



Süper kritik CO₂ özütlemesi ile iğde çekirdeklerinden quercetin miktarının yüzey cevap metodu ile optimizasyonu

Levent Nuralın^{1*}, Ayşe Tosun¹, Fatma Erol², Fatma Betül Akgün¹, Metin Gürü¹

¹Gazi Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, 06570, Maltepe, Ankara, Türkiye

²Gazi Üniversitesi Teknik Bilimler MYO 06374 Ostim, Ankara Türkiye

Ö N E Ç I K A N L A R

- Süper kritik CO₂ ile antioksidan içeren özüt eldesi
- Quercetin'in kanser önleyici özellikleri
- İğde çekirdeğinin quercetin içeriği

Makale Bilgileri

Geliş: 05.08.2016

Kabul: 24.02.2017

DOI:

10.17341/gazimmfd.369655

Anahtar Kelimeler:

İğde,
süper kritik karbon dioksit,
quercetin,
deneysel tasarım

ÖZET

Bu çalışma ile iğde çekirdeğinin süper kritik karbon dioksit çözücüsü ile özütlenmesi yöntemi kullanılarak çekirdek özütünün elde edilmesi ve UV dedektörlü HPLC cihazı ile içerdiği quercetin miktarının belirlenmesi gerçekleştirildi. Deneysel sonuçlar "Design Expert 7.0 (deneme)" programı kullanılarak analiz edildi. Özütleme koşullarındaki sıcaklık ve basınç artışının quercetin miktarında önemli bir artışa neden olduğu görüldü. Partikül boyutu ve özütleme süresi parametreleri çalışmanın başında parametrik olarak çalışıldı ve bu parametreler quercetin miktarının en yüksek olması prensibine göre belirlendi. Çalışmalarda küçük partikül boyutunun 0,5 mm ve 120 min özütleme süresinin uygun olduğu belirlendi. Bu parametrelerin belirlenmesinden sonra basınç ve sıcaklık optimizasyonu için yüzey cevap yöntemi ile belirlenen deneysel tasarım deneysel şartları kullanıldı. En yüksek quercetin miktarına ulaşmak için yapılan çalışmalar ile optimize edilen sıcaklık ve basınç değerleri 65°C ve 311 bar olarak belirlendi. En yüksek yağ miktarı ise 48,68 mg/g numune olarak kaydedildi. Dizayn modelinin sunduğu optimum şartlardaki kontrol deneyleri sonrasında quercetin miktarı deneysel olarak 9,44 µg quercetin/100 g numune olarak ve Desing Expert 7.0 (deneme) programınca tahmin edilen 9,49 µg quercetin/100 g numune değerine oldukça yakın şekilde ve modele uygun olarak bulunmuştur.

Optimisation of quercetin amount via response surface methodology for elaeagnus seeds by supercritical CO₂ extraction method

H I G H L I G H T S

- Antioxidant including oil obtaining by supercritical CO₂
- Cancer preventive properties of quercetin
- Quercetin content of elaeagnus angustifolia seed

Article Info

Received: 05.08.2016

Accepted: 24.02.2017

DOI:

10.17341/gazimmfd.369655

Keywords:

Elaeagnus,
supercritical carbon dioxide,
quercetin,
experimental design

ABSTRACT

In this study, extract of elaeagnus angustifolia seed was obtained by supercritical carbon dioxide solvent method and measured the amount of quercetin by using HPLC equipped with UV detector. Experimental results were analyzed by using "Design Expert 7.0 (demo)" program. Increasing temperature and pressure at about extraction conditions caused a significant increase of quercetin amount. Particle size and extraction period parameters was studied parametrically at the start of this study and identified these parameters according to maximize amount of quercetin. After parametric experiments, the small particle size 0.5 mm and experiment period 120 min were found suitable for this study. After identification of these parameters, experimental design conditions identified by response surface design method were used to optimize pressure and temperature, we optimized temperature and pressure parameters as 65°C and 311 bar to maximize quercetin amount. Maximum oil amount was measured 48.68 mg/g sample. After checking experiments of optimum conditions provided by design method, quercetin amount was found experimentally 9.44 µg quercetin /100 g sample, it was considerably approximate value and favourably to model for estimated 9.49 µg quercetin /100 g sample by Design Expert 7.0 (demo) program.

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: leventnuralin@gazi.edu.tr / Tel: +90 505 346 5266

1. GİRİŞ (INTRODUCTION)

Bilim adamları çeşitli bitkilerde 5000 in üzerinde flavonoid bileşimini karakterize etmişlerdir [1]. Flavonoidler, polifenollerin alt gurubu olup, bitkiler tarafından sentezlenen en büyük gruptur. Sebze ve meyvelerde bulunmaktadır. Flavonoidler antioksidan, antimikrobiyal, antiviral ve antibakteriyel özelliklere sahiptirler [2]. Sağlıklı yaşamı desteklemek, yaygınlaştırmak ve hastalıkları azaltmak için verilerin incelendiği epidemiyolojik kanıtlar, zengin antioksidan özelliği olan meyve ve sebzelerin tüketilmesi ile antioksidanların kanser kaynaklı ölümleri ve kanser görülme sıklığını azaltmakta etkili bileşikler olabileceğini göstermiştir [3, 4]. Flavonoidlerin kansere karşı etki mekanizmalarını için, kanser hastalıklarına neden olan maddelerin pasifize etmeleri, kontrolsüz hücre artışının engellenmeleri, hücre dönüşümünü askıya almaları, anormal hücrelerin ölümü sürecinde, kan damarlarının çoğalmasını baskılamaları, antioksidasyon ve çoklu ilaç direncinin azaltılması ile de tüm bu mekanizmaların kombinasyonu için etkin bileşikler oldukları bulunmuştur [4]. Laboratuvar çalışmaları ile antioksidan özellikleri ve serbest radikal yakalama özellikleri kanıtlanmış olan flavonoidler günümüzde anti kanser amaçlı olarak önleyici tedavilerde sıklıkla kullanılmakta, kısmen ticari ürünler haline gelmiş bulunmaktadır. Artan kanser görülme sayıları nedeniyle flavonoidlerin etki mekanizmalarının araştırılması, tedavi sürecine katkıları, metabolik reaksiyonlardaki fonksiyonları, bileşen dağılımları, bitkisel kaynakları ve elde edilme yöntemleri gibi alanlarda bilim adamlarının flavonoidlere ilgisinin artmasına neden olmuştur.

