T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TURUNÇGİL KABUĞU UÇUCU YAĞLARINDAN D-LİMONEN ETKEN MADDE ZENGİNLEŞTİRİLMESİ

Büşra YAVUZ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ŞANLIURFA
2023

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET i
ABSTRACT ii
TEŞEKKÜR iii
ŞEKİLLER DİZİNİ iv
ÇİZELGELER DİZİNİ vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ viii
1. GİRİŞ 1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 9
2.1. Turunçgil Kabuğu İle İlgili Yapılmış Önceki Çalışmalar 9
2.2. Gaz Kromotografisi Kütle Spekroskopisi İle Yapılmış Önceki Çalışmalar 12
3. MATERYAL ve YÖNTEM 15
3.1. Materyal 15
3.1.1. Turunçgil kabuklarına uygulanan ön işlemler 15
3.2. Yöntem 16
3.2.1. Turunçgil kabuklarına uygulanan ekstraksiyon işlemleri 16
3.2.1.1. Geleneksel yöntem ile ekstraksiyon işlemi 16
3.2.1.2. Mikrodalga destekli ekstraksiyon işlemi 17
3.2.1.3. Süperkritik CO_2 ekstraksiyon yöntemi 18
3.2.2. Gas kromatografi/kütle spektroskopi (GC-MS) yöntemi ile uçucu yağ bileşenlerinin tayini 22
3.2.3. Kimyasal Analizler 22
3.2.3.1. DPPH ile antioksidan madde analizi 22
3.2.3.1.1. DPPH ile antioksidant madde analizi uygulanışı 23
3.2.3.2. ABTS ile antioksidant tayini 24
3.2.3.2.1. ABTS ile antioksidant madde analizi uygulanışı 25
3.2.3.3. CUPRAC metodu ile antioksidant madde analizi 26
3.2.3.3.1. CUPRAC metodu ile antioksidan madde uygulanışı 27
3.2.4. Kolon Sisteminin Kurulması 28
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA 30
4.1.Yanıt Yüzey Metedolojisi ile Model İstatistiği 31
4.2. Farklı Uçucu Yağ Ekstraksiyon Yöntemlerinde Uçucu Yağ Veriminin Belirlenmesi 38
4.3. Faklı Uçucu Yağ Bileşenleri İçin Optimum Ekstraksiyon Yönteminin Belirlenmesi 41
4.4. . Faklı Uçucu Yağ Bileşenleri İçin Optimum Ekstraksiyon Yönteminin Belirlenmesi 44
4.5. Turunçgil Uçucu Yağlarının Fizikokimyasal Analizleri 50
4.5.1. Farklı turunçgil kabuğu uçucu yağlarının DPPH ile % inhibisyon değerleri 50
4.5.2. Süperkritik çalışma parametlerinde turunçgil kabuğu uçucu yağının DPPH % inhibisyon değeri 52
4.5.3 Farklı turunçgil kabuğu uçucu yağlarının ABTS ile % inhibisyon değeri 55
4.5.4. Farklı süperkritik çalışma parametrelerinde turunçgil kabuğu uçucu yağının ABTS % inhibisyon değeri 57
4.5.5. Farklı Turunçgil uçucu yağlarının CUPRAC metodu ile antioksidant tayini 61
4.5.6. Süperkritik çalışma parametrelerinde turunçgil uçucu yağının CUPRAC metodu ile antioksidant tayini 62
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER 65
KAYNAKLAR 67
ÖZGEÇMİŞ 70

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TURUNÇGİL KABUĞU UÇUCU YAĞLARINDAN D-LİMONEN ETKEN MADDE İZOLASYONU

Büşra YAVUZ

Harran Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Eyyüp KARAOĞUL
Yıl: 2022, Sayfa:79

Son yıllarda aromaterapiye olan ilginin artmasıyla birlikte uçucu yağlara olan ilgi de dünya çapında artmıştır. Artan bu ilgi sebebiyle bu tez kapsamında turunçgil kabuğu atıklarının uçucu yağlarını ve etken maddeleri üzerine çalışılmıştır. Çalışma kapsamında turunçgil kabuğu uçucu yağlarında yüksek oranda bulunan D-Limonenin farklı metodlar kullanarak zenginleştirilmesi hedeflenmiştir. Bu zenginleştirme işlemi için farklı metodlar kullanılmıştır. Öncelikli olarak ekstraksiyon yöntemlerinin D-Limonen yüzdesine etkilerine bakılmıştır. Bu kapsamda geleneksel metodla uçucu yağ üretimi, mikrodalga destekli ve süperkritik CO_2 ekstraksiyon yöntemleriyle uçucu yağlar elde edilmiştir (bu yöntemlerde farklı parametlerde denenmiştir). Süperkritik CO2 eksraksiyon yöntemindeki çalışmalar için Design-Expert programı ile çalışma parametreleri oluşturulmuştur. Farklı ekstraksiyon yöntemlerinin D- Limonen yüzdesine bakılarak optimum ekstraksiyon yöntemi belirlenmiştir. Zenginleştirme işlemi olarak kullanılan diğer metodlar; soğukta kristallendirme, metal katalizör ekleyerek soğukta kristallendirme ve kolon sistemi ile kullanılarak zenginleştirme işlemleridir. Yapılan bu çalışmalar kapsamında düşük D- Limonen oranı 45°C- 80 bar çalışma parametresinde % 16,19 oranı ile süperkritik ekstraksiyon yönteminde elde edilmiştir. En yüksek D- Limonen oranı %85,43 oranı ile 60°C- 200 bar çalışma parametresinde yine süperkritik ekstraksiyon metodu ile elde edilmiştir. Kolon sisteminde yapılan zenginleştirme işleminde ürün gelişi tespit edilmiştir fakat istenen düzeyde verim alınamamaıştır. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ve parametreleri kullanılarak dört farklı turunçgil kabuğundan (portakal, limon, mandalina ve greyfurt) elde edilen uçucu yağların; DPPH, ABTS ve CUPRAC metodu ile antioksidan tayinleri yapılmıştır. Yapılan analiz sonuçlarında DPPH metodunda en yüksek antioksidatif değer gösteren uçucu yağ 61,59 % süpürme etkisi gösteren portakal kabuğu uçucu yağı, en düşük antioksidant değeri ise 11,97 süpürme ile greyfurt kabuğu uçucu yağında tespit edilmiştir. DPPH metodunda süperkritik çalışmalarında en yüksek antioksidatif değer 30°C-80 bar çalışma parametresinde % 40,57 süpürme oranıyla elde edilmiştir. En düşük süpürme %9,58 süpürme ile 60°C-80 bar çalışma parametrelerinde elde edilmiştir. ABTS metodunda en yüksek antioksidatif değer gösteren uçucu yağ % 98süpürme aktivitesi ile portakal kabuğu uçucu yağı, en düşük değer % 56 süpürme ile mandalina kabuğu uçucu yağında tespit edilmiştir. ABTS metodunda süperkritik çalışmalarında elde edilen uçucu yağlarda en yüksek antioksidatif değeri gösteren parametre 60°C-200 bar çalışmada elde edilen uçucu yağlarda tespit edilmiştir. CUPRAC metodunda yapılan analizde 12,283 mg/L ortalama trolox değerinde en yüksek antioksidatif değer gösteren uçucu yağ limon kabuğu uçucu yağıdır. CUPRAC metodunda yapılan süperkritik çalışmalarında en yüksek antioksidatif değer gösteren uçucu yağ 30°C-200 bar çalışma parametresinde elde edilen uçucu yağlarda tespit edilmiştir.

ANAHTAR KELİMELER: Uçucu yağlar, D-limonen kolon kromotografisi, turunçgil kabuğu, ekstraksiyon yöntemleri

ABSTRACT

MSc Thesis

ISOLATİON OF THE ACTİVE INGREDİENT D-LİMONENE FROM CİTRUS PEEL ESSENTİAL OİLS

Büşra YAVUZ

Harran University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Eyyüp KARAOĞUL
Year:2022, Page:79

The interest in oils, which has emerged with the effect of the interest in aromatherapy in recent years, is also the place where the world has passed. Within the scope of this thesis, the usage oils and active substances of citrus peel wastes have been studied. Within the scope of the study, it was aimed to enrich the D-Lemon, which is found at a high rate in citrus peel use oils, by using different methods. Different methods have been used for this enrichment process. First of all, the effects of extraction methods on the percentage of D-Limonene were examined. Oil production with the traditional method used for this purpose was obtained from the oils used by microwave assisted and supercritical CO2 extraction methods (for this purpose, different parameters were tested). Working parameters values with the Design-Expert program for the study in the supercritical CO2 extraction method. The optimum extraction method was aimed by looking at the percentage of D- Limonene of different extraction methods. Other methods used as enrichment process; cold crystallization, cold crystallization including metal plating and enrichment with column system. Within the scope of this study, the low D-Limonene ratio was obtained in the supercritical extraction method with a ratio of 16.19% at the operating parameter of 45°C-80 bar. The highest D- Limonene ratio was obtained with 85.43%, again by supercritical extraction method, at 60°C- 200 bar operating parameter. In the enrichment process of the column structure, product improvement was detected, but the desired level of efficiency could not be obtained. The oils obtained from four different citrus peels (orange, lemon, tangerine and grapefruit); Antioxidant determinations were made by DPPH, ABTS and CUPRAC methods. In the results of the analysis, the oil with the highest antioxidative value in the DPPH method was the orange peel oil with a sweeping effect of 61.59%, and the lowest antioxidant value was placed in the grapefruit peel operating oil with 11.97 sweep. In the DPPH method, the highest antioxidative value in supercritical studies was obtained with a scavenging rate of 40.57% at 30°C-80 bar operating parameters. The lowest scavenging was obtained with 9.58% scavenging at 60°C-80 bar operating parameters. In the ABTS method, the oil with the highest antioxidative value was found in orange peel launcher oil with 98% sweep propeller, the lowest value was determined in tangerine peel oil with 56% sweep. In the ABTS method, the parameter showing the highest antioxidative value in the oils obtained in supercritical studies was determined in the oils obtained at 60°C-200 bar. In the analysis made in the CUPRAC method, the oil showing the highest antioxidative value with an average trolox value of 12,283 mg/L is the use of lemon peel oil. In the supercritical studies performed in the CUPRAC method, the oil with the highest antioxidant value was determined in the oils obtained at 30°C-200 bar operating parameters.

KEYWORDS: Essential oils, D-limonene, column chromatography, citrus peel, extraction methods

TEŞEKKÜR

Yüksek lisansım süresince danışmanlığımı yapan, bilgi, deneyim ve zamanını benden esirgemeyen, her zaman sabır ve güvenle bu yolda ilerlememi sağlayan, kendisi ile çalışmaktan mutluluk duyduğum hocam Sayın Doç. Dr. Eyyüp KARAOĞUL'a, tez jüri üyelerim Prof. Dr. İbrahim HAYOĞLU'na ve Sayın Doç.Dr. Ertuğrul ALTUNTAŞ'a

Yüksek lisans çalışmalarımda bilgi ve tecrübesini esirgemeyen Gıda Mühendisliği Öğr. Görevlisi Gjulten NEDJİP'e, doktora öğrencisi Saliha ÖZER'e, doktora öğrencisi Abdulhalik UĞURTAY'a ve Ardahan üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkez Öğr. Gör. Hamza ADIGÜZEL'e,

Çalışma sürecimde manevi desteğini esirgemeyen Elektrik Elektronik Mühendisliği yüksek lisans öğrencisi DİLANNUR KAYA'ya

21270 nolu proje kapsamında bu tez çalışmasında maddi destek veren Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (HÜBAP)'ne,

Eğitim hayatım boyunca daima arkamda olan ve desteklerini esirgemeyen aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.1.Turunçgil bitkisi ve kabuğu görüntüsü..... 2
Şekil 3.1.Öğütülen turunçgil kabuğu..... 15
Şekil 3.2. Turunçgil kabuklarının geleneksel yöntem ile yapılan ekstraksiyonu 17
Şekil 3.3. Mikrodalga yöntemi ile uçucu yağ eldesi..... 18
Şekil 3.4. Süperkritik CO2 ekstraksiyon cihazı..... 19
Şekil 3.5.Disagn Expert Programı ile belirlenen süperkritik CO2 ekstraksiyon çalışma verilerinin grafiksel dağılımı……..21
Şekil 3.6. Gaz kromotografisi kütle spektroskopisi cihazı 22
Şekil 3.7.Spektrofotometre ciazı 23
Şekil 3.8.Turunçgil uçucu yağlarında DPPH % inhibisyon antioksidant madde analizi……24
Şekil 3.9. Turunçgil uçucu yağlarının ABTS %inhibisyon antioksidant madde analizi ……25
Şekil 3.10. Turunçgil kabuğu uçucu yağlarının CUPRAC metodu ile antioksidant tayini…….26
Şekil 3.11. CUPRAC metodu ile hazırlanan trolox kalibrasyon eğrisi……..27
Şekil 3.12. Trolox kalibrasyon eğrisi için yyapılan CUPRAC analizi……...28
Şekil 3.13. D-limonen izolasyon sistemi……29
Şekil 4.1. Deney dizaynına göre D-limonen miktarının basınç sıcaklığa bağlı değişim haritası……33
Şekil 4.2. Deney dizaynına göre 75 mg/100 ml de DPPH yüzde süpürme miktarının basınç sıcaklığa bağlı değişim haritası…….33
Şekil 4.3. Deney dizaynına göre 25 mg/100 ml de DPPH yüzde süpürme miktarının basınç sıcaklığa bağlı değişim haritası…….34
Şekil 4.4. Deney dizaynına göre 75 mg/100 ml de DPPH trolox miktarının basınç sıcaklığa bağlı değişim haritası……...34
Şekil 4.5. Deney dizaynına göre 25 mg/100 ml de DPPH trolox miktarının basınç sıcaklığa bağlı değişim haritası…….35
Şekil 4.6. Deney dizaynına göre 75 mg/100 ml de ABTS yüzde süpürme miktarının basınç sıcaklığa bağlı değişim haritası…….35
Şekil 4.7. Deney dizaynına göre 50 mg/100 ml de ABTS yüzde süpürme miktarının basınç sıcaklığa bağlı değişim haritası…….36
Şekil 4.8. Deney dizaynına göre ABTS IC50 miktarının basınç sıcaklığa bağlı değişim haritası…….36
Şekil 4.9. Deney dizaynına göre 50 mg/100 ml de CUPRAC trolox miktarının basınç sıcaklığa bağlı değişim haritası……..37
Şekil 4.10. Deney dizaynına göre 25 mg/100 ml de CUPRAC trolox miktarının basınç sıcaklığa bağlı değişim haritası……..37
Şekil 4.11. Farklı uçucu yağ ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen uçucu yağ verimleri..... 39
Şekil 4.12. Süperkritik CO2 ekstaksiyon yönteminde farklı sıcaklık basınç parametreleri için elde edilen uçucu yağ verimleri……...40
Şekil 4.13. Geleneksel ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen uçucu yağ en yüksek bollukta bulunan bileşenleri…… 42
Şekil 4.14. Mikrodalga 250 Watt değerinde elde edilen yağın en yüksek bolluktaki bileşeni 42
Şekil 4.15. Mikrodalga 300 Watt değerinde elde edilen yağın en yüksek bolluktaki bileşeni 43
Şekil 4.16. Mikrodalga 350 Watt değerinde elde edilen yağın en yüksek bolluktaki bileşeni 44
Şekil 4.17. Farklı uçucu yağ ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen D-limonen bolluğu 45
Şekil 4.18. Farklı uçucu yağ ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen ß-Mirisen bolluğu..... 45
Şekil 4.19. Farklı uçucu yağ ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen Valence bolluğu 46
Şekil 4.20. Farklı uçucu yağ ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen α-Piren bolluğu 47
Şekil 4.21. Farklı uçucu yağ ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen Decanal bolluğu 47
Şekil 4.22. Farklı uçucu yağ ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen Linalol bolluğu..... 48
Şekil 4.23. Farklı uçucu yağ ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen ɤ-Terpinene bolluğu..... 49
Şekil 4.24. Farklı uçucu yağ ekstraksiyon yöntemleriyle elde edilen β- Patchoulene bolluğu 49

Şekil 4.25. Turunçgil uçucu yağlarının 250 mg/100 ml konsantrasyondaki DPPH inhibisyon değerlerinin yüzde süpürme cinsinden değişim grafiği……..52
Şekil 4.26. Farklı süperkritik çalışma parametrelerinde elde edilen turunçgil kabuğu uçucu yağlarının 50mg/100 ml konsantrasyondaki dpph inhibisyon değerlerinin % süpürme cinsinden değişim grafiği……55
Şekil 4.27. Turunçgil kabuğu uçucu yağlarının 250 mg/100 ml konsantrasyondaki ABTS inhibisyon değerinin % süpürme cinsinden değişim grafiği……57
Şekil 4.28. Farklı süperkritik çalışma parametrelerinde elde edilen turunçgil kabuğu uçucu yağlarının 50 mg/100 ml konsantrasyondaki ABTS inhibisyon değerinin % süpürme cinsinden değişim grafiği……60
Şekil 4.29. Farklı turunçgil kabuğu uçucu yağlarının 500 mg/100 ml trolox eşdeğeri cinsinden değişim grafiği……62
Şekil 4.30. Farklı süperkritik çalışma parametrelerinde elde edilen uçucu yağların 50 mg/100 ml trolox eşdeğeri cinsinden değişim grafiği ……64

