4.5. Rutin için Yüzey Cevap Analizi (Response Surface Analysis for Rutin)

Bağımsız parametrelerin birbirleriyle etkileşimlerini ve maksimum rutin eldesi için deneysel şartların gösteren üç boyutlu yüzey cevap grafiği Şekil 7'de verilmiş olup, topoğrafik grafikte z eksenini rutin'in miktarını, x ve y eksenleri ise bağımsız parametreleri göstermektedir.

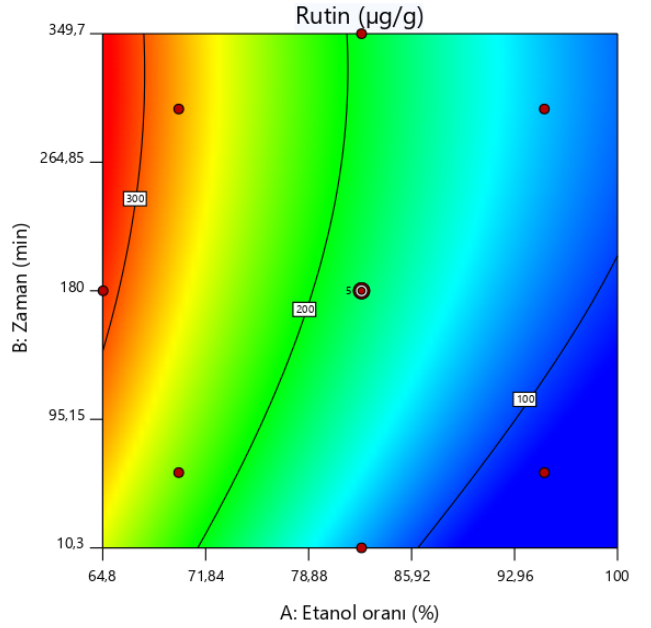
Bağımsız parametrelerin rutin miktarına etkilerini gösteren 2 boyutlu kontur grafiği Şekil 8'de verilmiştir.

Şekil 7 ve 8'den görülebileceği gibi rutin eldesinde, ekstraksiyonda süre artışının verime pozitif etkisi açıkça görülmekte iken etanol oranının artması ile verimin düştüğü gözlenmektedir. Literatürde etanol/su karışımlarında rutin'in

çözünürlüğünün ortamdaki bileşenlere göre artabildiği veya hydroxypropyl-beta-cyclodextrin gibi bileşiklerle yaptığı stabil komplekslerin varlığında çözünürlüğünün etanol oranı yükseldikçe azaldığına dair sonuçlar mevcuttur [20].



**Şekil 7.** Rutin için çalışma parametrelerinin 3 boyutlu gösterimi (3D presentation of operating parameters for Rutin)



**Şekil 8.** Rutin için kontur grafiği (Contour graph for rutin)

#### 4.6. Sc-CO<sub>2</sub> Ekstraksiyonu Sonuçları (The Results of Sc-CO<sub>2</sub> Extraction)

Literatürde birçok farklı ekstraksiyon yöntemi ile *juniperus exelsa* bitkisinin değişik kısımları ekstrakte edilmiş ve çeşitli sonuçlar verilmiştir. Deneysel tasarım metodunun uygulandığı sokslet yöntemi yanında güncel ve çevreci bir yöntem olan süper kritik karbondioksit ekstraksiyonu yöntemi uygulanmış ve 250 bar, 40°C, 0,25-0,35 mm



partikül büyüklüğü, 120 min, 5 l/min CO<sub>2</sub> akış hızı ve %5 w/w etanol ilavesi (0,57 ml/min) şartlarında paralel iki deney yapılmıştır. Bu iki deney sonucu elde edilen 33 ve 35 ml ekstraktlarda ortalama silibinin ve rutin miktarları sırasıyla 17,75 µg/g ve 52,45 µg/g olarak bulunmuştur. Bulunan miktarlar sokslet yöntemi verilerine oranla rutin için %16 seviyelerinde kalmışken silibinin için yaklaşık %92,5 olarak gerçekleşmiştir. Ekstraksiyon yöntemi farklılığı ile aktif maddelerin veya toplam fenolik/toplam flavonoid miktarlarının değişiklik gösterdiği literatürde mevcut olup, beş farklı yöntemle *Salvia viridis* yapraklarında yapılan bir çalışmada toplam fenolik ve toplam flavonoid miktarlarının Sc-CO<sub>2</sub> yöntemi değerlerinin sokslet yöntemi ile alınan değerlerin ancak % 20 si kadar olduğu görülmektedir [21]. Sc-CO<sub>2</sub> yönteminin düşük veriminin nedenleri olarak, polar yapıdaki CO<sub>2</sub>'in çözücü olarak genellikle apolar yapıdaki fenolikler vb. bileşikler daha az çözmesi, yardımcı polar çözücü ilavesinin süper kritik şartların bozulmaması için sınırlı oranlarda kalması, Sc-CO<sub>2</sub> de yarı kesikli reaktör tipinde çalışma yapıldığı için temas süresinin görece kısa olması, yüksek çözücü hızlarında ekstraktör içinde kanallar ve girdaplar oluşmasının verimi düşürmesi, nedenler olarak gösterilebilir.