Tedavi amaçlı geleneksel bitkisel ilaç kullanım pazarı Asya Avrupa ve kuzey Amerika tüketimleri esas alındığında 2006 da 90 milyar dolar iken 2011 de 200 milyar dolara ulaşmış bulunmaktadır. Bu gelişim hızı ile 2050 yılında 5 trilyon dolarlık bir pazar olması beklenmektedir [5]. Çeşitli bitkisel kaynaklı besinler ve içecekler (sebzeler, meyveler, sebze ve meyve suları, çaylar, kakao, bal, üzüm vb.) flavonoid bakımından zengin kaynaklardır. Kimyasal yapılarına göre flavonoidlerin flavanoller gurubunda bulunan bileşiklerinden olan ve bitkilerde yaygın olarak bulunan quercetin etkinliği bakımından dikkat çekici bir flavonoiddir. Bu çalışmada ekonomik değeri olmayan iğde çekirdeğinden quercetin eldesi gerçekleştirilmiştir. Günümüzde ticari ürün olarak quercetin tabletlerin piyasada satışı yapılmaktadır. Deney tasarımı, parametrelerinin deneysel süreç içerisinde bilinmeyen özelliklerinin belirlenmesi ve değişkenler arasındaki etkileşimlerin analizi ve modellenmesi için güçlü bir istatistiksel yöntemdir [6].

Merkezi Kompozit Tasarım (MKT), Yüzey Cevap Yöntemi (YCY) içerisinde bulunan ve en çok kullanılan istatistiksel optimizasyon yöntemidir. Merkezi Kompozit Tasarım ardışık deneysel çalışmalar için çok uygundur. Söz konusu tasarım yönteminde en yüksek faktör düzeyi, en düşük faktör düzeyi ve faktörler için orta düzey sırasıyla +1, 0 ve -1 sayıları ile sembolize edilir [7]. Varyans analizi bağımsız

değişkenlerin kendi aralarında nasıl etkileşime girdiklerini ve bu etkileşimlerin bağımlı değişken üzerindeki etkilerini analiz etmek için kullanılır.

Literatürde, Kuşburnunun süper kritik özütlemesi ile cyanidin ve alpha-tocopherol varlığına ait çalışmalar mevcuttur [8]. Yine süper kritik ekstraksiyon yöntemi ile, farklı bitkisel kaynaklar kullanılarak yapılan çalışmalarda, basınç ve sıcaklık değişkenlerinin, kendi aralarında nasıl etkileşime girdikleri ve bu etkileşimin elde edilen ürün üzerindeki etkilerini inceleyen çalışmalar mevcuttur. Porsuk bitkisinden quercetin, ginkgetin ve amentoflavone maddelerinin süper kritik yöntemle özütlenmesinde quercetin için 24 MPa 46°C ve 2,3 h sürede 3,73 mg/g değeri elde edilmiştir [9]. İğde çekirdeği ve yaprağı için etanol/aseton çözücüsünün geleneksel özütleme yöntemiyle gerçekleştirilen çalışmada verimi artırdığını ve iğde çekirdeğinin 2 yöntemle analizinde sırasıyla 274 µM/g ve 255 µM/g toplam antioksidana sahip olduklarını toplam antioksidan kapasitesi olarak tespit etmişlerdir [10]. Süper kritik karbon dioksit özütleme yöntemiyle, çay bitkisinin bitki saplarından 14,9 mg/g ve bitki atık liflerinden 19,2 mg/g kafein özütlenmiştir [11]. Bu tür değersiz kaynaklardan ticari değeri olan ürünlerin elde edilmesine yönelik çalışmalar hızla artmaktadır.

Bu çalışmada, süper kritik şartların sağlandığı ve CO₂'in (C_p kritik nokta ile başlayan alan içinde olan, P_c kritik basınç ve T_c kritik sıcaklık değerlerinin üzerinde olan şartlardır) çözücü olarak kullanıldığı özütleme işlemi ile optimize edilerek gerçekleştirilmesi amaçlandı. Elde edilen özütler literatüre uygun olarak -5°C sıcaklıkta dondurucuda muhafaza edildi [12]. Özütler gerekli numune hazırlama ve süzme işlemlerinden geçirilerek hazırlandı. Quercetin standardının temini ve HPLC cihazında uygun yöntemin oluşturulması ile kalibrasyon işlemlerinin yapılmasından sonra numunelerin UV dedektörlü HPLC cihazında 256 nm de nicel analizleri gerçekleştirildi. Parametrik çalışmalar ile özütleme süresi ve partikül boyutu optimize edildikten sonra Design Expert 7.0 (deneme) sürümü kullanılarak basınç ve sıcaklık modellemesi yapıldı. Çalışmanın bu kısmı için iğde çekirdeklerinden, süper kritik özütleme yöntemi ile elde edilen quercetin miktarı üzerine sıcaklık basınç parametrelerinin etkileri incelendi ve literatür ile karşılaştırıldı. MKT yöntemine göre tasarlanan deneylerde ulaşılan sonuçlar ANOVA ile değerlendirildi, faktörlerin istatistiksel önemleri araştırıldı.

2. MATERYAL VE METOT (MATERIAL AND METHOD)

2.1. Kimyasallar (Chemicals)

Çalışmada kullanılan iğde numunesi Malatya bölgesinden temin edildi. Standart madde olarak quercetin (%95 saflıkta) Merck firmasından, çözücü olarak analitik saflıktaki etanol, mobil faz olarak analitik saflıktaki metanol, yine mobil faz olarak analitik saflıktaki asetonitril, mobil faz katkısı olarak analitik saflıktaki formik asit Merck firmasından temin

edildi. Çözücü olarak kullanılan sifonlu tüpteki karbon dioksit Oksan firmasından temin edildi. Deneylerde, yıkama ve analiz işlemlerinde kullanılan bidestile saf su SGE firmasına ait ters ozmos de iyonize saf su cihazından elde edildi ve kullanıldı.