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 3.1. Geleneksel ekstraksiyon yönteminde çalışma koşulları 17
Çizelge 3.2. Mikrodalga ekstraksiyonu çalışma koşulları 18
Çizelge 3.3. Süperkritik CO2 ekstraksiyonu çalışma koşulları 20
Çizelge 3.4. Disagn Expert programı ile belirlenen süperkritik CO2 ekstraksiyon çalışma koşulları.. 20
Çizelge 4.1. Turunçgil kabuğu uçucu yağlarının yanıt yüzey metedolojisi ile model analizi…….31
Çizelge 4.2. Bağımlı değişkenlerin varyans analizlerinin model eşitlikleri ……..32
Çizelge 4.3. Portakal kabuklarının uçucu yağ ekstraksiyonu sonucunda elde edilen uçucu yağ miktarları…….38
Çizelge 4.4. Süperkritik CO2 ekstraksiyon yönteminde farklı sıcaklık-basınç parametreleri için elde edilen uçucu yağ verimleri……...39
Çizelge 4.5. Geleneksel ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen uçucu yağ'da en yüksek bollukta bulunan bileşenler…….41
Çizelge 4.6. 250 W Mikrodalaga ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen uçucu yağ'da en yüksek bollukta bulunan bileşenler……...42
Çizelge 4.7. 300 W Mikrodalaga ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen uçucu yağ'da en yüksek bollukta bulunan bileşenler..... 43
Çizelge 4.8. 350 W Mikrodalaga ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen uçucu yağ'da en yüksek bollukta bulunan bileşenler..... 43
Çizelge 4.9. Farklı uçucu yağ ekstraksiyon yöntemleriyle elde edilen uçucu yağ içinde D-limonen bolluğu..... 44
Çizelge 4.10. Farklı uçucu yağ ekstraksiyon yöntemleriyle elde edilen uçucu yağ içinde β-Mirisen bolluğu..... 45
Çizelge 4.11. Farklı uçucu yağ ekstraksiyon yöntemleriyle elde edilen uçucu yağ içinde Valence bolluğu 46
Çizelge 4.12. Farklı uçucu yağ ekstraksiyon yöntemleriyle elde edilen uçucu yağ içinde α-Piren bolluğu……..46
Çizelge 4.13. Farklı uçucu yağ ekstraksiyon yöntemleriyle elde edilen uçucu yağ içinde Decanal bolluğu 47
Çizelge 4.14. Farklı uçucu yağ ekstraksiyon yöntemleriyle elde edilen uçucu yağ içinde Linalol bolluğu..... 48
Çizelge 4.15. Farklı uçucu yağ ekstraksiyon yöntemleriyle elde edilen uçucu yağ içinde ɤ-Terpinene bolluğu..... 45
Çizelge 4.16. Farklı uçucu yağ ekstraksiyon yöntemleriyle elde edilen uçucu yağ içinde β-Patchoulene bolluğu..... 49
Çizelge 4.17.Farklı turunçgil kabuğu uçucu yağlarının DPPH(%) inhibisyon, trolox eş değeri ve IC50 değerleri analiz sonuçları ……51
Çizelge 4.18. Farklı süperkritik çalışma parametrelerinde DPPH % inhibisyon, trolox eşdeğeri ve IC50 değerleri analiz sonuçları…….53
Çizelge 4.19. Farklı turunçgil kabuğu uçucu yağlarının ABTS(%) inhibisyon, trolox eş değeri ve IC50 değerleri analiz sonuçları…….56
Çizelge 4.20.Farklı süperkritik çalışma parametrelerinde ABTS % inhibisyon, trolox eşdeğeri ve IC50 değerleri analiz sonuçları……58
Çizelge 4.21. Farklı turunçgil kabuğu uçucu yağlarının CUPRAC metodu ile antioksidant analiz sonuçları ……61
Çizelge 4.22. Farklı süperkritik çalışma parametrelerinde elde edilen uçucu yağların CUPRAC metodu ile antioksidant tayini……..63

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Dk	Dakika
DLA	Dalton’s Lymphoma Ascites
g	gram
GC-MS	Gaz kromotografisi- Kütle spektroskopisi
L	Litre
LC-MS	Sıvı kromotografisi-Kütle spektroskopisi
LOD	Limit of Detection
LOQ	Limit of quantification
MD	MİKRODALGA
Mik.	Mikrodalga
mL	Mililitre
nm	Nanometre
µL	Mikrolitre
P.k.	Portakal Kabuğu
TAMP	Toplam Aerobik Mezofilik Bakteri
T.E.	Tayin edilmemiştir
TUB-N	Toplam Bazik Azot Tayini

1.GİRİŞ

Geçmişten günümüze kadar insanoğlu günlük ihtiyaçları olan beslenme, giyinme, barınma, ısınma ve yaraları iyileştirmek için bitkilerden yararlanmışlardır. En eski imparatorluklardan olan Mısır, Hitit, Asurlar ve Sümerliler de yüzyıllar öncesinden bitkileri tedavi amaçlı olarak tıpta kullanmışlardır. M.Ö. 5000'li yıllarda insanların tıpta birçok bitkiyi kullandıkları belirlenmiştir. Gelişen teknoloji ile birlikte bitkilere alternatif olabilecek sentetik maddeler kullanılmaya başlanmıştır. Bu sentetik malzemelerin insan vücuduna ve canlı yaşamına olan zararlarının tespit edilmesiyle birlikte doğal yaşama ve bitkisel ürünlere talep gün geçtikçe artmaktadır (Göktaş ve Gıdık, 2019).

Talebin en çok arttığı doğal ürünler ise Tıbbi ve Aromatik Bitkiler olmuştur. Tıbbi ve aromatik bitkilerin; beslenme, kozmetik, tıp, eczacılık, psikoloji ve aromaterapi gibi bir çok alanda kullanımı mevcuttur (Temel ve ark., 2018).

Uçucu yağlar bitkilerin kök, gövde, yaprak gibi kısımlarından elde edilen genellikle oda sıcaklığında sıvı olan, açık sarı renkli güzel aromatik kokulu doğal bir üründür. Halk arasında esans veya eterik yağ da denilmektedir. Yapı ve görünüş olarak sabit yağlara benzeseler de aslında sabit yağ değillerdir. Sıcaklık, oksijen varlığı ve ışık gibi etkenler uçucu yağların hızlı bir şekilde bozulmalarına sebep olduğundan, elde edildikten sonra uygun ortamlarda muhafaza edilmeleri gerekmektedir. Uçucu yağlar, bitkilerden elde edildiği zaman kimyasal olarak saf olmayıp pekçok bileşen içerirler. Kimyasal yapılarının çoğunluğu terpenlerden oluşmuştur. Terpenler dışında içeriğinde alkoller içeren bileşikler, esterler türevleri, fenolikler, azot ve kükürt içeren bileşikler de içermektedir. Terpenlerin oksijenli türevleri uçucu yağların koku, tat ve aroma maddelerini oluşturular. Son yıllarda alternatif tıbbın önemli bir dalı olarak gelişen aromaterapiye karşı yapılan çalışmalar, uçucu yağ kullanımı da arttırmıştır. Uçucu yağlar terapilerde, rahatlatıcı masajlarda sıkça kullanılmakla birlikte tıp, kozmetik, eczacılık, kimya, böcek kovucu olarak ziraat ve ev temizlik ürünlerinde de yoğun olarak kullanılmaktadır (Kılıç, 2008).

Turunçgiller “Rutacea” ailesinin üyeleridir. Orijini Çin, Güneydoğu Asya ve Hindistan olduğu bilinen turunçgillerin, günümüzde subtropik iklim etkisi görülen hemen hemen tüm ülkelerde tarımı yapılmaktadır. Turunçgiller kış ılıklığı isteyen bir meyve türü olduğu için ülkemizde genel olarak Ege ve Akdeniz kıyılarında yetiştirilmektedir. Ülkemizde en çok üretimi ve tüketimi yapılan turuçgil çeşitleri; turunç (C. Aurantium), potakal(C. Sinensis), limon(C.limon), kamkat(C. Fortunella), mandalina(C. reticulata) ve greyfurt(C. Paradisi) türleridir. Turunçgillerin güzel, ferahlatıcı aroması sebebiyle uçucu yağ piyasasında da sıkça tercih edilir. Turunçgil uçucu yağları tütsü olarak aromaterapide, gazlı içeceklerde, gıda boyası olarak kimya sanayisinde, oda spreyleri, parfüm, bitkisel çay üretimde ve kirli sularda antiseptik, antioksidan özelliği ve ön malzeme (precursor) etkisi nedeniyle de tıp alanında olmak üzere birçok sektörde kullanılmaktadır (Gök ve ark, 2012).



Şekil1.1.Turunçgil bitkisi ve kabuğu görüntüsü

Dünyada olduğu gibi ülkemizde de en çok tüketilen meyve çeşidine giren turunçgillerin yıllık üretimi ülkemiz için yaklaşık olarak 3 milyon ton civarındadır. Turunçgillerin büyük çoğunluğu sofralık tüketim olarak kullanır. Turunçgiller sofralık tüketim dışında meyve suyu endüstrisinde ve kabuklarından uçucu yağ üretiminde de kullanılmaktadır. Turunçgil kabuğu uçucu yağları, uçucu yağ piyasasında büyük paya sahiptir. Ülkemizde her ne kadar turunçgil kabuğu uçucu yağ üretimi yıllar içinde artış

gösterse de istenilen boyuta ulaşamamıştır. Ülkemiz bu açığı farklı ülkelerden uçucu yağ ithal ederek karşılamaktadır (Gök ve ark.,2012).

Uçucu yağlar oksijen molekülü taşıyan düşük moleküler ağırlıklı ve biyolojik özelliklerine göre farklı konsantrasyonlarda yaklaşık 20-60 bileşeni kapsayan kompleks doğal karışımlardır. Bu bileşenler terpenler, terpenoidler, aromatik ve alifatik bileşenlerdir. Uçucu yağlar, kendilerine olan has koku ve aromalarını da terpenlerden almaktadır. Her bir tıbbi aromatik bitki uçucu yağına karakteristik özellikler yükleyen, yüksek oranda bulunan ana etken maddeler vardır. Turunçgil uçucu yağlarının içinde yüksek oranda bulunan ana bileşeni D- limonendir. D-limonen (l-metil-4-{l-tnetyletenil) sikloheksan), limon benzeri bir kokuya sahip bir monosiklik monoterpendir. D-limonen iki enantiyomerden oluşur: (+)-R-limonen ve (−)-S-limonen; ikisi de bitkilerde doğal olarak bulunur. Doğada en yaygın bulunan terpenlerdendir. Çoğu turunçgil uçucu yağlarının (portakal, limon,greyfurt, mandalina, kamkut) ana bileşenidir. D- limonen renksiz, açık sarı renkte genel olarak ışık, hava, nem ve yüksek sıcaklık varlığında uçucudur ve kimyasal olarak kararsız bir bileşiktir. D-limonen ayrıca oksidasyona karşı son derece hassastır ve hızla oksitlenerek hoş olmayan bir tat ve koku verir (Sun, 2007).

D- Limonen bazı durumlarda cilt tahrişlerine neden olsa da genel olarak güvenli kabul edilir. Oral tüketim için 250 mg//gün düzeyi ile hiçbir olumsuz etkisi yoktur. Gıda endüstrisinde aroma verici olarak, kozmetikler ve ilaç sanayisinde ve kendine has sevilen bir kokusu olduğundan parfüm endüstrisinde yaygın olarak uygulanır. Aynı zamanda elektronik endüstrisinde yapıştırıcılar veya çözücüler gibi endüstriyel düzeyde kullanılır (Siddiqui, 2022). Bu özelliklerine ek olarak D- limonen, tekstil sanayisinde böcek ve haşereleri uzaklaştırmak aynı zamanda koku aplikasyon uygulamalarında kullanılır (Gönülşen ve ark., 2016).

D-limonen safra taşlarının eritilmesi tedavilerinde kullanıldığı gibi in vitro ve in vivo ortamlarda yapılan çalışmalarda kanserin önlediği tespit edilmiştir ve kanser tedavilerinde kullanıldığı bilinmektedir. D-limonenin; antibakteriyel, antiinflamatuar, antiviral, antinosiseptif, antidiyabetik aktiviteler gösterdiği yapılan çalışmalarda

belirlenmiştir. Aynı zamanda solunum yolu hastalıkları üzerindeki faydalı etkileri ve klinik öncesi veya klinik çalışmalarda yara iyileştirme aktivitesi olduğu da belirlenmiştir. Buna ek olarak son yıllarda yapılan birçok araştırma, D-limonenin güçlü antioksidan özelliklere sahip olduğunu ve organizmaları oksidatif hasardan koruduğunu göstermiştir (Mahdavi ve ark., 2022). Biyokimyasal ölçüm sonuçlarına göre D-limonenin, Streptozosin kaynaklı diyabetik sıçanlarda antioksidan özellikliği taşıdığından dolayı histopatolojik koruma sağladığı görülmüştür (Murali ve ark., 2013). Aynı zamanda fare çalışmalaıyla D-limonen'in hipokampüste ve prefrontal kortekste serotonin ve dopamin sebebiyle anksiyolitik tepki gösterdiği kanıtlanmıştır. Bununla beraber perilik asitin- karaciğerde sentezlenen bir limonen metaboliti- sıçan beyninde stres önleyici etki gösterdiği belirlenmiştir (Yun, 2014).

Uçucu yağ elde edilmesinde birçok farklı yöntem ve teknik kullanılır. Bu yöntemin belirlenmesinde; bitkide bulunan uçucu yağ miktarına, bitkinin cinsine ve bitkiden yağ elde edilecek kısma göre karar verilir. Uçucu yağ elde yöntemleri gelişmiş ve klasik ekstraksiyon yöntemleri olarak ikiye ayrılır. Distilasyon ve maserasyon yöntemi en eski ve en sık kullanılan geleneksel ekstraksiyon yöntemleri arasındadır. Bu yöntemlerin işlem süreleri uzundur ve çözücü solventler kullanılır. Son dönemlerde çevre kirliliği üzerine oluşan duyarlılık nedeni ile bu yöntemler yerini gelişmiş sistemlerden olan mikrodalga ve süperkritik ekstraksiyon yöntemlerine bırakmıştır (Atılgan 2018).

Destilasyon yöntemi su, vakum ve buhar destilasyonu olmak üzere kendi içerisinde 3'e ayrılır. Destilasyon sistemi sıvıların kaynama noktaları farkından yararlanarak gerçekleştirilen bir ayırma metodudur. Uçucu yağların elde edilmesinde en fazla kullanılan yöntemlerin başında gelen su destilasyonu; labaratuvar ve küçük ölçekli üretimlerde clavenger aparatı ile yapılmaktadır. Büyük ölçekli üretimlerde ise destilasyon kazanlarında yapılmaktadır (Kılıç, 2008).

Su içerisinde bulunan ürünün ısı etkisi kullanılarak uçucu bileşenlerinin buhar haline gelmesi ve daha sonra da soğutularak yoğunlaştırılması mantığına dayanır. Yöntem toz halindeki ürünlerde daha verimli sonuç vermektedir. Bu yöntem diğer

yöntemlerle elde dilen yağlara göre daha koyu bir renge ve daha kuvvetli kokuya sahiptirler (Kaya ve ark., 2015).

Mikrodalga cihazı analitik kimya alanında uzun süredir çözücü ekstaraksiyonu, numune çözündürme, örnekleri kurutma, nem tayini, çözücü desorbsiyonu-absorbsiyonu, örnek temizleme, kromojenik reaksiyonlar, analitik numunelerin analize hazırlanması alanlarında kullanılmaktadır. Destelisyon sisteminden farklı olarak solvent kullanımının olmaması ve işlem süresinin kısa olması sebebiyle son dönemlerde sıkça tercih edilmektedir. Mikrodalga sistemlerinin temel mantığı yüksek frekanslı elektromanyetik dalgalar vasıtasıyla ürünleri yüksek sıcaklık oluşturarak ısıtmasıdır. Elektromanyetik dalgalar yaklaşık olarak 300-300000 MHz. değerleri arasındadır. Burada sıcaklığın temel prensibi, iyonların iletimi ve dipol rotasyonu vasıtasıyla mikrodalganın moleküle doğrudan etkisine dayanmaktadır. Bu mekanizmalar pek çok uygulama için aynı anda oluştuğu bilinmektedir.Burada iyonik iletim, bir manyetik alan uygulandığında iyonların elektroforetik taşınımını ifade ederken, dipol rotasyonu, uygulanan manyetik alanla dipollerin tekrar düzenlenmesi demektir. Karışımın bu iyon akımına karşı mukavemeti ısınmayla sonuçlanır ve karışım ısınır (Yaman ve ark., 2016).