## 5. SONUÇLAR (CONCLUSIONS)

Bu çalışma ile boylu ardıç (*Juniperus excelsa* M. Bieb) bitkisi meyvelerinin içerdiği silibinin ve rutin miktarları iki farklı ekstraksiyon yöntemi ile araştırılmıştır. Yüzey cevap metodu ile deneysel tasarımın yapıldığı ve merkezi birleşik tasarımın uygulandığı sokslet yöntemi ile literatürde ilk defa ardıç meyvesinde rutin yanında silibinin varlığı tespit edilmiştir. Ayrıca metod mukayesesi için Sc-CO<sub>2</sub> ekstraksiyonu da uygulanmıştır. Silibinin'in ve rutin'in kanser tedavisinde ve kanser önleyici mekanizmalarda faydaları literatürde geniş yer bulmaktadır. Ayrıca rutin'in COVID 19 virüsüne karşı yüksek inhibisyon etkisi ile tedavi edici etkisine dair çalışmalar da mevcuttur [7].

Bu çalışmada Sc-CO<sub>2</sub> yöntemi ile bulunan en yüksek miktarlar, rutin için 0,052 mg/g ve silibinin için 0,0178 mg/g olurken, sokslet yöntemi ile ulaşılan en yüksek miktarlar rutin için yaklaşık 6 kat artarak 0,3196 mg/g ve silibinin için 1,05 kat artarak 0,019 mg/g olmuştur. Literatürde silibinin'e ait araştırma olmadığı için yalnız Sc-CO<sub>2</sub> ve sokslet yöntemlerine ait veriler kıyaslanmıştır.

Silibinin ve rutin maddelerinin gıda takviyelerinde ve ilaç sanayinde kullanımları bakımından bu araştırmanın boylu ardıç meyvesinin tespit edilen potansiyeline katkı sağladığı düşünülmektedir. Tasarım modeli ile deneysel verilerin uygunluğu Anova veri analizi ile kontrol edilerek optimum çalışma koşulları belirlenmiş sokslet yöntemi için bu şartların her iki bileşik için 283,67 dakika ekstraksiyon süresi ve %64,82 etanol oranı olduğu bulunmuş, ortalama 0,3 mm partikül büyüklüğündeki numunelerde ve 78,37- 78,86°C sıcaklık aralığında çalışılmıştır. Sokslet yönteminde en yüksek silibinin 0,019 mg/g olurken rutin 0,3196 mg/g değerine ulaşmıştır. Bu çalışmada 2. derece polinomial

tasarım denklemi kullanılmış, Anova analizi ile deneysel verilerin uyumlu olduğu gözlenmiştir. Bu araştırma ile endüstriyel çalışmalar için işlem süresi ve etanol oranının önemli parametreler olduğunu, etkileşen terimler açısından silibinin eldesinde bu iki parametrenin çarpımlarının çok etkili olduğu bulunmuştur. Design Expert programınca öngörülen optimum koşulların ve gözlenen deneysel sonuçlarının, farmasötik endüstrisinde proses mühendisleri tarafından ölçek büyütürerek kullanılabilirliği bu çalışmanın katkılarındanır.

## TEŞEKKÜR (ACKNOWLEDGEMENT)

Bu çalışmanın yapılması sırasında katkıları bulunan Gamze Çiftçi'ye içtenlikle teşekkürlerimizi sunarız.