2.2. Numune Hazırlama (Sample Preparation)

Çalışmamızda kullanılan iğdeler olgunlaşmış meyvelerden seçildi. Olgunlaşmış meyvelerde flavonoid miktarlarının daha yüksek olduğu bilinmektedir [13]. İğdelerden çekirdekleri temizlenerek çıkartıldı ve kurutulmak üzere 30°C'deki Nüve marka etüvde 2 gün süreyle bekletilerek kurutuldu. Süper kritik karbon dioksit (SCCO₂) uygulaması öncesi biyolojik materyalde su veya nem kalmaması gerekmektedir. Mevcut suyun özütleme işleminde difüzyona bariyer etkisi oluşturarak verimi düşürmesi nedeni ile özütleme verimi açısından uzaklaştırılması oldukça önemlidir. İğde çekirdekleri önce çeneli kırıcıda kırıldı sonrasında Retsch marka bitki değirmeninde öğütülerek istenen boyuta indirildi. Boyut sınıflandırması elek analizi yapılarak 3 farklı tanecik büyüklüğü şeklinde yapıldı. 1,19 mm - 1 mm arası boyuttakiler, 1 mm - 0,710 mm arası boyuttakiler ve 0,710 mm - 0,350 mm arası boyuttaki tanecikler ayrılarak deneyler için hazırlandı. Bu sınıflandırma büyük orta ve küçük boylar için sırasıyla ortalama 1 mm, 0,85 mm ve 0,5 mm şeklinde belirtildi. Süper kritik özütleme öncesi ve sonrası alınan numuneler SEM cihazında görüntülenebilmesi için Jeol marka cihazın Au ve Pd kaplama ekipmanında 3 kat 3'er min süreyle metalik kaplamaya tabi tutuldu.

2.3. Süper Kritik Karbon Dioksit Özütlemesi (Supercritical Carbon Dioxide Extraction)

Özütleme işlemi laboratuvar ölçekli olan Amerikan Applied separation marka süper kritik özütleme cihazında, 24 ml'lik

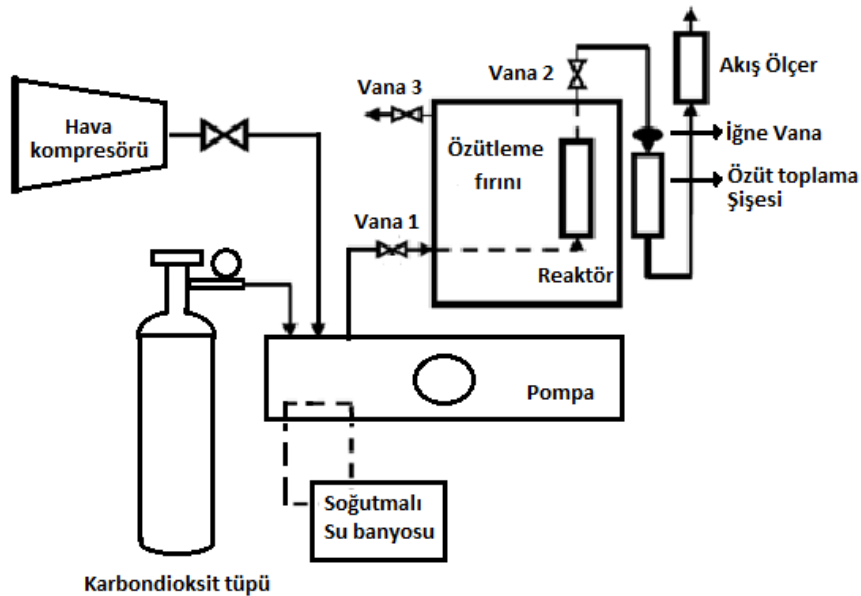
özütleme reaktörü kullanılarak gerçekleştirildi. Sıcaklık basınç ve karbon dioksit akış hızının kontrol edilebildiği cihazda ön denemeler sonrası belirlenen 8 g'lık numuneler şeklinde çalışmalar yapıldı, özütler 40 ml hacimli silikon kapaklı numune toplama şişelerine 120 min süreyle alındı (Şekil 1).

Yüzey cevap deneysel tasarım uygulaması öncesi verimin daha yüksek olması için, sabit tutulacak diğer parametreleri olan özütleme süresi ve partikül boyutu için 30 - 120 min aralığında özütleme süresi 0,5 - 1 mm aralığında ideal partikül boyutu için parametrik çalışmalar gerçekleştirildi.

2.4. Quercetin'in Nicel Analizi (Quantitative Analysis of Quercetin)

Quercetin maddesi standart madde olarak temin edildikten sonra Amerikan Dionex marka 680 model UVD 170U dedektörlü HPLC cihazı ve cihaza takılı C18 RP 10 cm x 3 mm 2,7 µm tipte Sigma marka HPLC kolonu kullanılarak analiz edildi. Analiz için hareketli faz A'nın %0,1 oranında formik asit içeren bidestile saf su ve B'nin %75 asetonitril ve %25 metanol içeren karışımı kullanıldı. Gradyent çalışma programı t=0 min de %80 A ve %20 B başlangıç oranı, 0-5 min arası %20 den %40 a B artışı, 5-10 min arası %40 dan %70 e B artışı, 10-15 min arası %70'den %20'ye B azalışı ve 15-20 min arası yine başlangıç oranı olan %80 A ve %20 B karışım oranları olacak şekilde toplam 20 min lik program ile çalışıldı. A ve B taşıyıcı fazları toplamda 0,5 ml/min'lik sabit akış hızında ve UV dedektörü ise 256 nm dalga boyunda çalışıldı. HPLC sisteminde manual enjeksiyon portu ve 20 µl'lik enjeksiyon haznesi kullanılarak enjeksiyon işlemi gerçekleştirildi.

Quercetin nicel analizi için 5 noktalı kaibrasyon eğrisi hazırlandı ve tekrarlanabilir iki ölçümün ortalamaları alınarak kalibrasyon eğrisi 0,05-50 ppm'lik konsantrasyon aralığında hazırlandı.



Şekil 1 Süper kritik akışkan özütleme sistemi gösterimi (Current scheme of supercritical fluid extraction system)

2.5. SEM Görüntülerinin Alınması (Taking of SEM Images)

İdeal şartların belirlenmesinden sonra süper kritik karbon dioksit özütlemesi öncesinde ayrılan numune ile işlem sonrasında ayrılan numunelerin gözenek yapılarındaki değişimin kıyaslanması amacıyla Jeol marka JSM-6360 LV model SEM cihazı kullanılarak ilgili görüntüler alınmıştır. Numune yüzeyleri iletken olmadığı için aynı marka kaplama ekipmanı ile Au-Pd ile metalik kaplamaları yapılarak analiz edilmiştir.

3. SONUÇLAR VE TARTIŞMALAR (RESULTS AND DISCUSSIONS)

Deneysel tasarım ile yapılan çalışmalarda, 3 parametre ve fazlası için tasarım uygulamalarının sonuçlarının yorumlanması güçleşmektedir. Bu nedenle deneysel tasarım ile en önemli olan iki parametre olan basınç ve sıcaklık parametreleri optimize edilirken diğer parametreler olan partikül boyutu ve özütleme süresine ait çalışmalar parametrik olarak deneysel tasarım planlaması öncesinde çalışıldı.