Geleneksel yöntemlerdeki uzun işlem süresi, uçucu yağ kalitesinin düşük olması ve yüksek maliyet oluşturması gibi olumsuzlukları minimize etmek için alternatif ekstraksiyon yöntemleri düşünülmüştür. Bilim insanları çevre dostu olması, yağ kalitesini arttırdığı ve işlem süresini kısalttığı için süperkritik ekstraksiyon yöntemine yönelmişlerdir. Süperkritik ekstraksiyon yöntemi çevre dostu, toksik etki yaratmayan, kaliteli ekstrakt oluşturan gelişmiş yöntemlerdendir. Süperkkritik ekstraksiyon yönteminde oksidasyon gerçekleşmediğinden elde edilen uçucu yağ koku ve görüntü bakımından daha kalitelidir. Ayrıca bu ekstraksiyon sisteminde elde edilen uçucu yağlar yüksek saflıkta olmaktadır (Yaman ve ark., 2016)

Saf halde bulunan bir bileşiğin faz diyagramında üç farklı hal bulunur. Bunlar katı,sıvı ve gazdır. Saf bileşiklerin bu hallerini ayırt edebilmek için faz sınır eğrileri kullanılır. Bunlar erime-donma eğrisi, buharlaşma-yoğuşma eğrisi ve süblimleşme-

depozisyon eğrisidir. Bu sınır eğrilerini gösteren diyagrama faz diyagramı denir. Bu faz diyagramında üçlü nokta ve kritik nokta olmak üzere iki nokta vardır. Üç fazında aynı anda bulunduğu faza üçlü faz, gaz ve sıvı bazın birlikte bulunduğu nokta ise süperkritik nokta olarak adlandırılır. Bileşik süperkritik noktada gaz yada sıvı halde değildir. Bu noktada bileşik; yoğunluk ve çözme gücü özellikleri olarak sıvı gibi davranır, vizkozite ve yüzey gerilimi özellikleri bakımından ise gaz gibi davranır (Raventos ve ark., 2002).

CO_2 gazı diğer gazlardan farklı olarak yanıcı özellikte değildir. Bu özelliği kullanım açısından güvenlikli bir ortam oluşturur. Aynı zamanda toksik etkisi yoktur, herhangi kokusu ve rengi yoktur, maliyeti düşüktür ve çözücü kalıntısı bırakmaz. Kullanıldıktan sonra ortamdan kolayca uzaklaştırılabilir, vizkozitesi düşüktür. Partikül çapı küçük olan materyale kolayca nüfuz edebilir. Süperkritik CO_2 cihazında sıcaklık ve basıncı değiştirilerek ürün ekstraktı için ideal ortam oluşturabilir. Süper kritik CO_2 ekstraksiyonunun en önemli özelliği doğru basınç ve sıcaklıkta yüksek saflıkta ekstrakt elde etmektir (Öztekin ve ark., 1998).

Gıdaların ve bitkilerin tercih edilmesinde görünüş, renk, yapısal özellikleri dışında en önemli etkenlerden biri aromatik özellikleridir. Gıdaların aroma yapısı farklı uçucu bileşenlerden oluşur. Bu uçucu bileşenler bitkinin ve gıdanın ana karekteristik kokusu ve tadını oluşturur. Bu bileşenler farklı oranlarda karışım halinde bulunur (Güneşer ve ark., 2010).

Kromatografi cihazının temel amacı karışım halinde bulunan maddelerin içerisinde bulunan bileşikleri tespit etmek ve bu bileşenleri birbirinden ayrıştırmak ve karışımı daha saf bir hale getirmektir. Çalışma prensibi karışım halinde bulunan örneği bileşenlerine ayırmak ve bu bileşiklerin miktarının tayin edilmesi mantığı üzerine kurulmuştur. Bu yöntemde hareketli ve sabit olmak üzere iki faz bulunur. Sabit faz, mobil faz içerisinde gelen numune ile etkileşime girer ve belirli bir oranda gelen numuneyi tutarak ayrım yapmayı kolaylaştırır. Sabit faz olarak kullanılacak madde kromotografi cinsine ve tekniğine göre farklı çeşitlerde olabilir. Bu faz cam tüpler, selüloz kağıt gibi farklı maddelerden oluşabilir. Sabit fazın bulunduğu kısma kolon adı

verilir. Sabit faz üzerinden geçen numune; kaynama noktası, molekül büyüklüğü farklılıkları gibi özelliklerden dolayı farklı sürelerde kolondan çıkış yaparlar ve ayrım gerçekleşir. Mobil faz yani hareketli faz ise; karışım içerisinde bulunan bileşen ile etkileşime girerek numuneyi kolon boyunca taşımaya yardımcı olan fazdır. Bu faz gaz veya sıvı olabilir. Kromotografi tekniği aromaterapiden eczacılığa, tarım sektöründen veterinerlik ve ilaç sanayisine kadar birçok sektörde sıklıkla kullanılmaktadır (Eser ve ark.,2018).

Karışım halinde bulunan numunelerin ayrıştırılmasında farklı tip kromotografiler kullanılmaktadır. Bu farklı kromotografi tiplerinin belirlenmesinde numunenin özelliği, kromotografide kullanılan faz tipleri ve uygulama yöntemlerine bakılarak karar verilir. Kromotografiler temelde ayrılma mekanizmalarına göre, uygulama biçimine göre ve faz tipine göre kendi içerisinde üçe ayrılmaktadır. Uygulama biçimine göre kromotografiler ise kendi içerisinde ikiye ayrılmaktadır. Düzlemsel kromotografiler ve kolon kromotografisi. Piyasada en yaygın kullanılan gaz kromotograsi ve sıvı kromotografisi kolon kromotografisi kapsamına girmektedir (Eser ve ark., 2018).

Gıdalarda ve bitkilerde aroma maddelerinin tespiti için en yaygın kullanılan kromotografi tipi gaz kromotografisidir. Gaz kromotografisinde aromalar örneklendirirlir, ayrımı yapılır, kalitesi belirlenir ve isimlendirilir (Güneşer ve ark., 2010). En yaygın kullanılan inert gazlardan biri olan helyum gazı, gaz kromotografisinin hareketli yani mobil fazını oluşturur. Bu hareketli faz örnekle etkileşime girmez, görevi aroma maddesinin kolon içerisinde hareketini kolaylaştırmaktır. Örnek çok yüksek sıcaklıklarda buharlaştırılarak kolona verilir. Örnek mobil faz yardımıyla kolon boyunca ilerler. Her bileşiğin farklı bir kaynama noktası vardır. Bu nedenle bileşiklerin buharlaşma süreleri de farklı olacaktır. Bu farktan dolayı bileşiklerin kolon içerisinde ilerleme süreleri birbirinden farklıdır. Gaz kromotografisinin temel mantığı bileşiklerin kaynama noktaları farkından yaralanarak ayrım yapmaktır. Kolondan çıkış yapan gazın duyarlı dedektörtörler yardımıyla tespiti yapılır ve kaydedilir. Gaz kromotografilerinde GC kısmında örneğin kalitatif tayini

yani bileşenin tespiti yapılır. MS kısmında ise örnek içerisinde belirlenen bileşiklerin yüzde miktarları hesaplaması yapılır (Turner ve ark., 2020).

Bu çalışmada amaç; meyve suyu sektöründe ciddi bir atık potansiyeli olan turunçgil kabuklarından:

- Süperkritik CO_2 cihazı ile ekstraksiyon optimizazyonu,
- Turunçgil kabuklarının geleneksel, mikrodalga ve süperkritik CO_2 yöntemleriyle uçucu yağlarının elde edilmesi,
- Elde edilen uçucu yağların GC-MS cihazı ile etken maddelerinin tespiti yapılarak kolon kromotografisi tekniğiyle D-limonen izolasyonu yapmak,
- İzolasyonu yapılan D- limonenin ABTS,DPPH Ve Cuprac yöntemleriyle antioksidan tayinini yapılacaktır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Turunçgil Kabuğu ile İlgili Yapılmış Önceki Çalışmalar

Khan ve ark.(2012), yaptığı çalışmada turunçgil; portakal, mandalina ve greyfurt kabuğu uçucu yağlarını yüzde yağ verimlerine, kimyasal bileşimine ve antipatojenik aktivitelerini araştırmışlardır. Yapılan kabuk yağ verimi denemelerinde en yüksek verimi 0.25 değerle portakal kabuğu yağı vermiştir. Ayrıca kimyasal bileşimi GC-MS cihazında belirlenmiştir. Bütün turunçgil kabuğu yağlarında en yüksek etken madde oranı yaklaşık olarak % 40,9 – 70 değerlerinde D- limonen olarak tespit edilmiştir. Antipatojenik etkiyi belirlemek için kullanılan mikroorganizmalar Staphylococcus aureus, Eschrichia coli, Salmonella typhi, Staphylococcus olmak üzere bakteri türleri ve epidermidis, Proteus vulgaris ve. Aspergillus flavous ve Trichophyton türleri matarlar kullanılmıştır. Antimikrobiyal etkiyi belirlemek üzere disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Yapılan toplam fenolik tayini analizinde en yüksek fenolik mitarına 8.58 mg/g değerle greyfurt, en düşük fenolik miktarına 5.20 mg/g değerle mandilinada olduğu tespit edilmiştir. Portakal kabuğu yağı Staphylococcus aureus (25.24 mm), Escherichia coli (22.67 mm), (Salmonella typhi 27.72 mm), S. epidermidis (17.12 mm), Trichophyton album (38.46 mm) mikroorganizmalarına karşı en yüksek direnç gösteren turunçgil kabuğu yağı oldu. Greyfurt uçucu yağı (27.53 mm) Proteus vulgaris mikroorganizmasına karşı en yüksek direnci gösterdi.

Yıldız ve ark. (2019), yaptığı çalışmada limon, portakal, bergamot ve portakal kabuğu uçucu yağlarının gökkuşağı alabalığı filitolarında raf ömrüne, duyusal, kimyasal ve mikrobiyolojik analiz sonuçlarına etkisine bakmışlardır. Yapılan çalışmada kontrol grubu ve farklı oranlarda (% 0.5 % 1) portakal, limon ve bergamot kabuğu uçucu yağları sürülmüş toplamda 7 grup olacak şekilde alabalığı fileto örnekleri hazırlanmıştır. Hazırlanan bu 7 grup 9 gün boyunca buzdolabında muhafaza edilmiştir. Muhafaza süresince 0., 3., 6. ve 9. günlerinde İki tekerrürlü olacak şekilde mikrobiyolojik, fiziksel ve duyusal özelliklerine bakılmıştır. Farklı oranlarda turunçgil

kabuğu uçucu yağı ilave edilmiş örneklerde en düşük toplam aerobik mezofilik bakteri (TAMP) miktarı % 1 limon kabuğu uçucu yağı ilave edilmiş örnekte tespit edilirken en fazla TAMP miktarı kontrol grubunda olduğu belirlenmiştir. Genel olrak TAMP miktarı tutunçgil kabuğu uçucu yağı ilaveli filetolarda daha az miktarlarda tespit edilmiştir. Toplam psikrotrofik bakteri sayısı miktarına bakıldığında da tururnçgil yağı ilaveli örneklerde daha az miktarda olduğu tespit edilmiştir. Balıkların depolama işlemi sırasında bozulma ile beraber dokularda birikmeye başlayan uçucu bazik azot miktarını belirten TVB-N miktarı en az % 1 limon ilaveli örnekte tespit edilmiştir. Yine en yüksek TVB-N miktarı en yüksek kontrol grubunda belirlenmiştir. Duyusal olarak (renk, koku ve tat) yapılan analizlerde turunçgil kabuğu ilave edilmiş örneklerin alışık olunmayan tat ve kokuya sebebiyet vermesinden dolayı beğenilmediği tespit edilmiştir.

Campolo ve ark. (2017), domotes meyve saplarına ciddi zarar veren ve verimini düşüren domates veya kıl kurdu olarak adlandırılan Tuta absoluta böcek türüne karşı turunçgil kabuğu yağlarının ve bu yağların nanopartiküllerinin insektisidal aktivitesini ve toksik etkisini araştırmışlardır. Çalışmada limon, portakal ve mandalina kabukları uçucu yağları ve bu uçucu yağların nanopartiküllerinin Tuta absoluta yumurta ve larvalarında 24 ve 72 saat temas halinde tutarak böcek türünün ortalama ölüm oranları tespit etmeye çalışmışlardır. Tuta absoluta yumurtalarında 24 saat esansiyel yağ ve esansiyel yağ nanopartikül uygulamalarında en fazla ölüm portakal kabuğu uçucu yağı püskürtülmüş örneklerde, 72 saat uygulamalarında ise portakal kabuğu uçucu yağı nanokapsüllerin temas ettirildiği örneklerde maksimum ölüm gözlenmiştir. Tuta absoluta larvalarında 24 ve 72 saat uygulamalarında maksimum ölüm oranı mandalina kabuğu esansiyel yağının nanopartiküllerinde sağlanmııştır. Bu çalışmada sentetik pestisitlere alternatif olarak pestisit yerine geçebilecek doğal esansiyel yağların alternatif olabileceği tespit edilmiştir.

Choı ve ark. (2006), 8 farklı türdeki turunçgil yağlarının ve 17 çeşit etken maddelerinin lipolitik etkisini ve bu etkiye arttıran etmenleri araştırmışlardır. Narenciye kabuklarının ve etken maddelerin lipolitik etkisine gaz kromotografisinde bakmışlardır. Farklı konsantrasyonlarda (25, 50, 100, 150 ve 200 µL) narenciye

kabuğu yağları 50 µL zeytinyağı ile karıştırmışlardır. 1 ml hacme tamamlanacak şekilde kloroform eklenmişlerdir. Bu karışım çeşitli hazırlıklardan sonra GC cihazına verilerek pik alan yüzdesinden lipolitik etkisine bakılmıştır. Lipolitik etki gaz kromotogramında oleik asitin pik alan yüzdesine bakarak tespit edilmiştir. Yapılan deneyler sonucunda turunçgil kabuğu yağları % 10,9 ile % 73,8 değerleri arasında değişen lipolitik etki göstermiştir. % 73,8 ile en yüksek lipolitik etki gösteren narenciye türü hakyul olurken bunu yuza türü narenciye % 68,1 ve limon % 63,4 değeri ile takip etmiştir. Hallabong türü narenciye düşük bir lipolitik etki göstermiştir. Etken maddelerden Oktanal (%78,6) en yüksek lipolitik etkiyi gösterirken bunu γ-terpinen (%76,3), limonen (%75), terpinen-4-ol (%70,7), nerol (%69,9) izlemiştir. Narenciye kabuğu yağlarının bileşenlerinden olan, R-pinen, mirsen, sitronelal, linalil asetat ve sitronellol zayıf lipolitik etkiler göstermiştir.

Nair ve ark. (2018), beş farklı narenciye kabuğu yağlarının in vitro ve in vivo ortamlarda yaptıkları analizler ile antikanser potansiyellerine bakmışlardır. Labaratuvar ortamında bulunan farelere DLA (Dalton's Lymphoma Ascites) hücreleri periton boşluklarına tümör olarak enjekte nakledilmiştir. DLA hücreleri vinkristin ve narenciye uçucu yağları özütü karışımı ile işlendi. Tedavi sonrası farelerde yapılan mtt testlerinde kanser hücrelerinde azalma tespit edilmiştir. Narenciye bitkilerinde antioksidanlar ve kanser riskini azaltan faktörler olarak flavonoidler, limonoidler, C vitamini ve β-karoten rapor etmiştir.

Uçar ve ark. (2020), yaptıkları çalışmada dört farklı turunçgil kabuğu uçucu yağı ilave edilmiş balık yağlarının mikroenkapsüle edildikten sonra 12 haftalık depolama süresince renk ve duyusal özelliklerini takip etmişlerdir. Örnekler balık yağı, sodyum kazeinat, maltodekstrin ve sırasıyla % 2,5 oranında mandalina, greyfurt, limon ve portakal kabuğu uçucu yağlarıyla homojenize edildikten sonra sprey drayer ile toz haline getirmişlerdir. Örneklerin renk ölçümlerinde L*, a*, b* değerleri incelenmiştir. Tüm gruplarda L* renk değerinin düşük çıktığı belirlenmiştir. Narenciye kabuğu eklenen gruplarda en fazla renk değişi limonda görülürken renk değişimi en az olan örnek mandilina kabuğu uçucu yağı eklenen örnek olmuştur. Mikroenkapsüle balık yağlarının duyusal özellikleri bütün örneklerde farklılık göstermiştir. Örneklerde en

fazla topaklanmanın kontrol grubunda olduğunu tespit etmişlerdir. Aynı zamanda en fazla koyulaşma yine kontrol grubunda gerçekleşmiştir. Yapılan renk analizlerinde turunçgil uçucu yağlarının acılaşmayı azalttığını yani oksidasyonu engellediği anlaşılmıştır. Örneklerde yapılan tadım analizlerinde ise turınçgil kabuğu eklenmiş gruplarda kontrol grubunda alınan balığımsı tadın ve kokunun alınmadığını tespit etmişlerdir.

Aydın ve ark. (2018), portakal kabuğu yağlarının etlik piliçlerde hayvan sağlığı ve gelişimini üzerine etkilerini araştırmışlardır. Yem sağlığını iyileştirmek için kullanılan antibiyotiklerin insan sağlığı üzerindeki olumsuzlukları nedeniyle alternatif yöntemler düşünülmüştür. Bitkisel uçucu yağlar bu anlamda yaygın kullanılan bir metotdur. Her biri 18 piliçten oluşan 6 tekerürlü 4 grup oluşturulmuştur. Grupların diyetleri birinci grup 50 mg ikinci grup 100 mg üçüncü grup 150 mg portakal kabuğu yağı içeren ve dördüncü grup kontrol grubu olarak belirlendi. 6 haftalık süre boyunca grupların takibi yapıldı. Piliçlerin ağırlıkları her hafta aynı gün ve saatte tartıldı. Bunun yanında yemlerde tartılarak piliçlerin yemlerden tüketme miktarları da belirlendi. Deneme sonunda piliçler kesilerek karkas özellikleri belirlendi. En fazla ağırlık değişimi olan 150 mg portakal kabuğu yağı ilaveli diyetle beslenen grup olurken ağırlık değişimi en az olan grup kontrol grubu olmuştur. Piliçlerde portakal kabuğu yağı oranı arttıkça kanat ağırlığında da artış görülmüştür.