## KAYNAKLAR (REFERENCES)

1. Guvenc A., Hurkul M.M., and Erdem A., The leaf anatomy of naturally distributed *Juniperus L.* (Cupressaceae) species in Turkey. *Turkish Journal of Botany*, 35 (3), 251-260, 2011.
2. Tümen İ., Hafizoğlu H., Türkiye'de yetişen ardıç (*Juniperus l.*) Terpene groups in essential oils of *Juniperus l.* cones and leaves of grown in Turkey. *Journal of Bartın Faculty of Forestry*, 5 (5), 88-95, 2003.
3. Zivic N., et al., Phytochemical and antioxidant screening of some extracts of *Juniperus communis L.* and *Juniperus oxycedrus L.* *Czech Journal of Food Sciences*, 37 (5), 351-358, 2019.
4. Souravh B., Nitán R., Shandeep S., A Phytopharmacological Review on a Medicinal Plant: *Juniperus communis*. *International scholarly research notices*, 2014, 1-6, 2014.
5. Gur M., et al., Some Important Plants for Epilepsy Treatment: Antioxidant Activity and Flavonoid Compositions. *Iranian Journal of Science and Technology Transaction a-Science*, 42 (A4), 1847-1857, 2018.
6. Yaglioglu, A.S. and F. Eser, Screening of some *Juniperus* extracts for the phenolic compounds and their antiproliferative activities. *South African Journal of Botany*, 113, 29-33, 2017.
7. Al-Zahrani, A.A., Rutin as a Promising Inhibitor of Main Protease and Other Protein Targets of COVID-19: In Silico Study. *Natural Product Communications*, 15 (9), 2020.
8. Oseka M.K., et al., The influence of the oral treatment of alpha-lipoic acid, vitamins B1 and B2 and rutoside on morphological and functional retinal properties in patients with diabetic retinopathy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 61 (7), 2020.
9. Khan F., et al., Anti-Cancerous Effect of Rutin Against HPV C33A Cervical Cancer Cells via G0/G1 Cell Cycle Arrest and Apoptotic Induction. *Endocrine Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets*, 20 (3), 409-418, 2020.
10. Pares A., et al., Effects of silymarin in alcoholic patients with cirrhosis of the liver: results of a controlled,

- double-blind, randomized and multicenter trial. *Journal of Hepatology*, 28 (4), 615-621, 1998.
11. Lesjak M., et al., Bioactivity and chemical profiling of the *Juniperus excelsa*, which support its usage as a food preservative and nutraceutical. *International Journal of Food Properties*, 20, 1652-1663, 2017.
  12. Alqasoumi S.I. and Abdel-Kader M.S., Terpenoids from *Juniperus procera* with hepatoprotective activity. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 25 (2), 315-322, 2012.
  13. Mouahid A., Dufour C., and Badens E., Supercritical CO<sub>2</sub> extraction from endemic Corsican plants; comparison of oil composition and extraction yield with hydrodistillation method. *Journal of CO<sub>2</sub> Utilization*, 20, 263-273, 2017.
  14. Ferrentino G., et al., Supercritical fluid extraction of oils from apple seeds: Process optimization, chemical characterization and comparison with a conventional solvent extraction. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 64, 2020.
  15. Çelik H.T. and Gürü M., Extraction of oil and silybin compounds from milk thistle seeds using supercritical carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids*, 100, 105-109, 2015.
  16. Ghoreishi S.M., Hedayati A., and Mohammadi S., Optimization of periodic static-dynamic supercritical CO<sub>2</sub> extraction of taxifolin from *pinus nigra* bark with ethanol as entrainer. *Journal of Supercritical Fluids*, 113, 53-60, 2016.
  17. Nuralin L., et al., Optimisation of quercetin amount via response surface methodology for *elaegagnus* seeds by supercritical CO<sub>2</sub> extraction method, *Journal of the Faculty of Engineering and Architecture of Gazi University*, 32 (4), 1233-1241, 2017.
  18. Bezerra M.A., et al., Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76 (5), 965-977, 2008.
  19. Bijak M., Silybin, a Major Bioactive Component of Milk Thistle (*Silybum marianum* L. Gaernt.)-Chemistry, Bioavailability, and Metabolism. *Molecules*, 22 (11), 2017.
  20. Pham T.L., et al., Effect of cyclodextrin types and reagents solvation on the stability of complexes between B-cyclodextrins and rutin in water-ethanol solvents. *Journal of Molecular Liquids*, 318, 2020.
  21. Zengin G., et al., Metabolomic profile of *Salvia viridis* L. root extracts using HPLC-MS/MS technique and their pharmacological properties: A comparative study. *Industrial Crops and Products*, 131, 266-280, 2019.