3.1. Özütleme Süresi ve Partikül Boyutu için Parametrik Çalışmalar (Parametric Studies for Extraction Time and Particle Size)

Özütleme süresinin belirlenmesi için, reaktöre yüklenen 8 g lık bir iğde çekirdeği numunesinden 0-30 min, 30-60 min, 60-90 min ve 90-120 min aralıklarında farklı 4 adet numune toplama kabına alınan özütlerin bağımlı değişken olan yağ miktarları ölçüldü ve quercetin miktarları analiz ile hesaplandı. HPLC cihazı ile analizler yapılarak quercetin miktarının bir numuneden zamana bağlı geliş miktarları hesaplandı. Literatüre uygun olarak 120 min süre boyunca [14], 200 bar, 35°C ve 5 L/min CO₂ akış hızında elde edilen özütteki quercetin ve yağ miktarları zamanla alınan numunelerden ölçüldü. Bu verilerden elde edilen sonuçlar kaydedilerek bağımlı değişken olarak quercetin miktarları ve yağ miktarları bağımsız değişken olarak Şekil 2'deki grafik ile verildi.

Şekil 2 ile verilen çalışma, orta boyuttaki 0,85 mm lik numune ile 200 bar basınç, 35°C sıcaklık, 5 L/min CO₂ akış hızında ve 8 g numune kullanılarak gerçekleştirildi. parametrik çalışmalardan özütleme süresi için özüt içindeki quercetin'in ilk 30 min de hızla arttığı sonra 60 min, 90 min ve 120 min'de gelen miktarların giderek azaldığı görüldü. Deneylere madde kaybının mümkün olduğunca az olması için 120 min olarak belirlenen özütleme süresi sabit tutularak devam edildi.

Partikül boyutunun verim üzerindeki etkilerini belirlemek üzere, belirlenen 3 farklı boyutta hazırlanan 3 adet numune literatüre uygun olarak belirlenen 200 bar [12], 35°C, 5 ml/min CO₂ akış hızında ve 120 min süreyle özütlendi ve bu üç numunenin yağ miktarları ölçüldü ve quercetin miktarları hesaplandı. Elde edilen sonuçlar Şekil 3'te grafiğe geçirildi. Deneyler 120 min süre, 200 bar basınç, 35°C sıcaklık, 5 L/min CO₂ akış hızı şartlarında yapıldı. Şekil 3'ten

görülebileceği gibi küçük partikül boyutu olan 0,5 mm'lik boyutta çalışmaların sürdürülmesinin verimi artıracacağı görüldü ve çalışmalara 0,5 mm'lik partikül boyutu sabit tutularak devam edildi. Bu parametrik verilerin alınmasından sonra partikül boyutu için 0,5 mm ve özütleme süresi için 120 min'lik toplam süre sabit tutularak deneysel tasarım aşamasına geçildi. Quercetin miktarına basınç ve sıcaklığın etkisini belirlemek için yüzey cevap deneysel tasarım çalışması gerçekleştirildi.

3.2. Deneysel Tasarımı ve Analizi (Design Of Experiment and Analysis)

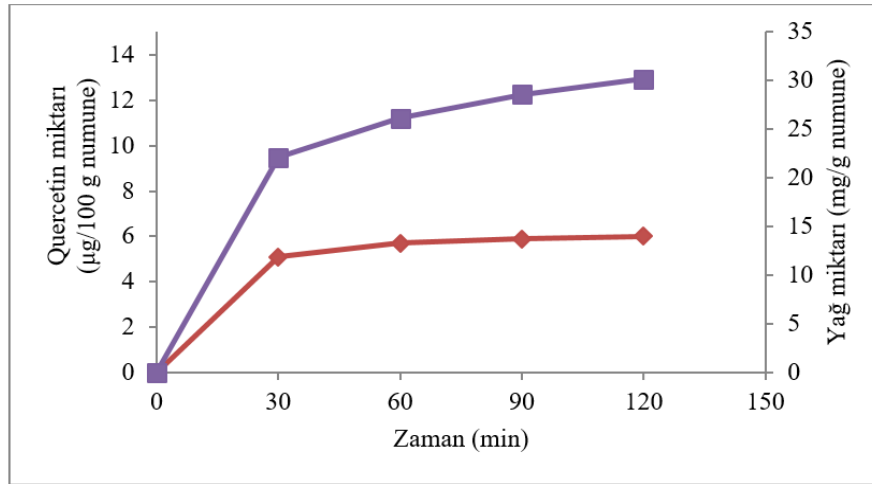
3.2.1. Basınç ve sıcaklık için yüzey cevap yöntemi deneysel tasarımı (Response surface experimental design for pressure and temperature)

Özütleme veriminin basınç ve sıcaklıkla etkileşiminde çözülen maddenin sıcaklıkla değişen buhar basıncının ve difüzyon katsayısının (D) değişimi, özütleme işleminde etkindir. Basınç artışı verimi artırırken sıcaklık artışında CO₂ yoğunluğu azalmakta aynı zamanda maddenin buhar basıncı arttığı için gaz faza geçişler artarak elde edilen madde miktarı bazı durumlarda artmaktadır. Ancak daha yüksek sıcaklıklarda CO₂'in çözme gücü yoğunluğun düşmesiyle azaldığı için özütlenen maddenin buhar basıncının sıcaklıkla hızla artması veya daha yavaş artmasına bağlı olarak elde edilen madde miktarı artabilmekte veya düşebilmektedir. Sıcaklık etkisi bu nedenlerden dolayı özütleme işleminde daha karmaşıktır [15].

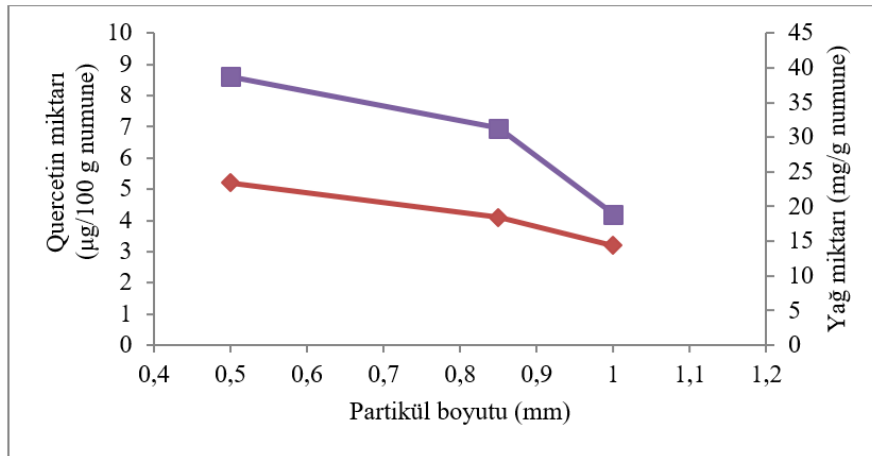
Basınç ve sıcaklık faktörleri sırasıyla A, B ve cevap değerleri olan quercetin Y1 sembolleri ile simgelendi dizayn programı tarafından önerilen deney şartları ve deneylerde elde edilen toplam yağ miktarları, hesaplanan quercetin miktarlarına ait deneysel sonuçlar Tablo 1'de verildi.