2.2.Gaz Kromotografisi Kütle Spektroskopisi ile İlgili Yapılmış Önceki Çalışmalar

Seven ve ark. (2006), biber salçasında renk arttırımını sağlamak için illegal olarak kullanılan Sudan I, II, III ve IV azo boyar maddelerinin GC-MS ile tayinini yapmışlardır. Bu boyar maddelerin bileşiklerinin kaynama noktalarının GC-MS analizine uygun olmaması sebebiyle genel olarak sıvı kromotografisinde bileşik tayini yapılmaktadır. Bu çalışmada GC-MS analizine dayalı yeni bir metod uygulamışlardır. Sudan boya maddelerine kimyasal indirgeme işlemi uygulayarak boyar maddenin parçalanan bileşiklerini GC-MS de okutmuşlardır. Boyar maddeleri katı faz ekstraksiyonu ile deriştimek için metonolde, hekzanda, suda ve etenolde

çözdürmüşlerdir. Metanolü en iyi çözücü olarak belirlemişlerdir. Örneklerin elüsyonu için asetonitril ve etil asetat kullanmışlardır. Boyar maddeleri kimyasal indirgeme yönteminden yaralanılarak parçalama işlemi gerçekleştirmişlerdir. Yapılan okumalar sonucunda LC-MS ve GC- MS sonuçları karşılaştırıldığında kromotogramlar açısından GC-MS okumalarının daha iyi olduğunu belirlemişlerdir.

Sunar ve ark. (2020), Kocaeli ilinde içme sularının dezenfeksiyonu sırasında kullanılan klor ve bileşiklerinin sıcaklık, ph, klor temas süresi vs. gibi etkenlerin etkisi ile daha sonradan oluşturdukları trihalomethan (kloroform, tribromometan bromodiklorometha n, dibromoklorometha n) gibi uçucu bileşiklerin tespitini ve insan sağlığında oluşturabilecekleri olumsuzlukları araştırmışlardır. Uçucu organik bileşiklerin su ortamında olması genellikle kirlilik olarak adlandırılır. Trihalometan tespiti için yaygın olarak kullanılan sıvı-sıvı ekstraksiyonu, katı faz ektrasksiyonu, katı faz mikro ektrasksiyonu ve Dynamic headspace purge and trap yöntemlerinin oluşturdukları bazı dezavantajlar nedeniyle GC-MS ile tespiti yöntemini denemişlerdir. Koceeli ilinde dezenfeksiyon sonrası iki farklı bölgeden farklı günlerde 10 farklı numune alınmıştır. Alınan örnekler gazdan arındırma ve tutma yöntemi ile GC-MS de analiz edilmiştir. Farklı oranlarda insan sağlığına sorun teşkil etmeyecek düzeyde trihalometan tespit edilmiştir.

Dalimunthe ve ark. (2022), yaptıkları çalışmada ekstraksiyon kolononda nano bentoniti dolgu malzemesi olarak kullanarak saçta metamfetamin tespiti yapmak. Çalışmada amaç metamfetamin tespitinde yeni bir yöntem belirlemek. Metamfetamin tedavi edici bir ilaç olarak tanımlanmaktadır ama son zamanlarda yasa dışı ve farklı amaçlarla kullanılmış olması metamfetamini tespitini zorunlu kılmıştır. Geleneksel teknikte katı faz ekstraksiyonu diğer yöntemlerle birleştirilmiş yaygın bir tekniktir. Nano bentonit, boyaları ve ağır metalleri adsorbe etme kapasitesi nedeniyle en iyi adsorbanlardan biri olarak bilinmektedir. Nano bentonitin adsorbant olarak sağladığı avantajlar nedeniyle, katı faz ekstraksiyon kolonunda dolgu maddesi olarak da kullanılabilir. Şimdiye kadar, metamfetamin tayini için ekstraksiyon kolonunun dolgu maddesi olarak nano bentonitlerin kullanılmasına yönelik herhangi bir araştırma yapılmamıştır. Bu çalışmada absorban olarak nano bentonitin kullanılmış ve katı faz

ekstraksiyon tekniği aracılığıyla metafitamin toplanmış ve GC-MS ile okumalar yapılmıştır. 40 mg saç örneği hazırlandıktan sonra ekstraksiyon kolonuna enjekte etmişlerdir. Metafitamini elde ettikten sonra GC-MS cihazında analizini yapmışlardır. İnsan saçında metafitamini tespiti nano bentonit kullanılarak katı faz ekstraksiyonu tekniği ile GC-MS cihazında analiz edildi. Bu yöntemin doğrusallığı LOD ve LOQ tarafından desteklenmiştir.

Costa ve ark. (2008), Tarchonanthus camphoratus L'nin uçucu yağının bileşenlerini Gaz kromatografisi-olfaktometri yöntemlemi ile analiz etmişlerdir. Çalışmada Afrika kıtasında solunum yolu hastalıklarında ve böcek kovucu olarak sık kullanılan Tarchonanthus camphoratus L. bitkisinin içerik tespiti yapılmıştır. Çalışmanın amacı sadece içerik analizi yapmak değil aynı zamanda yağın koku alma özelliklerini de gaz kromatografik ve olfaktometrik tekniklerle belirlemek olmuştur. T. camphoratus L.'nin esansiyel yağı hekzan ile 1:10 oranında seyreltilmiştir. Örneklerin GC-MS cihazında analizleri yapılmıştır. Koku analizleri olfaktometride uzun süreli tecrübesi olan noanosmi gösteren panalistler tarafından gerçekleştirildi. GC–Olfaktometri analizlerinden elde edilen veriler, tek yönlü Anova analizi kullanılarak istatistiksel işleme tabi tutuldu. En çok bulunan bileşikler sırasıyla α-pinene myrcene, eucalyptol olurken koku izlenimlerinde belirgin olarak odunsu, yeşil, çiçeksi, otsu, tatlı ve baharatlı notaları ortaya çıkmıştır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışmada uçucu yağ elde etme etmek için kullandığımız turunçgil kabuklarını Şanlıurfa ilindeki lokal marketlerden temin ettik. Etken madde zenginleştirmesi yapacağımız kolon sisteminin dolgu malzemesi olarak kullanılan silikajel Smart Kimya Tic. ve Dan. Ltd. Şti. tarafından temin edilmiştir. Kolon sistemini oluşturan Polytetrafluoroethylene malzemeli hortum Plasti-med Plastik Medikal Ürünler San.ve Tic. Ltd. Şti tarafından temin edildi.

3.1.1. Turunçgil kabuklarına uygulanan ön işlemler

Taze olarak temin edilen Turunçgil kabukları Lavion marka HC-100 model öğütme makinası ile öğütülerek Şekil 3.1' de gösterildiği gibi küçük parçacıklar haline getirilmiştir. Küçük parçacıklar haline getirilen turunçgil kabukları -18 ^{0}C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.1.Öğütülen turunçgil kabuğu

3.2. Yöntem

Çalışmamızda öncelikle mikrodalga, geleneksel ve süperkritik CO_2 yöntemleri ile turunçgil kabuğu uçucu yağları elde edilmiştir. Kullandığımız farklı ekstraksiyon metodlarını yüzde yağ verimi ve yüzde etken madde varlığı açısından karşılaştırarak optimum yöntemi belirledik. Zenginleştime işlemi sırasında kullanacağımız kolon sistemini oluşturmak için 15 metre uzunluğundaki plastik hortumu silikajel ile doldurduk. Elde ettiğimiz uçucu yağları kolon sisteminden geçmesini sağlayarak zenginleştirme işlemi gerçekleştirilmeye çalışılmıştır. Yapılan denemelerde kolon için optimum sıcaklık değeri tespit edilmeye çalışılmıştır.

3.2.1. Turunçgil kabuklarına uygulanan ekstraksiyon işlemleri

3.2.1.1. Geleneksel yöntem ile ekstraksiyon işlemi

Geleneksel yöntem ile esktraksiyon işlemi olarak bilinen yöntemde geri soğtucu kısmı bulunan clavenger aparatı ve ekstraksiyon balonu bulunmaktadır. Turunçgil kabuğu uçucu yağ eldesi için; öğütülmüş turunçgil kabuklarından 50 gr tartıldı ve üzerine çözücü olarak 400 ml saf su eklendi. Isıtma banyosuna bağlı clevenger aparatı kullanılarak narenciye kabukları orta sıcaklık ayarında 3, 4ve 5 saatlik ekstraksiyon işlemine tabi tutulmuştur. Clevenger aparatında biriken turunçgil kabuğu yağları tüplere alınarak +4 derecede muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.2. Turunçgil kabuklarının geleneksel yöntem ile yapılan ekstraksiyonu

Çizelge 3.1. Geleneksel ekstraksiyon yönteminde çalışma koşulları

	Sıcaklık (C°)	Zaman (h)
Geleneksel Ekstraksiyon	Orta ayar sıcaklığı	3
	Orta ayar sıcaklığı	4
	Orta ayar sıcaklığı	5

3.2.1.2. Mikrodalga destekli ekstraksiyon işlemi

Mikrodalga yöntemi ile uçucu yağ eldesi clevenger aparatı kullanılarak yapıldı. 50 gr öğütülmüş turunçgil ve 400 ml saf su mikrodalga balonuna eklenmiştir. Uçucu yağ eldesi 250, 300 ve 350 Watt değerlerinde 1.5, 2, 3 ve 4 saat süren paremetrelerde gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.3. Mikrodalga yöntemi ile uçucu yağ eldesi

Çizelge 3.2. Mikrodalga ekstraksiyonu çalışma koşulları

	Zaman (saat)	250 Watt	300 Watt	350 Watt
Mikrodalga Ekstraksiyonu	1.5h	-	-	+
	2 h	-	+	+
	3 h	+	+	+
	4 h	+	+	+

3.2.1.3 Süperkritik CO_2 ekstraksiyon yöntemi

Süperkritik CO_2 ekstraksiyon işlemi için Şekil 3.4.'de gösterilen laboratuvar tipi Qualitec F-500 marka süperkritik CO_2 ekstraksiyon cihazı tercih edildi. Süperkritik cihazı karbondioksit tüpü, kompresör ve ekstraksiyon ünitesi olmak üzere 3 ana parçadan oluşmaktadır. Ekstraksiyonda kullanılan karbondioksit tüpü (Asilgaz marka) 50 L olacak şekilde satın alınmıştır. Kompresör ise 8 bar basınçlı, 46 L (Attlas marka)

hava kompresörü satıcıdan temin edilmiştir. Portakal kabuğunda optimum çalışma koşullarının belirlenmesi amacıyla farklı sıcaklık ve basınç değerlerinde ekstraksiyonu işlemi yapılmıştır. İdeal ekstraksiyon süresi 4 saat olarak belirlenmiştir. Süperkritik CO_2'ta çalışma koşulları tablo 3.3'te verilmiştir. Ayrıca istatistiksel işlem sonucu optimum reçete oluşturma özelliğine sahip "DESİGN-EXPERT" programı kullanılarak Süperkritik CO_2 ekstarksiyonu için optimum reçete oluşturulmuştur. Optimum reçete verileri tablo 3.4' te verilmiştir, ayrıca verilerin grafik üzerindeki dağılımını gösteren grafik Şekil 3.5' te verilmiştir.



Şekil 3.4. Süperkritik CO_2 ekstraksiyon cihazı

Çizelge 3.3. Süperkritik CO_2 ekstraksiyonu çalışma koşulları

Süperkritik CO_2 Ekstarksiyonu	Sıcaklık	80 bar	140 bar	200 bar
	30°C	+	+	+
	45°C	+	+	+
	60°C	+	+	+

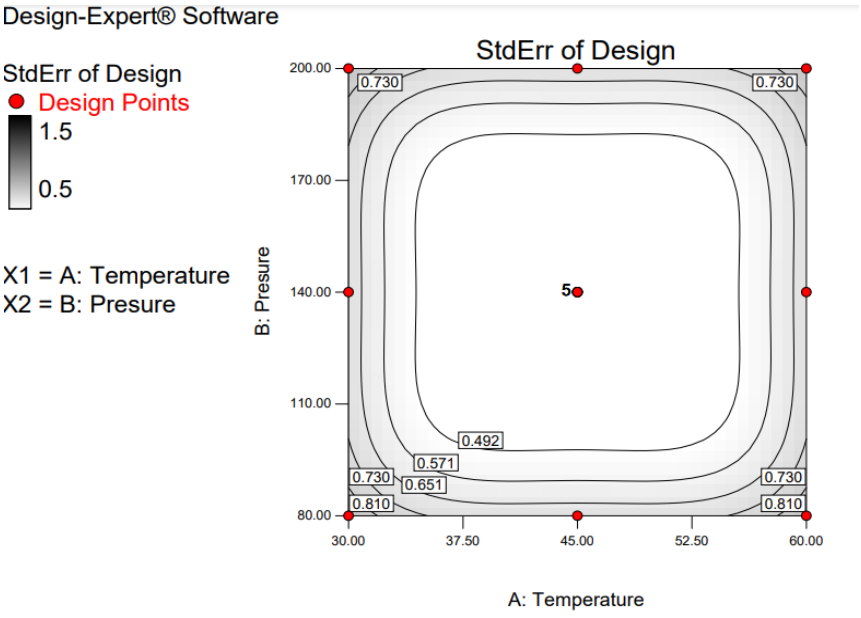
Çizelge 3.4. Disagn Expert programı ile belirlenen süperkritik CO_2 ekstraksiyon çalışma koşulları.

	BAĞIMLI DEĞŞKEN		**BAĞIMSIZ DEĞİŞKEN**							
RUN	**T° C**	**P(bar)**	**YAĞ VERİMİ %**	**D-LİMONEN ORANI**	**DPPH YÜZDE SÜPÜRME 75MG/100 ML**	**DPPH YÜZDE SÜPÜRME 50MG/100 ML**	**DPPH YÜZDE SÜPÜRME 75MG/100 ML**	**DPPH TROLOX 75MG/100 ML**	**DPPH TROLOX 50MG/100 ML**	**DPPH TROLOX 25MG/100 ML**
1	45	140	0,8	76,77	17,097	12,068	6,17	428,51	459,89	496,66
2	45	140	0,7	75,24	17,528	12,356	6,89	425,822	458,10	492,17
3	45	140	0,9	76,1	17,385	12,643	7,04	426,71	456,31	491,28
4	30	200	0,97	77,47	20,55	13,7	12,26	406,99	449,73	458,70
5	45	80	0,79	16,19	9,96	7,28	4,21	473,04	489,78	508,91
6	30	140	1,4	76,18	23,04	16,76	9,53	391,44	430,60	475,73
7	60	200	1,15	85,43	34,87	18,44	11,11	317,62	420,14	465,87
8	60	80	0,83	85,01	9,58	6,75	3,5	475,44	493,07	513,4
9	60	140	1,43	68,24	20,35	14,13	7,71	408,18	447,04	487
10	45	200	1,46	69,44	33,14	24,14	12,79	328,38	384,57	455,41
11	45	140	0,81	76,48	17	12	6	428,47	459,47	496,25
12	30	80	0,76	61,13	40,57	28,26	15,28	282,01	358,86	439,87
13	45	140	0,79	75,72	17,68	12,72	7,4	425,73	456,73	490,49

Çizelge 3.4. Disagn Expert programı ile belirlenen süperkritik CO_2 ekstraksiyon çalışma koşulları(**devam**)

ABTS YÜZDE SÜPÜR ME 75MG/ 100 ML	ABTS YÜZDE SÜPÜR ME 50MG/ 100 ML	ABTS YÜZDE SÜPÜR ME 25MG/ 100 ML	ABTS TROLOX 75MG/ 100 ML	ABTS TROLOX 50MG/ 100 ML	ABTS TROLOX 25MG/100 ML	CUPRAC 75MG/ 100ML	CUPRAC 75MG/ / 100M	CUPRAC 75MG/ 100M	DPPH IC50	ABTS IC50
33,69	23,87	14,32	303,27	345,18	385,93	12,49	7,68	2,84	219	117,44
34,51	24,96	13,91	299,78	340,53	387,68	11,64	4,99	2,83	207	116,77
33,69	23,76	13,50	303,27	345,77	389,43	12,63	7,85	2,51	202	108,88
49,3	36,20	22,96	227,79	285,61	341,69	20,20	15,86	7,17	1292	76,29
21,42	15,82	10,01	349,45	370,60	395,83	0,46	0	0	2112	199,99
47,33	29,83	19,04	243,89	305,99	355,66	16,41	10,33	4,00	871	81,69
70,44	57,21	30,95	140,46	204,50	310,45	10,14	6,28	2,82	502	46,37
20,72	17,64	11,69	349,84	363,42	386,90	2,20	1,14	0,63	2035	234,33
40,40	31,93	18,41	267,95	306,96	356,24	5,14	4,01	1,14	960	94,9
64,21	47,26	26,75	166,47	241,56	326,17	8,73	5,131	1,96	577	55,23

aTotal phenolic content (TPC) was expressed as mg gallic acid equivalents (GAE) per 100 g sample.
bDefined as the amount of sample to provide 50% decrease in the initial amount of DPPH (g sample/g DPPH).
cExpressed as mg trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) per 100 g sample
** The results evaluated according to P value and Lack of Fit



Şekil 3.5. Disagn Expert programı ile belirlenen süperkritik CO_2 ekstraksiyon çalışma verilerinin grafiksel dağılımı.

3.2.2.Gas kromatografi / kütle spektroskopi (GC-MS) yöntemi ile uçucu yağ bileşenlerinin tayini.

GC-MS analizi için farklı metodlarda ve paremetlerde elde edilen uçucu yağlar 1mL'lik viallere 50µL uçucu yağ ve 950 µL haksan olacak şekilde hazırlanır. Hazırlanan numuneler Shimadzu marka GC-MS cihazında okumaları yapılmıştır.



Şekil 3.6. Gaz kromotografisi- Kütle spektroskopi cihazı

3.2.3. Kimyasal Analizler

3.2.3.1. DPPH ile antioksidan madde analizi

Meyve ve sebzelerdeki fenolik ve flovonoid maddeler insan vücudunda koruyucu etkiye sahiptir. Bu maddeler aynı zamanda antioksidan aktiviteye sahiptirler ve serbest radikallerin oluşturduğu oksidatif hasara karşı hücreyi koruma görevine karşı olumlu etki gösterirler (Wada ve Ou, 2002).

Meyvelerdeki antioksidant varlığının bilinmesi üzerine 3 farklı metod ile elde edilmiş olan turunçgil kabuğu uçucu yağlarının antioksidant varlığını tespit edilmeye çalışılmıştır. Tez çalışmamızda antioksidan madde varlığının tespiti Brand ve ark. (1995), metoduna göre yapılmıştır.

Bu yöntemde radikal grup olan DPPH çözeltisinin hidrojen verme eğiliminde bulunan molekül ile karıştırılması ve ortamda bulunan DPPH çözeltisini süpürülmesi esasına dayanır. Karışım sonucunda serbest radikaller elektronlar bağlanır ve DPPH çözeltisinde renk kaybına neden olur. Bu renk değişimi spektrofotometrede belirlenir.

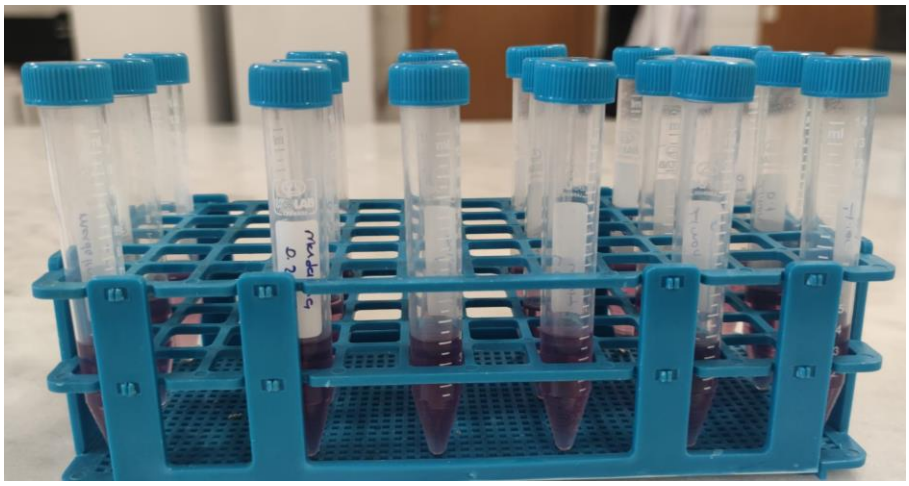


Şekil 3.7. Spektrofotometre Cihazı

3.2.3.1.1. DPPH ile antioksidant madde analizi uygulanışı

Antioksidan analizi için öncelikle radikal olan DPPH çözeltisi hazırlanmıştır. Turunçgil uçucu yağlarımız etanolle farklı konsantrasyonlara seyreltilmiştir. Uçucu yağların minimum süpürme aktivitelerinin belirlenmesi için farklı denemeler yapılmıştır. Minumum değerler ve artan lineer konsantrasyonlar belirlenmiştir. Konsantrasyon artışı ve süpürme kapasitesi arasında doğru orantı olması beklenir.

Seyreltilen uçucu yağlarımız farklı oranlarda 3 paralel olacak şekilde deney tüplerine eklenmiştir ve üzerine 4 ml' ye tamamlanacak şekilde DPPH çözeltisi eklenmiştir. Hazırlanan çözeltiler Vorteksten geçirilerek homojen dağılım sağlanmıştır. Tüpler Şekil 3.8'de göründüğü gibi oda sıcaklığında karanlık ortamda yarım saat bekletilmiştir. Daha sonra numuneler 517 nm dalga boyuna ayarlanmış SHIMADZU UV-1280 UV-VIS marka model spektrofotometrede absorbans okumaları yapılmıştır. Çıkan absorbans değerlerinden yararlanarak süpürülen DPPH yüzdeleri ve IC50 değerleri belirlenmiştir.



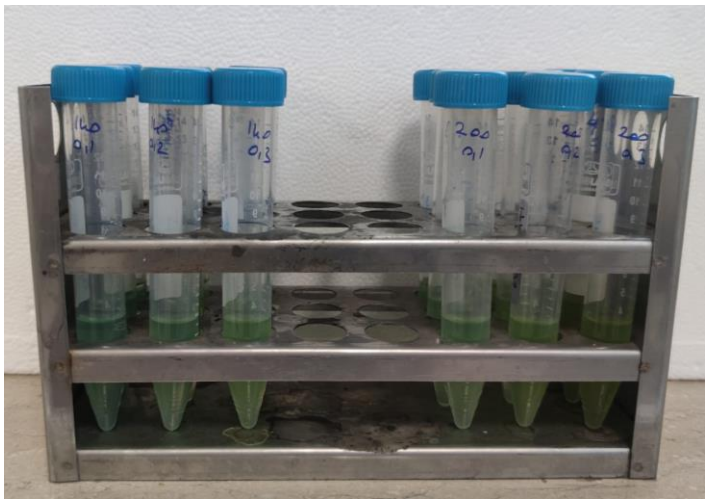
Şekil 3.8. Turunçgil Uçucu Yağlarında DPPH % İnhibisyon Antioksidant Madde Analizi

3.2.3.2. ABTS ile antioksidant tayini

ABTS+ katyon radikali antioksidant madde analizi Re ve ark. (1999)'nın kullanmış olduğu metoda göre gerçekleştirilmiştir. 7 M ABTS+ katyonu çözeltisi ile suda çözündürülmüş 0.00245 M potasyum persülfat (K2S2O8) karıştırıldı. Elde edilen çözelti 12 saat süresince oda sıcaklığında ve ışık alamayan bir bölgede bekletildi. ABTS+ çözeltisini analizlerde kullanılmadan önce spektrofotometrede 734 nm'deki absorbansı 0.708±0.025'ye değer aralığına gelene kadar seyreltilmiştir.

3.2.3.2.1. ABTS ile antioksidant madde analizi uygulanışı

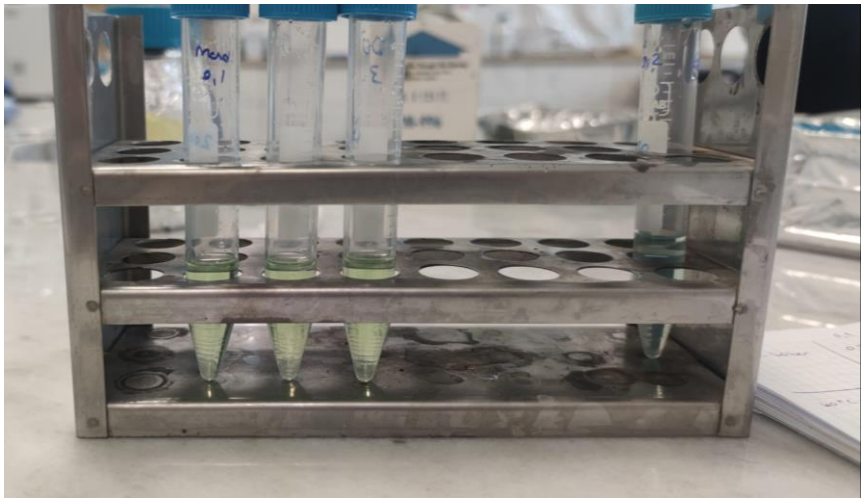
Turunçgil uçucu yağlarının ABTS antioksidant madde analizi için öncelikli olarak uçucu yağlar etanolle farklı konsantrasyonlarda seyreltilmiştir. Seyreltilen uçucu yağların minimum radikal süpürme aktivitesinin konsantrasyonları yapılan denemelerle belirlenmiştir. Radikal süpürme aktivitesinin artan konsantrasyon oranı ile doğru orantılı olması beklenir. Uçucu yağlar denemelerle belirlenmiş konsantrasyonlarda farklı oranlarda üç paralel çalışma olacak şekilde deney tüplerine konulmuştur. Deney tüplerindeki örneklerin üzerine 4 ml' ye tamamlanacak miktarda ABTS çözeltisi eklenmiştir. Deney tüpleri oda sıcaklığında karanlık ortamda 10 dk bekletilmiştir (Şekil 3.9.). Bekleme süresi dolan numuneler 734 nm dalga boyuna ayarlanmış Shimadzu UV-1800 UV-VIS Spektrofotometrede absorbans okumaları yapılmıştır. Elde edilen absorbans sonuçlarından yararlanarak yüzde radikal süpürme oranları ve IC50 değerleri belirlenmiştir.



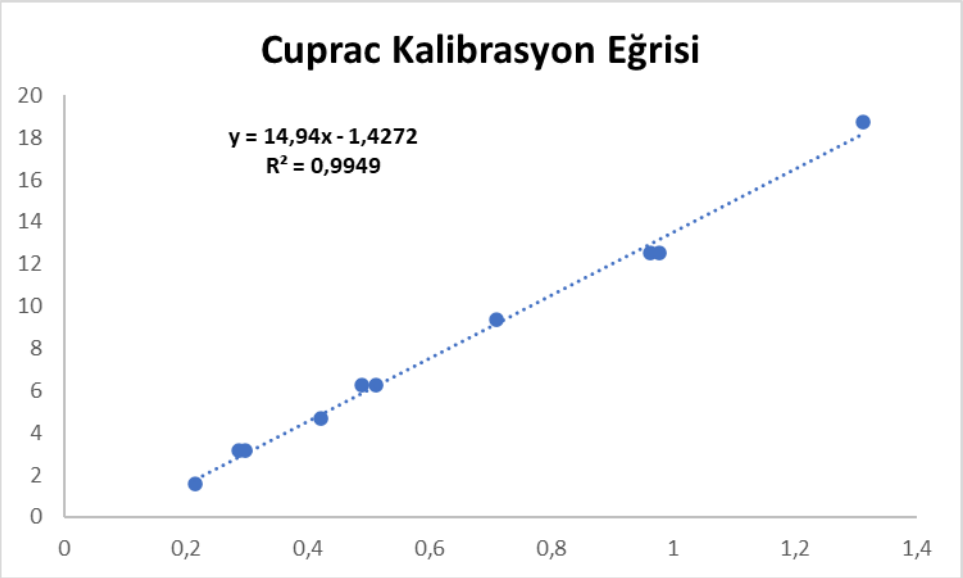
Şekil 3.9. Turunçgil Uçucu Yağlarının ABTS % İnhibisyon Antioksidant Madde Analizi

3.2.3.3. CUPRAC metodu ile antioksidant madde analizi

CUPRAC metodu ile antioksidan analizi Apak ve arkadaşları tarafından 2004 yılında belirlenen metoda göre gerçekleştirildi. Hidrofilik ve lipofilik antioksidan bileşiklere etkigösteren Cu(II)-neokuproin(Nc) reaktiften yararlanılan metod, literatürde CUPRİC Reducing Antioxidant Capacity: CUPRAC (bakır (II) iyonu indirgeme) antioksidan bileşik tayini olarak da adlandırılmaktadır. Yöntem bakır(II) iyonunun indirgenerek Cu(I)-Nc kelatının oluşması sonucu renginin daha koyu sarı olmasına ve 450 nm'de en yüksek absorbans yapması ile açıklanır. Analiz için. 1.0×10- 2 M CuCl2.2H2O çözeltisi saf su ile hazırlandı. 1 M Amonyum asetat çözeltisi ve 7.5×10-3 M Neokuproin (2.9-dimetil-1.10-fenantrolin) çözeltisi hazırlandı. Trolox referansının 62,5 ppm, 125 ppm, 250 ppm, 500 ppm, ve 2000 ppm konsanstrasyonlarındaki absorbansına bakıldı ve kalibrasyon eğrisi belirlendi. Kalibrasyon eğrisinin regrasyon değeri 0.99'den büyük ve lineeritesinin büyük oranda olduğu tespit edildi (Şekil 3.10. ve Şekil 3.11.).



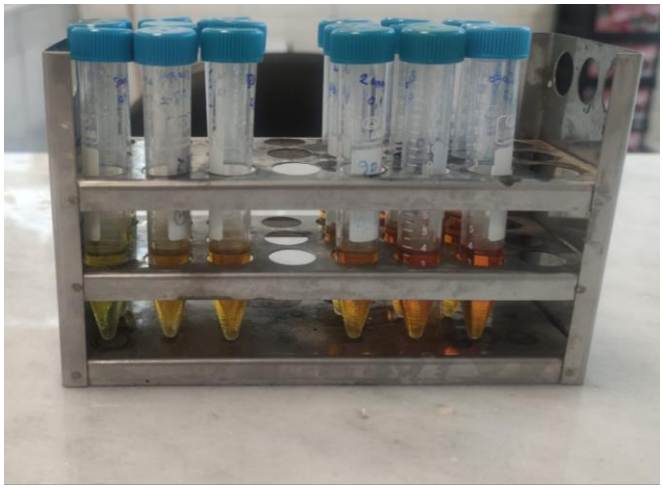
Şekil 3.10. Turunçgil Kabuğu Uçucu Yağlarının CUPRAC Metodu ile Antioksidant Tayini



Şekil 3.11. CUPRAC Metodu için Hazırlanan Trolox Kalibrasyon Eğrisi

3.2.3.3.1. CUPRAC metodu ile antioksidan madde uygulanışı

CUPRAC yöntemi ile antioksidant madde tayini için öncelikli olarak farklı konsantrasyonlarda numunelerin minimum oranda antioksidan madde kapasitesi ve lineer artış gösterdikleri oranlar belirlenmiştir. Uçucu yağlarımız belirlenen miktarlara göre üç farklı konsantrasyonda etenol ile 3 farklı konsantrasyona seyreltildi. Her numune için üç paralel olacak şekilde analiz için örnekler hazırlandı. Seyreltilen örneklerden 1 ml miktarında deney tüplerine alındı. Üzerlerine sırası ile 1 ml 1.0×10-2 M CuCl2.2H2O çözeltisi, 1 ml 1 M Amonyum asetat çözeltisi ve 1 ml 7.5×10-3 M Neokuproin (2.9-dimetil-1.10-fenantrolin) çözeltisi eklendi. Tüpler vorteksten geçirilerek karıştırıldı. 30 dakika oda sıcaklığında ışıksız ortamda bekletildi. Numuneler Shimadzu UV-1800 UV-VIS Spektrofotometre cihazında 450 nm dalga boyunda örneklerin absorbans değerleri ölçüldü (Şekil 3.12.) Sonuçların trolox eşdeğerleri hesaplandı.



Şekil 3.12. Trolox Kalibrasyon Eğrisi için Yapılan CUPRAC Analizi

3.2.4. Kolon Sisteminin Kurulması

Turunçgil kabuğu uçucu yağlarından D- limonen zenginleştirmesi işlemi için kurulacak olan kolon için silikajel plastik hortumumuz temin edilmiştir. Sistemimizi oluşturmak için öncelikli olarak temin ettiğimiz silikajeli, etken madde izolasyonun yapılacağı plastik hortuma boşluk kalmayacak şekilde doldurulmuştur. Plastik hortum daha önceden yüksek sıcaklıklara maruz bırakılarak dayanıklılığı ölçülmüştür. 300 °C 'ye kadar dayanıklı olan hortumda yumuşama dışında herhangi bir dezerformasyon tespit edilememiştir. Yaklaşık olarak 15 metre uzunluğundaki, silikajel ile doldurulmuş olan hortum yüksek sıcaklıklara çıkabilen etüv içerisine yerleştirilmiştir. Etüv içerisine yerleştirilen hortumum çıkış kısmı etüv cihazının havalandırma kısmından yukarı doğru çıkarılmıştır. Çıkış kısmına santrifüj tüpü bağlanmıştır. Santrüfüj tüpünün çevresine, çıkan ürünün gaz fazından sıvı faza geçmesini sağlamak için soğuk pres yapılmıştır. Hortumun giriş kısmı ise etüv cihazının kapağından dışarıya doğru çıkarılmıştır. Giriş kısmının ucuna da tıpkı çıkış kısmında olduğu gibi santrifüj tüpü bağlanmıştır. Santrüfüj tüpünün içerisine turunçgil uçucu yağlarımız doldurulmuştur. Turunçgil uçucu yağı ile dolu olan tüpümüz içerisinde silikon yağı bulunan başka bir cam hazneye daldırılmıştır. Cam hazne içerisinde bulunan silikon yağının özelliği yüksek sıcaklıklara kısa sürede çıkabilmesidir. Silikon yağı ile dolu

cam hazne ısıtıcı üzerine yerleştirilmiştir. Burada amaç silikon yağının ısınmasıyla içerisine tüp ile daldırdığımız turunçgil uçucu yağların sıvı fazdan gaz fazına geçerek kolon içerisinde ilerlemesini sağlamak ve uçucu yağ içerisinde bulunan terpenlerin farklı kaynama noktalarından yararlanarak etken maddeleri zenginleştirmek.