Program tarafından önerilen ve sonuçların uyumluluk gösterdiği modelin istatistiksel önemi Tablo 2'de gösterilen ANOVA testi ile değerlendirildi. Bu değerlendirmede F ve p değerleri göz önünde bulunduruldu ve istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilebilmesi için p değerinin 0,05'ten küçük olması durumu gözetildi. Sonuçlar incelendiğinde önerilen modelin p değerinin 0,005'den küçük olduğu görüldü. Bu durum önerilen modelin söz konusu çalışma için geçerli olduğu sonucuna varıldı.

P değeri 0,05'ten küçük olan model terimlerinin anlamlı olduğu ve P değeri 0,1'den büyük olan model terimlerinin anlamsız olduğu bilinmektedir. Bu durum göz önünde bulundurulursa Tablo 2'de verilen ANOVA testi sonuçlarından istatistiksel olarak, önem sırasına göre B ve A'nın önemli parametre olduğu görülmektedir. Anova testi kullanılan model, cevap ve bağımsız değişkenler arasındaki gerçek ilişkiyi vermektedir. İyi bir model cevaptaki değişimin tümünü açıklar. Regresyon katsayısı bu kriter için önemli bir ölçüdür ve model tarafından açıklanan değişimin toplam değişime bölünmesi ile hesaplanır. R² değeri 1'e yaklaştıkça gözlenen ve tahmin edilen değerler arasındaki ilişki daha iyi olur. Bu çalışmada, model için regresyon katsayısı R² = 0,82 olarak belirlenmiştir.



Şekil 2 Quercetin ve yağ miktarının zamana karşı değişimi (■) çekirdek yağı (♦) quercetin miktarı
(Changing of quercetin and oil amount by the time (■) seed oil (♦) quercetin)



Şekil 3 Quercetin miktarının ve yağ miktarının partikül boyutu ile değişimi (■) çekirdek yağı (♦) quercetin miktarı
(Changing of quercetin and oil amount by particle size (■) seed oil (♦) quercetin)

Tablo 1. Quercetin optimizasyonu için MKT deneyleri verileri ($\alpha=1,41421$) (Quercetin optimisation for CCD experiments values)

Deney No	MKT Deney Matrisi		Faktör 1 A: Basınç (bar)	Faktör 2 B: Sıcaklık (°C)	Cevap Y1: Quercetin µg/100 g numune 100 g numune	Yağ miktarları mg/g numune
	A	B				
1	0	0	205,00	48,50	4,85	43,36
2	0	0	205,00	48,50	4,69	37,61
3	- α	0	98,93	48,50	2,75	11,50
4	0	0	205,00	48,50	6,85	42,91
5	+ α	0	311,07	48,50	7,55	22,41
6	-1	+1	130,00	60,00	5,12	36,01
7	-1	-1	130,00	37,00	2,43	36,55
8	0	- α	205,00	32,24	1,83	36,90
9	+1	-1	280,00	37,00	2,54	34,76
10	+1	+1	280,00	60,00	7,01	21,35
11	0	+ α	205,00	64,76	8,36	23,72
12	0	0	205,00	48,50	5,39	37,01
13	0	0	205,00	48,50	5,66	48,68

ANOVA testi doğrultusunda elde edilen quercetin miktarını basınç ve sıcaklık parametrelerinin bir fonksiyonu olarak veren model eşitliği (Design Expert 7.0 (deneme) yazılımı tarafından önerilen) gerçek ve kodlanmış değerler cinsinden sırasıyla Eş. 1 ve Eş. 2’de verilmiştir.

$$\text{QUERCETİN} = +5.004\text{E-}003 + 1.098\text{E-}003 * \text{BASINÇ} + 2.050\text{E-}003 * \text{SICAKLIK} \quad (1)$$

$$\text{QUERCETİN} = -6.64511\text{E-}003 + 1.46409\text{E-}005 * \text{BASINÇ} + 1.78298\text{E-}004 * \text{SICAKLIK} \quad (2)$$

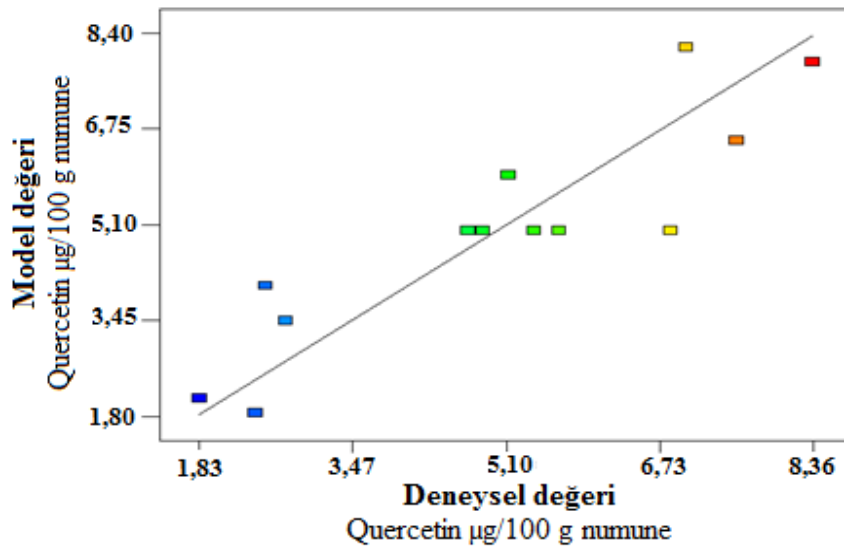
Elde edilen quercetin miktarının basınç ve sıcaklık parametreleri ile değişimleri ayrıca yüzey cevap yöntemi (YCY) ile incelenerek modelden elde edilen sonuçlar ve gerçek deneysel sonuçlar arasındaki ilişkiler çizilen model grafiği ile Şekil 4’te gösterilmektedir.