Şekil 3.13. D-Limonen izolasyon sistemi

4.ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Bu çalışmada turunçgil kabuklarından geleneksel, mikrodalga ve süperkritik CO_2 metodu ile uçucu yağları elde edilmiştir. Öncelikli olarak portakal kabuklarından üç farklı metod kullanılarak uçucu yağ elde edilmiştir. Geleneksel metotda orta ayar sıcaklığında 3,4 ve 5 saatlik ekstraksiyon işlemleri gerçekleştirilmiştir ve yüzde yağ verimleri belirlenmiştir. Mikrodalga ekstraksiyon yönteminde 250, 300, 350 Watt değerlerinde uçucu yağlar elde edilmiştir ve yüzde yağ verimleri belirlenmiştir. Süperkritik ektrasksiyon cihazında optimizazyon işleminde kullanılacak değerler Design-Expert programı ile belirlenmiştir. Bu üç yöntem ile elde edilmiş portakal kabuğu yağlarının GC-MS cihazı ile etken madde içerikleri ve oranları belirlemiştir. En yüksek D-limonen oranı elde edilen 300 Watt değerinde mikrodalga yöntemi ile elde edilen uçucu yağda tespit edilmiştir. Mikrodalga yöntemi ile mandalina kabuğu, limon kabuğu ve greyfurt kabuğu uçucu yağları da elde edilmiştir ve elde edilen bu turunçgil yağları GC-MS cihazında etken madde analizleri yapılmıştır. Bundan sonraki aşamada etken madde yüzdeliği açısından en optimum yöntem olan mikrodalga yöntemi ile uçucu yağlar elde edilmiştir. Hazırlanmış olan kolon sisteminden farklı sıcaklık değerlerinden geçirilerek etken madde zenginleştirilmesi yapılmaya çalışılmıştır.

4.1. Yanıt Yüzey Metodolojisi ile Model İstatistiği

Çizelge 4.1. Turunçgil kabuğu uçucu yağının yanıt yüzey metodolijisi ile model istatiği

		StdDev	R^2	R^2_{adj}	F value	p-value	Lackoffit	Reamrks
DPPH SÜPÜRME 75 mg/100ml	Linear	9,20	0,19	0,03	1,16	0.3510	<0.0001	
	2FI	6,09	0,68	0,57	13,83	0.0048	<0.0001	
	Quadratic	4,66	0,85	0,75	4,20	0.0633	<0.0001	
	cubic	0,31	1,00	1,00	771,80	<0.0001	0.2317	Suggested
DPPH SÜPÜRME 25mg/100ml	Linear	2,88	0,44	0,33	3,94	0.0548	0.0017	
	2FI	2,46	0,63	0,51	4,66	0.0591	0.0028	
	Quadratic	1,76	0,85	0,75	5,26	0.0403	0.0077	
	cubic	0,53	0,99	0,98	35,93	0.0011	0.8744	Suggested
DPPH TROLOX 75 mg/100ml	Linear	57,45	0,19	0,03	1,16	0.3511	<0.0001	
	2FI	38,02	0,68	0,57	13,82	0.0048	<0.0001	
	Quadratic	29,05	0,85	0,75	4,21	0.0631	<0.0001	
	cubic	1,64	1,00	1,00	1089,35	<0.0001	0.1481	Suggested
DPPH TROLOX 25 mg/100ml	Linear	17,89	0,44	0,33	3,96	0.0541	0.0006	
	2FI	15,28	0,63	0,51	4,72	0.0579	0.0011	
	Quadratic	10,87	0,86	0,75	5,39	0.0383	0.0030	
	cubic	2,59	0,99	0,99	59,07	0.0003	0.8502	Suggested
ABTS SÜPÜRME 75 mg/100ml	Linear	15,16	0,32	0,18	2,34	0.1465	<0.0001	
	2FI	11,01	0,68	0,57	9,95	0.0117	<0.0001	
	Quadratic	6,29	0,92	0,86	10,29	0.0082	0.0004	
	cubic	0,95	1,00	1,00	150,96	<0.0001	0.4480	Suggested
ABTS SÜPÜRME 50 mg/100ml	Linear	12,79	0,24	0,09	258,81	1,58	<0.0001	
	2FI	9,71	0,61	0,48	788,57	8,37	0.0002	
	Quadratic	4,91	0,92	0,87	339,48	14,07	0.0018	
	cubic	1,27	1,00	0,99	80,42	50,15	0.2230	Suggested
ABTS IC50	Linear	40,38	0,55	0,47	6,22	0.0176	<0.0001	
	2FI	22,88	0,87	0,83	22,14	0.0011	0.0005	
	Quadratic	20,09	0,92	0,87	2,34	0.1671	0.0006	
	cubic	3,23	1,00	1,00	133,07	<0.0001	0.8990	Suggested
CUPRAC TROLOX 50 MG/100 ML	Linear	2,22	0,74	0,69	14,22	0.0012	0.0891	
	2FI	2,21	0,77	0,69	1,00	0.3428	0.0827	
	Quadratic	1,79	0,88	0,80	3,35	0.0951	0.1425	Suggested
	cubic	2,03	0,89	0,74	0,25	0.7905	0.0434	
CUPRAC TROLOX 25 MG/100 ML	Linear	1,06	0,70	0,65	11,93	0.0022	0.0530	
	2FI	0,97	0,78	0,70	2,90	0.1230	0.0675	
	Quadratic	0,91	0,85	0,74	1,63	0.2628	0.0665	Suggested
	cubic	0,96	0,88	0,71	0,64	0.5642	0.0247	

a The model p value of less than 0.001 indicates the model is significant.
b The model p value of less than 0.05 indicates the model is significant.
ns The model p value of more than 0.05 indicated the model is not significant

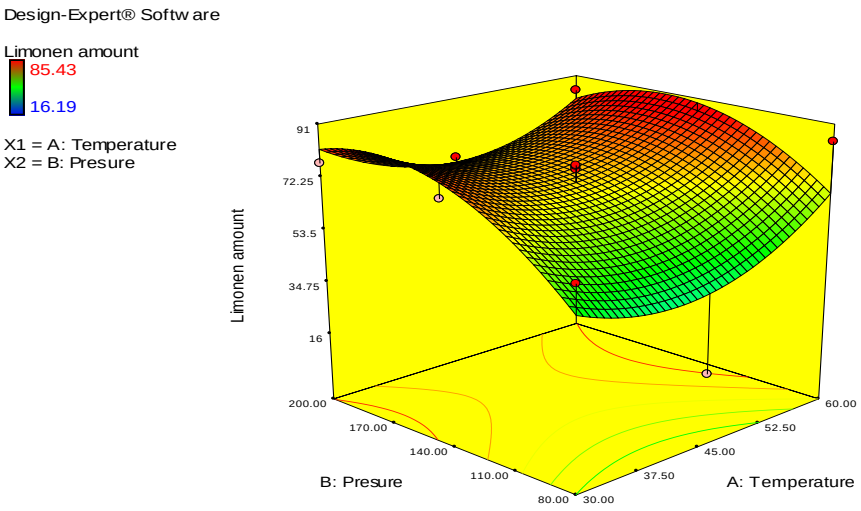
Çizelge 4.2. Bağımlı değişkenlerin varyans analizlerinin Model eşitlikleri

Coefficient/ Value	DPPH 75 mg/ 100 ml*	DPPH 25 mg/100ml*	DPPH TROLOX 75	DPPH TROLOX 25	ABTS SÜPÜRME 75	ABTS SÜPÜRME 50	ABTS TROLOX 50	ABTS IC50	CUPRAC TROLOX 50	CUPRAC TROLOX 25
Ω0	17,27^{f}	6,69^{f}	427,46^{f}	493,47^{f}	33,45^{f}	23,18^{f}	297,0^{f}	113,92^{f}	6,22^{c}	2,42^{b}
Linear										
Ω1 (Sıcaklık)	1,345^{e}	0,91^{x}	8,369^{d}	5,63^{c}	3,466^{c}	1,0505^{x}	3,64^{x}	6,605^{a}	3,50^{c}	1,37^{b}
Ω2 (Basınç)	11,59^{f}	4,29^{f}	72,33^{f}	26,75^{f}	21,39^{f}	15,72^{f}	71,54^{f}	72,38^{f}	3,3095^{c}	1,60^{c}
Interaction										
Ω12 (Temperature×Presure)	11,32^{f}	2,65^{e}	70,69^{f}	16,58^{f}	17,367^{f}	14,04^{f}	43,109^{f}	53,835^{f}	1,109^{x}	0,828^{x}
Second Order										
Ω11 (Temperature×Temperature)	4,591^{f}	1,975^{e}	28,66^{f}	12,34^{e}	10,07^{f}	8,38^{f}	29,58^{f}	25,8^{f}	2,50^{b}	0,93^{x}
Ω22 (Presure×Presure)	4,44^{f}	1,85^{e}	27,76^{f}	11,546^{d}	9,02^{f}	9,05^{f}	27,55^{f}	13,48^{c}	2,10^{x}	0,66^{x}
Third Order										
Ω112 (Temperature×Temperature×Presure)	10,27^{f}	3,14^{e}	64,11^{f}	19,5^{e}	13,90^{f}	9,97^{e}	0	32,23^{f}	0	0
Ω122 (Temperature×Presure×Presure)	-2,82^{f}	-2,32^{e}	17,63^{f}	14,54^{e}	3,32^{d}	4,58^{c}	0	32,27^{f}	0	0

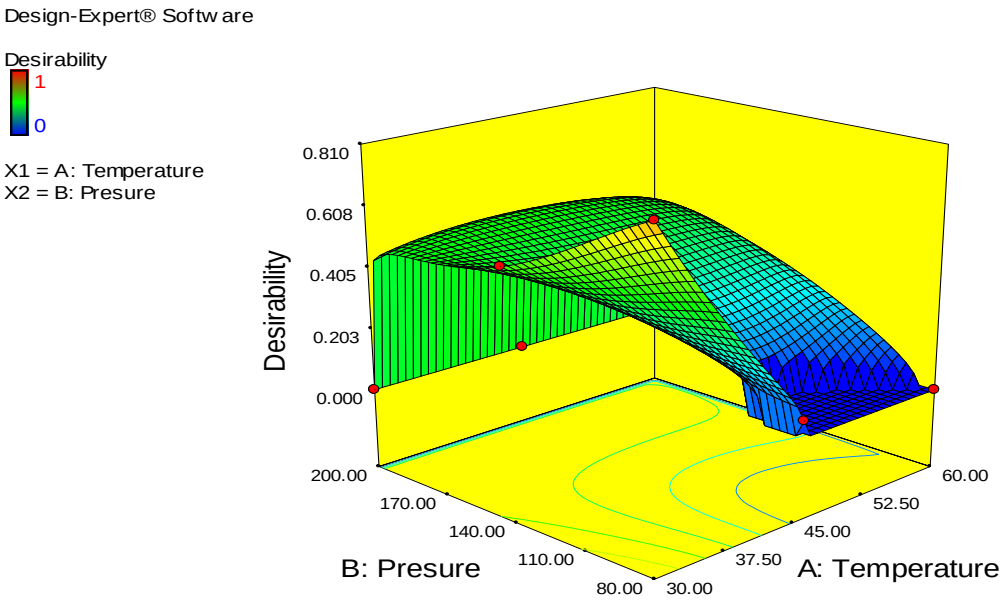
Model: Y (response) = Ω0 + Ω1(Temperature) + Ω2(Presure) + Ω12(Temperature×Presure) + Ω11(Temperature×Temperature) + Ω22(Presure×Presure) + Ω112 (Temperature×Temperature×Presure) + Ω122 (Temperature×Presure×Presure)

Statistical significance degrees: *equational coefficient,

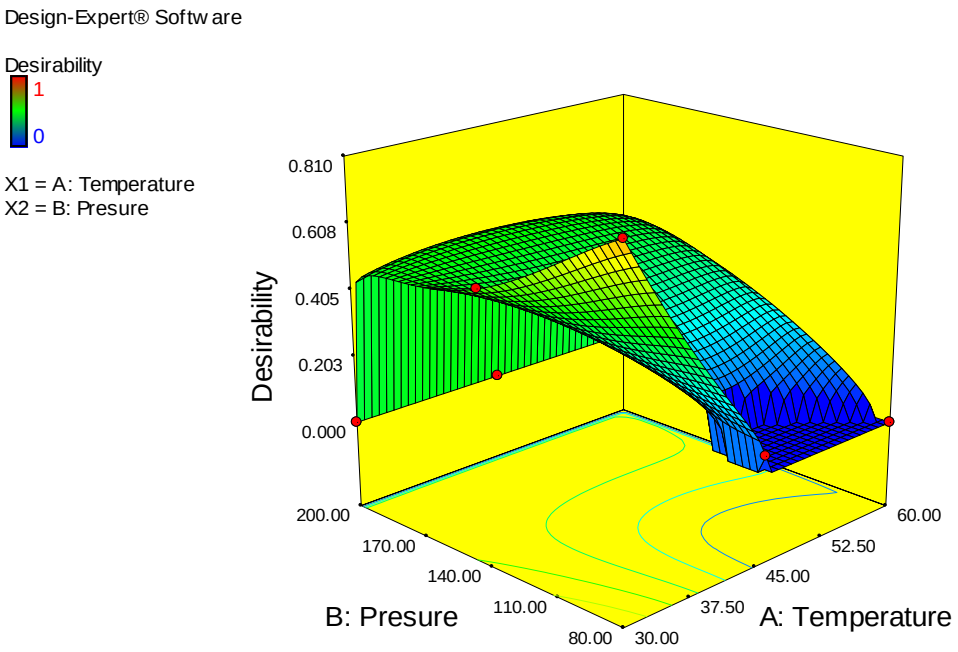
aP<0.05; bP<0.01; cP<0.005, dP<0.001 , eP<0.0005 f p<0,0001 xp>0,05



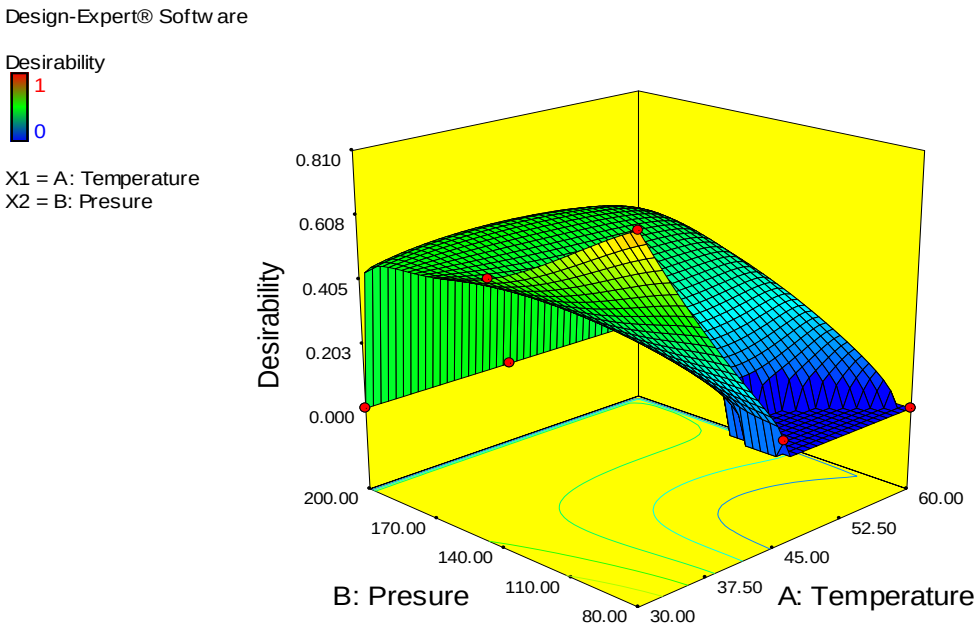
Şekil 4.1. Deney dizaynına göre D-limonen miktarının basınç-sıcaklığa bağlı değişim haritası



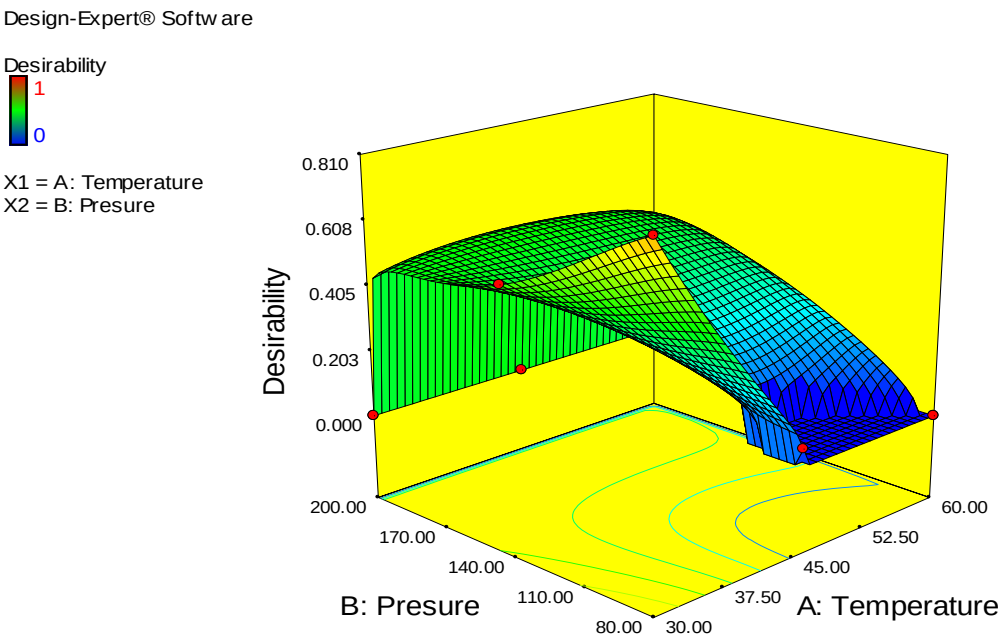
Şekil 4.2. Deney Dizaynına göre 75mg/100 ml'de DPPH Yüzde Süpürme Miktarının Basınç-sıcaklığa bağlı değişim haritası



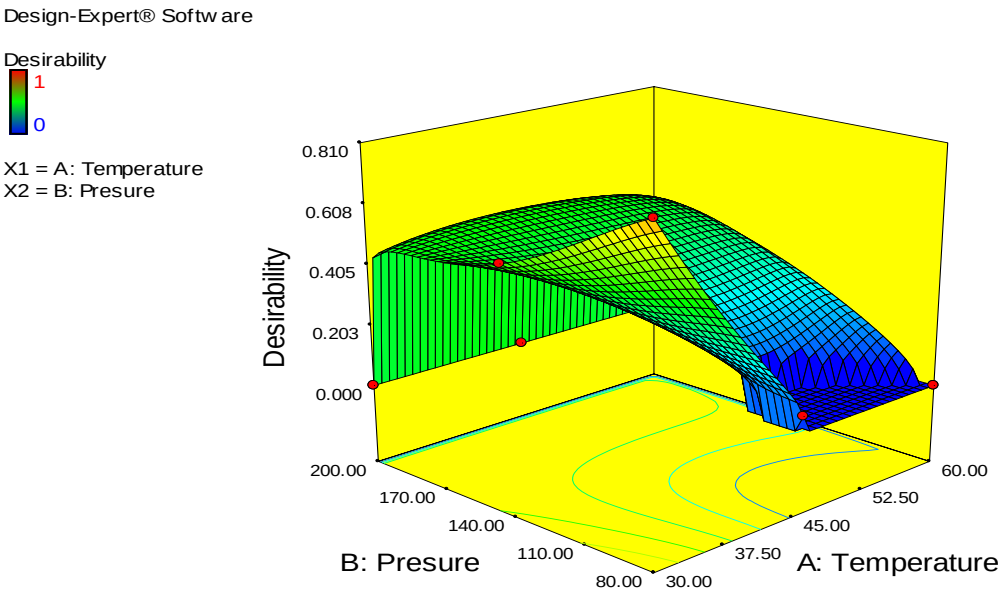
Şekil 4.3. Deney Dizaynına göre 25mg/100 ml'de DPPH Yüzde Süpürme Miktarının Basınç-sıcaklığa bağlı değişim haritası



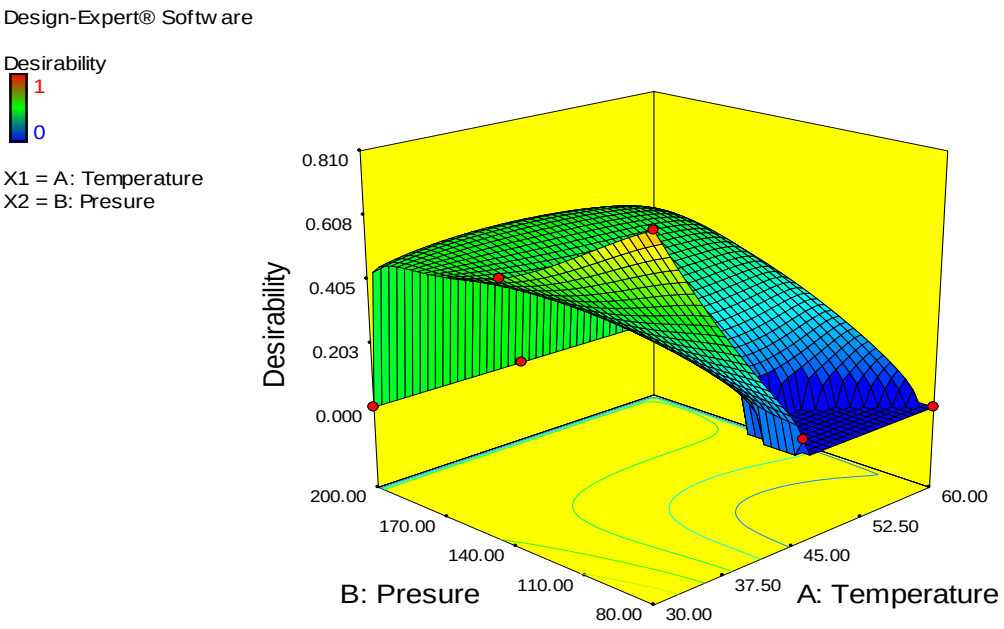
Şekil 4.4. Deney Dizaynına göre 75mg/100 ml'de DPPH Trolox Miktarının Basınç-sıcaklığa bağlı değişim haritası



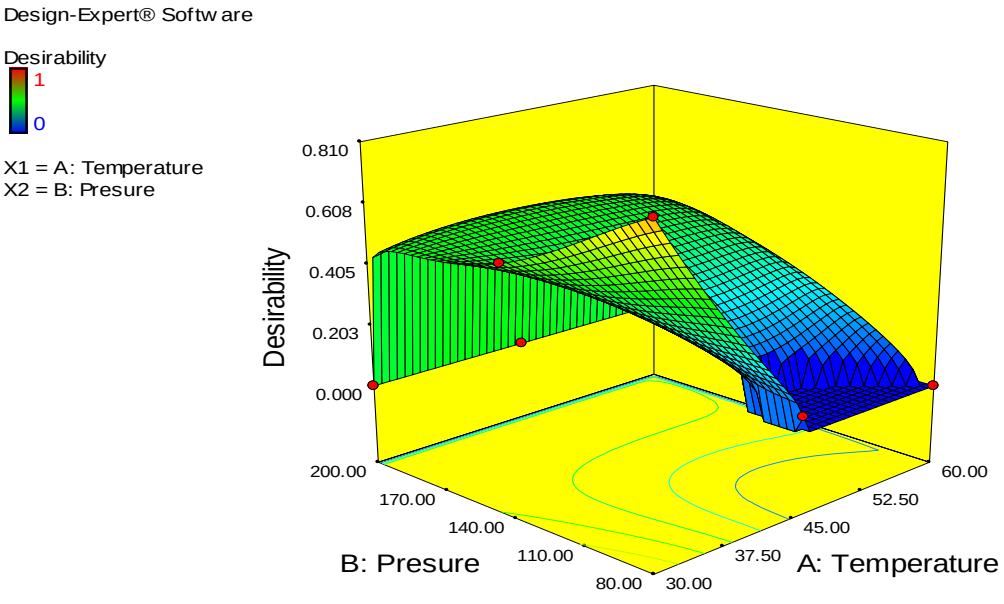
Şekil 4.5. Deney Dizaynına göre 25mg/100 ml'de DPPH Trolox Miktarının Basınç-sıcaklığa bağlı değişim haritası



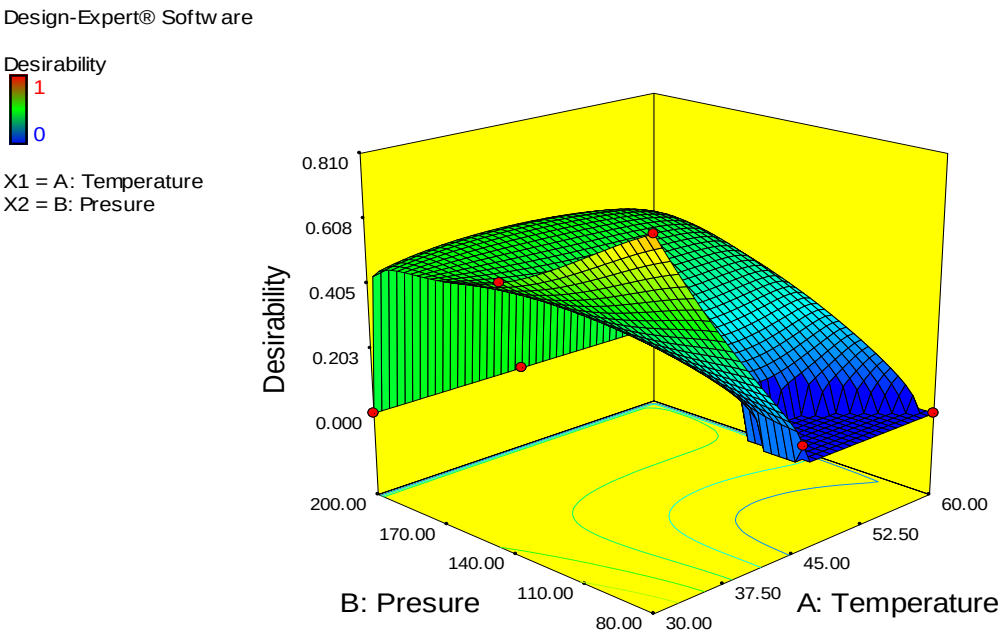
Şekil 4.6. Deney Dizaynına göre 75mg/100 ml'de ABTS Yüzde Süpürme Miktarının Basınç-sıcaklığa bağlı değişim haritası



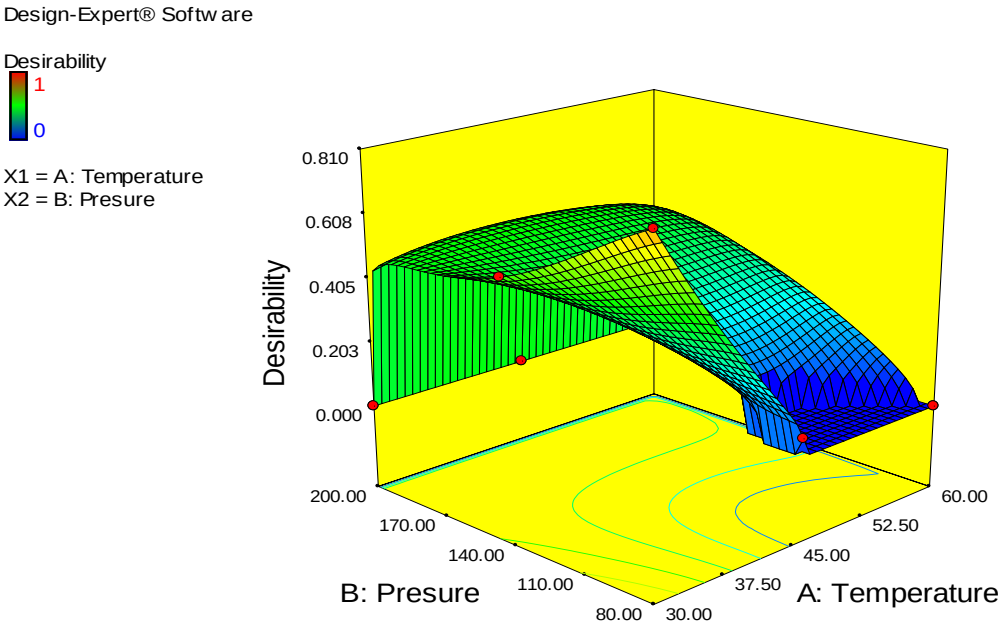
Şekil 4.7. Deney Dizaynına göre 50mg/100 ml'de ABTS Yüzde Süpürme Miktarının Basınç-sıcaklığa bağlı değişim haritası



Şekil 4.8. Deney Dizaynına göre ABTS IC50 Miktarının Basınç-sıcaklığa bağlı değişim haritası



Şekil 4.9. Deney Dizaynına göre 50 mg/100 ml'de CUPRAC Trolox Miktarının Basınç-sıcaklığa bağlı değişim haritası



Şekil 4.10. Deney Dizaynına göre 25 mg/100 ml'de CUPRAC Trolox Miktarının Basınç-sıcaklığa bağlı değişim haritası

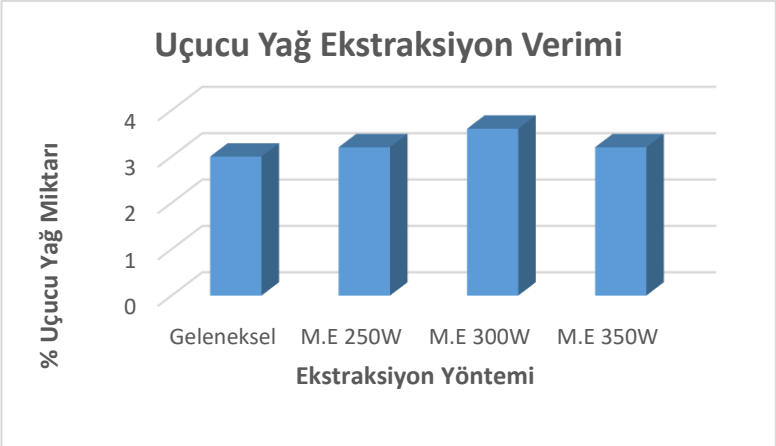
4.2. Farklı Uçucu Yağ Ekstraksiyon Yöntemlerinde Uçucu Yağ Veriminin Belirlenmesi

Çizelge 4.3. Portokal kabuklarının uçucu yağ ekstraksiyonu sonucunda elde edilen uçucu yağ miktarları.

Numune	Miktar (g)	Ekstraksiyon Yöntemi	Ekstraksiyon Süresi	Uçucu Yağ Miktarı (mL)	Verim
P.K	50	Geleneksel	5 h	1,5	%3,0
P.K	50	M.D 250 W	3 h	1,8	%3,6
P.K	50	M.D 300 W	2 h	1,8	%3,6
P.K	50	M.D 350W	1,5-2 h	1,6	%3,2

P.K: Portokal Kabuğu M.D: Mikrodalga

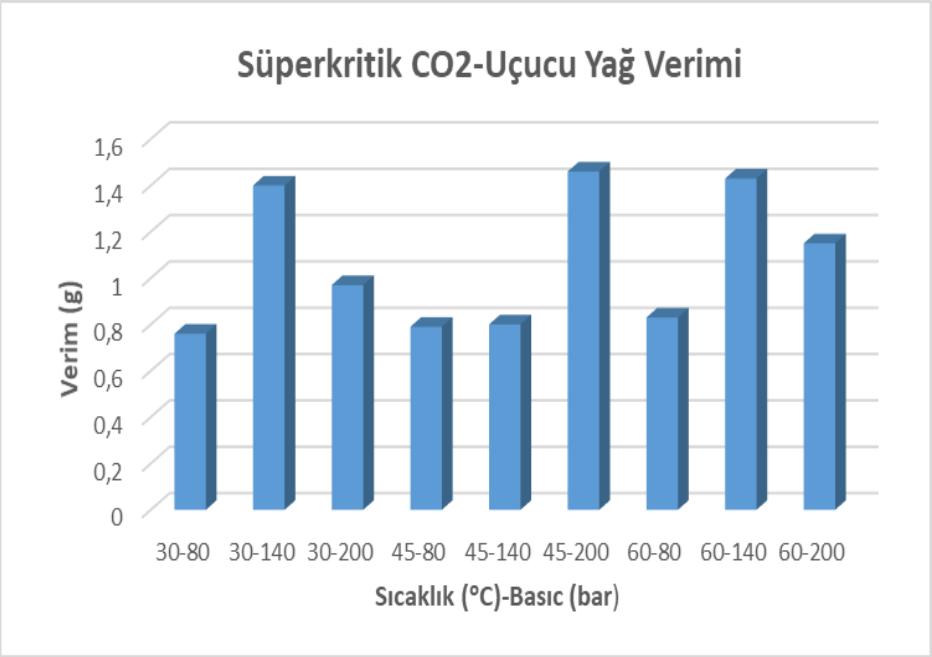
Portakal kabuklarında geleneksel metod ile 3,4 ve 5 saatlik ekstraksiyonlar yapılmıştır. En yüksek yağ verimi 5 saat ile yapılan ekstraksiyondan elde edilmiştir. Mikrodalga ekstraksiyonlarında elde edilen en yüksek yağ verimleri 250 Watt'da 3 saat, 300 Watt'da 2 saat ve 350 Watt'da 1,5-2 saat aralığında yapılan ekstraksiyonlardır. Yapılan uçucu yağ ekstraksiyonlarında yağ verimleri % 3 ve % 3,6 aralığında değişmiştir. Tablo(4.3.) de verilen uçucu yağı miktarları 3 tekrardan alınan ortalama değerlerdir. Ayrıca tablodaki uçucu yağ ekstraksiyon verimleri aynı poşetten alınan taze portokal kabukları ile elde edilmiştir. Farklı dönemlerde portokal suyu sıkımı yapan lokal marketlerden alınan portokla kabukları ile yapılan ekstraksiyonlardan farklı (daha düşük %0,6-1,8) uçucu yağ verimi elde edilmiştir. Geleneksel ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen uçucu yağın rengi parlak koyu sarı, mikrodalga ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen uçucu yağın rengi ise parlak açık sarı olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 4.11. Farklı uçucu yağ ekstraksiyon yöntemleriyle elde edilen uçucu yağ verimleri.