3.2.2. Üç boyutlu cevap yüzey grafiği (Three dimensional response surface graph)

Optimizasyon çalışmalarından sonra elde edilen sonuçlar Design Expert 7,0 (deneme) paket programı yardımıyla çizilen 3 boyutlu yüzey cevap grafiği ile de incelendi. İlgili yüzey cevap grafiği Şekil 5’te verildi. Şekil 5’deki grafik incelendiğinde, sıcaklık ve basınç değerleri arttıkça elde edilen quercetin miktarında artış görülmektedir. Teorik olarak süper kiritik karbon dioksit özütlemesinde basıncın özüt verimini doğru orantılı olarak artırdığı bilinmektedir. Literatür incelendiğinde deneysel sonuçların ve üç boyutlu model grafiklerin literatüre uygun olarak quercetin miktarı bakımından sıcaklık ve basınç artışı ile doğru orantılı olarak arttığı görülmektedir. [9]. Tablo 1’de verilen ve tekrarlı deneyler olan run 1, run 2, run 4, run 12 ve run 13 numaralı deneyler göz önüne alındığında, quercetin ve yağ

Tablo 2. Quercetin optimizasyonu için MKT ANOVA sonuçları (CCD Anova results for quercetin optimisation)

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F Değeri	p-değeri Prob > F	
Model	4.328E-005	2	2.164E-005	22,74	0,0003	Önemli
A Basınç	9.646E-006	1	9.646E-006	9,49	0,0126	
B Sıcaklık	3.363E-005	1	3.363E-005	35,99	0,0002	
Artık	1.050E-005	10	1.050E-006			
Uyum Eksikliği	7.566E-006	6	1.261E-006	1,33	0,3116	Önemli değil
Saf Hata	2.929E-006	4	7.323E-007			
Toplam	5.378E-005	12				



Şekil 4. Modelden elde edilen ve deneylerden bulunan sonuçlar arasındaki ilişki
(The relationship between results obtained from model and experiments)

miktarlarındaki salınım için süper kritik özütleme işlemindeki düşük CO₂ akış hızlarında kısmen kontrol edilemeyen dalgalanmaların ve buna bağlı olarak CO₂'in gazlaştırıldığı çıkış vanası sıcaklığı değişimlerinin etkin olması nedeniyle elde edilen yağ ve quercetin miktarlarında kabul edilebilir farkların oluştuğu düşünülmektedir.

3.2.3. Mkt yöntemi kullanılarak elde edilen quercetin miktarının optimizasyonu (Quercetin amount optimisation by using ccd method)

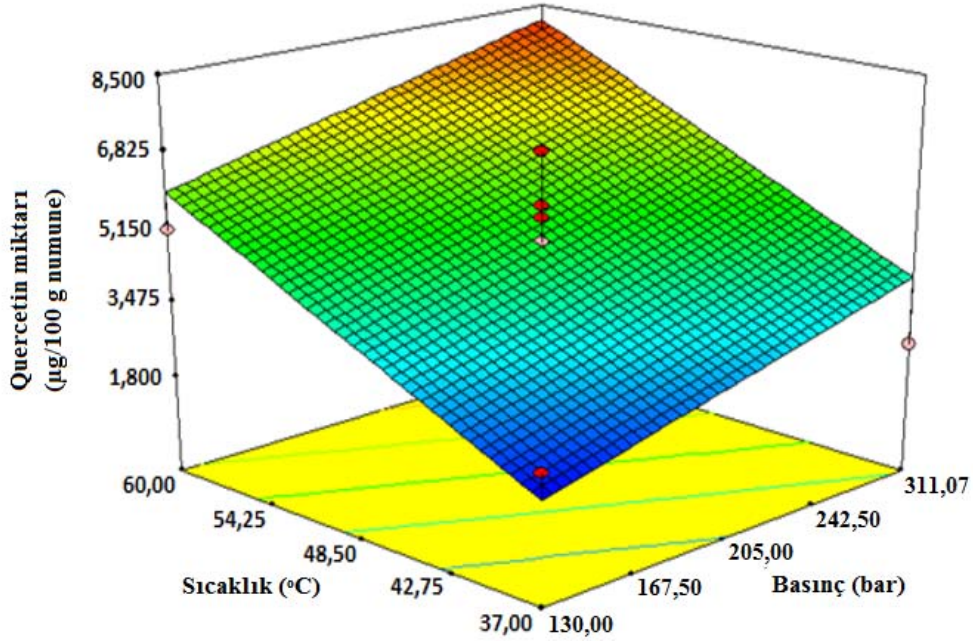
Optimizasyonu yapılacak bağımsız parametrelerin ve cevap değerlerinin aralıkları Tablo 3'de verilmiştir. YCY sonucunda çalışılan aralık için optimum şartlar Basınç: 311 bar Sıcaklık: 65°C olarak bulunmuştur. Modelden bu şartlardaki quercetin miktarı 9,50 µg/ 100 g numune olarak belirlenmiştir. Belirlenen bu optimum şartlarda yapılan deneysel çalışma sonucunda quercetin miktarı 9,44 µg/100 g numune olarak bulunmuştur. Önerilen modellerle hesaplanan değerler ve deneysel sonuçların yakınlığı, söz konusu modellerin çalışılan faktör aralıklarında kullanılabilirliğini göstermektedir.

3.3. Süper Kritik Özütleme Öncesi ve Sonrası SEM Görüntüleri

(Scanning Electron Micrographs of Before And After of Süper Kritik Carbon Dioxide Extraction)

İğde çekirdeği ile yapılan çalışmalar neticesinde 0,5 mm'lik partikül boyutundaki numuneler için süper kritik karbon dioksit özütlemesi öncesinde ayrılan numune ile aynı boyut için 311 Bar basınç, 65°C sıcaklık, 120 min süre, 5 L/min CO₂ akış hızı şartlarında süper kritik karbon dioksit özütleme işlemi sonrasında alınan numunelerin 250 ve 1000 kat büyütmedeki görüntüleri alınmış ve kıyaslanmıştır.

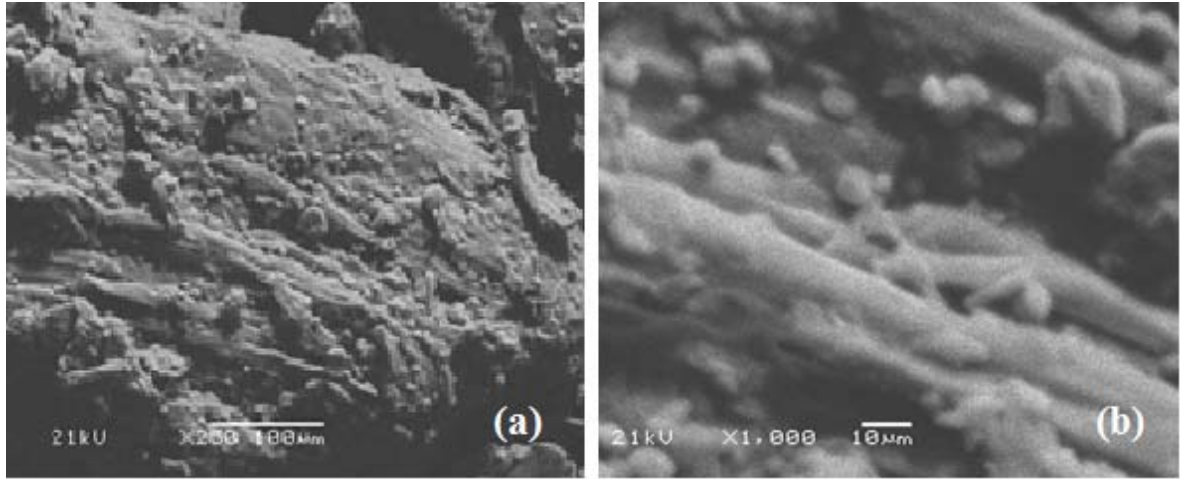
İğde çekirdeği süper kritik özütleme öncesi ve sonrası çeşitli büyütme oranlarında yapılan görüntülemelerde özütleme öncesinde çekirdek yapısında bulunan organik maddeler ve yağlardan dolayı yüksek büyütme net görüntü elde edilememiştir. Büyütme arttıkça görüntülerde dağınıklar meydana gelmiştir (Şekil 6b). Süper kritik özütleme sonrası ise çekirdek numunesi yapısında boşlukların oluştuğu 16 ila 26 µm'lik çaplarda gözeneklerin oluştuğu görülmüş ve net görüntüler alınmıştır (Şekil 7b).



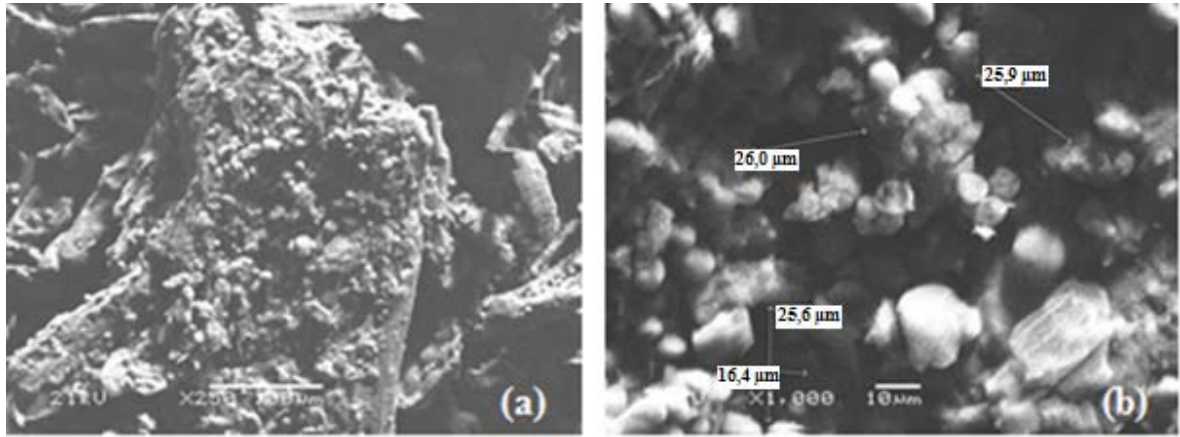
Şekil 5. Elde edilen quercetin miktarının sıcaklık ve basıncın fonksiyonu olarak üç boyutlu gösterimi
(Three dimensional graphics of the obtained amount of quercetin as function of temperature and pressure)

Tablo 3. Optimizasyon için bağımsız parametrelerin ve cevap değerlerinin aralıkları
(The ranges of independent parameters and respons values for optimisation)

Parametre	Amaç	Alt Sınır	Üst Sınır
A: Basınç (bar)	Aralıkta olması	99	311
B: Sıcaklık (°C)	Aralıkta olması	33	65
Y1: Quercetin µg/100 g numune	Maksimize etmek	1,83	8,36



Şekil 6. İğde çekirdeği numunesinin SCCO₂ işlemi öncesi 250 kat a) ve 1000 kat b) büyütülmüş görüntüleri (Images, before SCCO₂ extraction of elaeagnus angustifolia seed sample magnifications of 250 times a) and 1000 times b))



Şekil 7. İğde çekirdeği numunesinin SCCO₂ işlemi sonrası 250 kat a) ve 1000 kat b) büyütülmüş görüntüleri (Images, after SCCO₂ extraction of elaeagnus angustifolia seed sample magnifications of 250 times a) and 1000 times b)).

4. SONUÇLAR (CONCLUSIONS)

İğde çekirdeği ile gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda bu kaynakta bulunan quercetin miktarları hesaplandı. Karbon dioksitin çözücü olarak kullanıldığı ve numunede bulunan antioksidanların dolayısı ile quercetin özütlenmesi işlemi süper kritik şartlarda gerçekleştirildi. Özütlerin gerekli numune hazırlama ve süzme işlemleri sonrasında kromatografik yöntem olan HPLC analizleri ile kantitatif analizleri yapıldı. Literatürde iğde çekirdeğinin quercetin içeriğine ait çalışma olmamasına karşın, iğde meyvesinde bulunan antioksidan kapasitesi kabuk ve meyve kısmından etanol/aseton çözücüsüyle yapılan araştırmalarda aynı bitkinin çiçek ve yapraklarına oranla 4 kat daha yüksek antioksidan içeriğe sahip olduğu görülmüştür [10]. Aynı çalışmanın etanol/su karışımı ile yapılması ile kabuk ve meyve kısmı ile çekirdek ve yaprak kısmında yaklaşık aynı miktarlarda antioksidan bulunduğu görülerek iğde çekirdeğinde toplam 274 µM/g antioksidan değeri elde edilmiştir [10]. Bu çalışmada quercetin süper kritik özütlenmesinde optimum şartlar için öncelikle parametrik çalışmalar ile “uygun özütlenme süresi” ve “uygun partikül

boyutu” çalışmaları yapıldı. Ardından uygun basınç ve sıcaklık şartlarının belirlenmesinde “Design Expert 7.0 (deneme)” programı kullanılarak yüzey cevap deneysel tasarım metodu ile belirlenen deney şartlarına ait sonuçlar alındı. Özütlenme koşullarındaki sıcaklık ve basınç optimizasyonu ile quercetin miktarında en düşük değere göre 5,16 katlık büyük bir artış ile elde edildiği gözlemlendi. Quercetin miktarını maksimize etmek için yapılan çalışmalar ile optimize edilen sıcaklık ve basınç değerleri 65°C ve 311 bar olarak belirlendi. Dizayn modelinin sunduğu optimum şartlardaki kontrol deneyleri sonrasında Dizayn Expert 7.0 (deneme) programınca tahmin edilen quercetin miktarı 9,50 µg quercetin/100 g numune değerine oldukça yakın şekilde ve tasarım modeline uygun olarak deneysel çalışma ile 9,44 µg quercetin/100 g numune olarak tespit edildi. Süper kritik şartlar boyunca karbon dioksit için sıcaklık ve basınçla değişen, difüzyon katsayısı (D), yoğunluk (d) ve viskozite (η) parametrelerinin etkilediği çözme gücü seçimli özütlenme işlemlerinde kullanılmaktadır. En yüksek yağ miktarına, deneysel tasarım ile çalışılan şartlardan 205 Bar ve 48,5°C için bulunan en yüksek değer olan tekrarlı 5 deney ortalaması 41,92 mg yağ/g numune değeri ile ulaşılmıştır. Quercetin

miktarının en yüksek olduğu şartlar 120 min özütleme süresi, 0,5 mm partikül boyutu, 311 Bar ve 65°C'de 9,44 µg quercetin/100 g numune olarak tespit edilmiştir. Basıncın ve sıcaklığın yükselmesiyle elde edilen yağ miktarının bir miktar azalmasına karşın quercetin miktarının artış göstermesi, süper kritik karbon dioksit özütlemesinde özütlenenlerin sıcaklık ve basınçla değişen buhar basınçları ile karbon dioksitin sıcaklık ve basınç ile değişen yoğunluğu ve değişen çözme gücünden kaynaklanmaktadır [15]. Bu nedenle oluşan seçici çözücülük etkisi ile sıcaklık ve basınç yükseldikçe elde edilen quercetin miktarında artış yağ miktarında ise düşüş gözlemlendiği düşünülmüştür.

5. SİMGELER (SYMBOLS)

CP	Kritik nokta
D	Difüzyon katsayısı, m ² s ⁻¹
Pc	Kritik basınç, atm
Tc	Kritik sıcaklık, °C
η	Viskozite, µPa s

Kısaltmalar (Abbreviations)

CCD	Central Composite Design
HPLC UV	Ultra Viyole Dedektörlü Yüksek Basınç Sıvı Kromatografisi
LC-MS	Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi
MKT	Merkezi Kompozit Tasarım
RSM	Respons Surface Method
SCCO ₂	Süper kritik karbon dioksit
YCY	Yüzey Cevap Yöntemi

TEŞEKKÜR (ACKNOWLEDGEMENT)

Yazarlar, değerli desteklerinden dolayı Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine (06/2016-11) sayılı proje desteği için teşekkür ederler. Kaybettiğimiz Doç. Dr. Ayşe Tosun'a değerli katkılarından dolayı teşekkür eder Allaha rahmet dileriz.

KAYNAKLAR (REFERENCES)

1. Ververidis F., Trantas E., Douglas C., Vollmer G., Kretschmar G., Panopoulos N., Biotechnology of flavonoids and other phenylpropanoid-derived natural products, *Biotechnology Journal*, 2 (10), 1214–34, 2007.
2. Pikulski M., Brodbelt JS., Differentiation of flavonoid glycoside isomers by using metal complexation and electrospray ionization mass spectrometry, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 4 (12), 1437-53, 2003.
3. Fresco P., Borges F., Diniz C., Marques M. P., New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols, *Medicinal Research Review*, 26 (6), 747-766, 2006.
4. Vauzour D., Rodriguez-Mateos A., Corona G., Oruna-Concha M. J., Spencer J. P. E., Polyphenols and human health prevention of disease and mechanisms of action, *Nutrients*, 2 (11), 1106-1131, 2010.
5. Jung S.K., Seung W.L., Yun K.K., A study about policy regime for the protection of the rights of Korean traditional medicine in the world market - Focusing on Chinese legislation cases. *Journal of Law and Politics research* 14 (1), 103-139, 2014.
6. Taguchi G., Chowdhury S., Wu Y., *Taguchi's Quality Engineering Handbook*, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, USA, 2005.
7. Stat-Ease Incorporated, Design-Expert® Software Help Menu, (ANOVA-"Analysis of Variance") <http://www.statease.com/dx10.html>, 2016.
8. Öztaş E., Galip M., Murathan A., Determination of Natural Antioxidant In Blackberry Fruits (*Rubus Fruticosus*) By Supercritical Fluid Extraction, *Journal of The Faculty of Engineering and Architecture of Gazi University* 26 (4), 801-805, 2011.
9. Xiao R., Liu-Ye Y., Xian-Xian L., Ben L., Huan Z., Qiang W., Optimization of Process Parameters of Extraction of Amentoflavone, Quercetin and Ginkgetin from *Taxus chinensis* Using Supercritical CO₂ Plus Co-Solvent, *Molecules*, 19 (11), 17682-17696, 2014.
10. Yalçın G., Sögüt O., Influence of extraction solvent on antioxidant capacity value of oleaster measured by ORAC method, *Natural Product Research*, 28 (18), 1513-1517, 2014.
11. İçen H., Gürü M., Extraction of caffeine from tea stalk and fiber wastes using supercritical carbon dioxide, *J of Supercritical Fluids* 50, 225-228, 2009.
12. İkinci M.S., Gürü M., Extraction of oil and B-sitosterol from peach (*Prunus persica*) seeds using supercritical carbon dioxide, *J of Supercritical Fluids* 92, 319–323, 2014.
13. Omoba O.S., Obafaye R.O., Salawu S.O., Boligon A.A., Athayde M.L., HPLC-DAD Phenolic Characterization and Antioxidant Activities of Ripe and Unripe Sweet Orange Peels, *Antioxidants*, 4 (3), 498-512, 2015.
14. Celik H.T., Guru M., Extraction of oil and silybin compounds from milk thistle seeds using supercritical carbon dioxide, *J. of Supercritical Fluids*, 100 (3255), 105-109, 2015.
15. Benelli P., Riehl C., Smania A., Smania E., Ferreira S., Bioactive extracts of orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) pomace obtained by SFE and low pressure techniques Mathematical modeling and extract composition, *J. of Supercritical Fluids*, 55, 132–141, 2010.