Çizelge 4.4 Süperkritik CO_2 ekstraksiyon yönteminde farklı sıcaklık-basınç parametreleri için elde edilen uçucu yağ verimleri

	Çalışma Koşulları Sıcaklık (°C)-Basınc(bar)	Verim (%)
Süperkritik CO_2 Ekstraksiyonu	30-80	0,76
	30-140	1,4
	30-200	0,97
	45-80	0,79
	45-140	0,8
	45-200	1,46
	60-80	0,83
	60-140	1,43
	60-200	1,15



Şekil 4.12. Süperkritik CO_2 ekstraksiyon yönteminde farklı sıcaklık-basınç parametreleri için elde edilen uçucu yağ verimleri

Design-Expert programı ile belirlenen sıcaklık-basınç çalışma koşullarının uygulandığı Süperkritik CO_2 ekstraksiyon çalışmasında en düşük uçucu yağ verimi (% 0,76) 30 °C sıcaklık ve 70 bar basınçta yapılan ekstraksiyon çalışmasında elde edilmiştir. En yüksek uçucu yağ verimi (% 1,46) ise 45 °C sıcaklık ve 200 bar basınçta yapılan ekstraksiyon çalışmasında elde edilmiştir.

4.3. Farklı Uçucu Yağ Ekstaraksiyon Yöntemleriyle Elde Edilen Uçucu Yağ Bileşenlerinin Belirlenmesi

Farklı uçucu yağ ekstraksiyon yöntemleriyle elde edilen uçucu yağ ekstrelerinin GC/MS analizi sonucunda toplamda 102 farklı etken madde ve miktarları belirlenmiştir. Şöyleki geleneksel ekstraksiyon ile elde edilen uçuçucu yağda 99 etken madde saptanmıştır. 300 Waat'ta yapılan mikrodalga ekstrakiyon yöntemiyle elde edilen uçucu yağda 97 etken madde belirlenmiştir. 250 Waat ve 350 Waat'ta yapılan mikrodalga ekstraksiyonu sonucunda elde edilen uçucu yağda ise 102 etken madde saptanmıştır. En yüksek bollukta 8 etken madde belirlenmiştir. Farklı uçucu yağ ekstraksiyon yöntemleri için farklı bollukta elde edilen etken maddelerin verileri Tablo 4.5, Tablo 4.6, Tablo 4.7 ve Tablo 4.8'de verilmiştir.

Farklı uçucu yağ ekstraksiyon yöntemlerin uygulanması sonucunda portokal kabuğundan elde edilen uçucu yağ kompozisyonunda beklendiği üzere en yüksek bollukta % 70- 90 arası D-limonen maddesi belirlenmiştir. Çok daha düşük miktarlarda % 2-4 arası β-Mircene, Valence ve β-Patchoulene maddeleri saptanmıştır. % 2-0.5 aralığında 1R-α Pinene, Decanal (CAS), Linalool, ϒ-Terpinene maddeleri saptanmıştır. Diğer geri kalan 94 madde ise uçucu yağ içerisinde % 0.5 ile % 0.01 aralığında bulunmaktadır.

Çizelge 4.5. Geleneksel ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen uçucu yağ'da en yüksek bollukta bulunan bileşenler

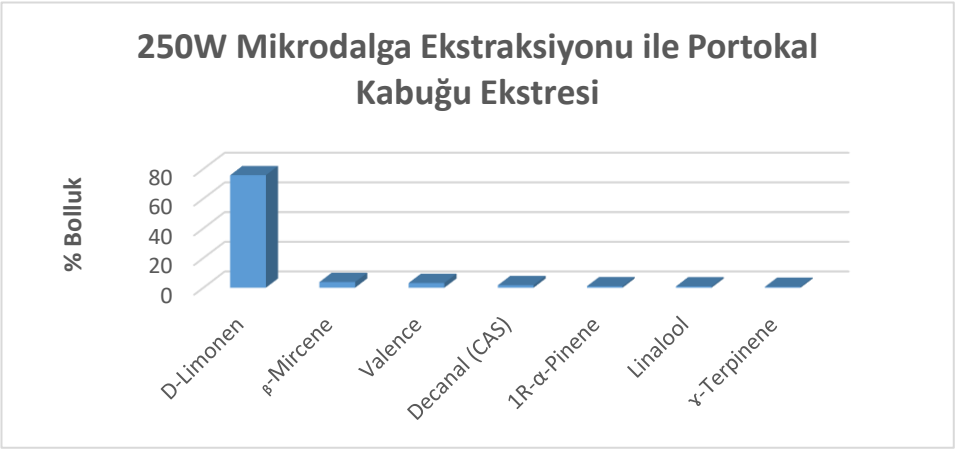
Sıralama	Bileşiğin Adı	% Bolluk
1.	D-Limonen	75,52
2.	β-Mircene	4,09
3.	Valence	2,94
4.	1R-α-Pinene	1,32
5.	Decanal (CAS)	1,24
6.	Linalool	0,88
7.	ϒ-Terpinene	0,64



Şekil 4.13. Geleneksel ekstrakiyon yöntemiyle elede edilen uçucu yağ'ın en yüksek bolluktaki bileşenleri.

Çizelge 4.6. 250 W Mikrodalaga ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen uçucu yağ'da en yüksek bollukta bulunan bileşenler.

Sıralama	Bileşiğin Adı	% Bolluk
1.	D-Limonen	75,8
2.	β-Mircene	3,81
3.	Valence	3,19
4.	Decanal (CAS)	1,7
5.	1R-α-Pinene	1,02
6.	Linalool	0,89
7.	ɣ-Terpinene	0,6



Şekil 4.14. Mikrodalga 250 Watt değerinde elde edilen yağ'ın en yüksek bolluktaki bileşenleri

Çizelge 4.7. 300 W Mikrodalaga ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen uçucu yağ'da en yüksek bollukta bulunan bileşenler

Sıralama	Bileşiğin Adı	% Bolluk
1.	D-Limonen	81,85
2.	β-Mircene	4,53
3.	Valence	1,89
4.	Decanal (CAS)	1,62
5.	1R-α-Pinene	1,04
6.	Linalool	0,66
7.	ϒ-Terpinene	0,55



Şekil 4.15. Mikrodalga 300 Watt değerindeki elde edilen yağın en yüksek bolluktaki bileşenleri

Çizelge 4.8. 350 W Mikrodalga ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen uçucu yağ'da en yüksek bollukta bulunan bileşenler

Sıralama	Bileşiğin Adı	% Bolluk
1.	D-Limonen	68,83
2.	β-Patchoulene	3,75
3.	Capraldehyde	2,73
4.	β-Mircene	3,53
5.	ϒ-Terpinene	1,86
6.	Linalool	1,99
7.	α-Pinene	1,18



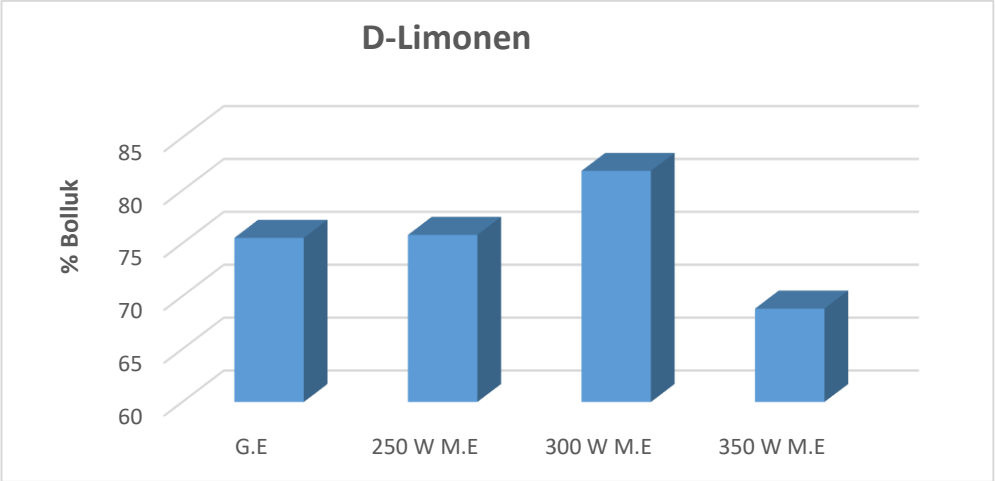
Şekil 4.16. Mikrodalga 350 Watt değerinde elde edilen yağın en yüksek bolluktaki bileşenleri

4.4. Farklı Uçucu Yağ Bileşenleri için Optimum Ekstraksiyon Yönteminin Belirlenmesi

Farklı uçucu yağ ekstraksiyon yöntemleri için en yüksek bollukta bulunan uçucu yağ bileşenlerinin miktarları Şekil 4.9, 4.10, 4.11, 4.12, 4.13, 4.14, 4.15 ve 4.16'da verilmiştir.

Çizelge 4.9. Farklı uçucu yağ ekstraksiyon yöntemleriyle elde edilen uçucu yağ içinde D-Limonen bolluğu

Ekstraksiyon Yöntemi	% Bolluk
Geleneksel E.	75,52
250 W M.D.E	75,8
300 W M.D.E	81,85
350 W M.D.E	68,83
30-80 Süp.CO_2 E.	61,13
30-140 Süp.CO_2 E.	76,18
30-200 Süp.CO_2 E.	77,47
45-80 Süp.CO_2 E.	16,19
45-140 Süp.CO_2 E.	76,10
45-200 Süp.CO_2 E.	69,44
60-80 Süp.CO_2 E.	85,01
60-140 Süp.CO_2 E.	68,24
60-200 Süp.CO_2 E.	85,43

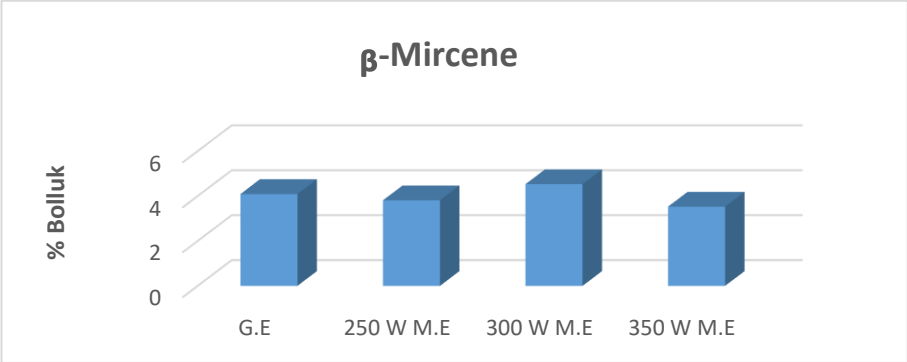


Şekil 4.17. Farklı uçucu yağ ekstraksiyon yöntemleriyle elde edilen D-Limonen bolluğu.

Uçucu yağ içerisinde D-Limonen bileşiği için en düşük verim (% 68.83) 350 Waat'ta yapılan mikrodalga ekstraksiyon yöntemiyle elde edilmiştir. En yüksek verim (%81.85) ise 300 Waat'ta yapılan mikrodalga ekstraksiyon yöntemiyle elde edilmiştir.

Çizelge 4.10. Farklı uçucu yağ ekstraksiyon yöntemleriyle elde edilen uçucu yağ içinde β-Mirisen bolluğu

β-Mircene Ekstraksiyon Yöntemi	% Bolluk
Geleneksel ekstraksiyon	4,09
250 W Mikrodalga ekstraksiyonu	3,81
300 W Mikrodalga ekstraksiyonu	4,53
350 W Mikrodalga ekstraksiyonu	3,53



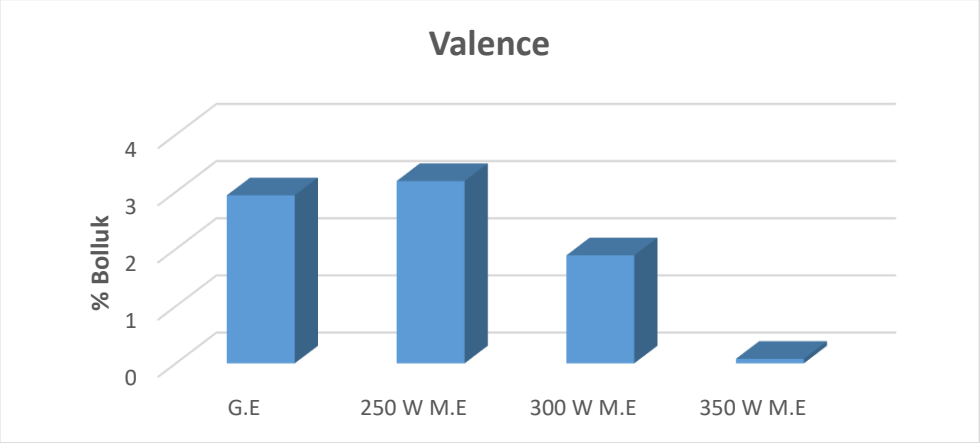
Şekil 4.18. Farklı uçucu yağ ekstraksiyon yöntemleriyle elde edilen β-Mirisen bolluğu

Şekil 4.8'den gözlemleneceği üzere β-Mirisen maddesi için % 4,53 ile optimum uçucu yağ ekstraksiyon yöntemi 300 Waat'ta yapılan mikrodalga ekstraksiyon

yöntemi olurken, % 3,81 ile en düşük β-Mirisen içeriğini veren ekstraksiyon yöntemi 250 Waat'ta yapılan mikrodalga ekstraksiyon yöntemi olmuştur.

Çizelge 4.11. Farklı uçucu yağ ekstraksiyon yöntemleriyle elde edilen uçucu yağ içinde Valence bolluğu

Valence Ekstraksiyon Yöntemi	% Bolluk
Geleneksel ekstraksiyon	2,94
250 W Mikrodalga ekstraksiyonu	3,19
300 W Mikrodalga ekstraksiyonu	1,89
350 W Mikrodalga ekstraksiyonu	0,08

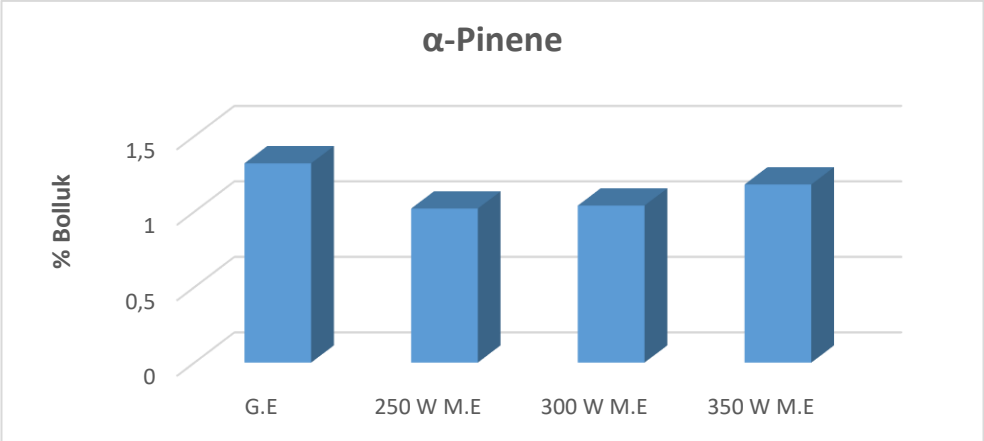


Şekil 4.19. Farklı uçucu yağ ekstraksiyon yöntemleriyle elde edilen Valence bolluğu.

Uçucu yağ içerisinde Valence bileşiği için en düşük verim (% 0.08) 350 Waat'ta yapılan mikrodalga ekstraksiyon yöntemiyle elde edilmiştir. En yüksek verim (% 2.94) ise geleneksel ekstraksiyon yöntemiyle elde edilmiştir.

Çizelge 4.12. Farklı uçucu yağ ekstraksiyon yöntemleriyle elde edilen uçucu yağ içinde α-Piren bolluğu.

1R-α-Pinene Ekstraksiyon Yöntemi	% Bolluk
Geleneksel ekstraksiyon	1,32
250 W Mikrodalga ekstraksiyonu	1,02
300 W Mikrodalga ekstraksiyonu	1,04
350 W Mikrodalga ekstraksiyonu	1,18

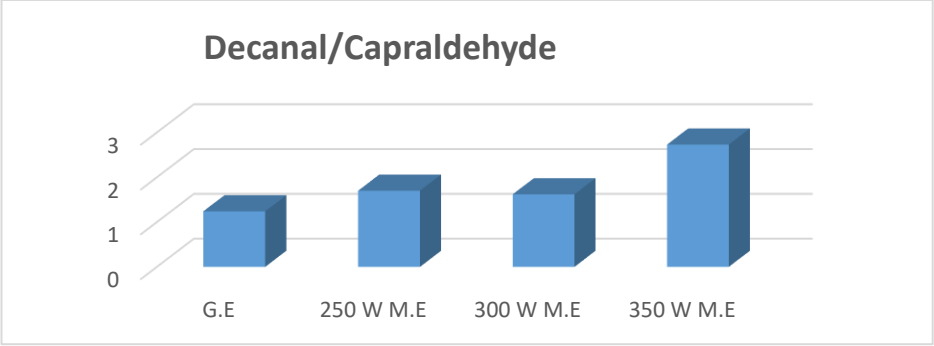


Şekil 4.20. Farklı uçucu yağ ekstraksiyon yöntemleriyle elde edilen α-Piren bolluğu

Şekil 4.10'dan gözlemleneceği üzere α-Piren maddesi için % 1.32 ile optimum uçucu yağ ekstraksiyon yöntemi geleneksel ekstraksiyon yöntemi olurken, % 1.02 ile en düşük α-Piren içeriğini veren ekstraksiyon yöntemi 250 Waat'ta yapılan mikrodalga ekstraksiyon yöntemi olmuştur.

Çizelge 4.13. Farklı uçucu yağ ekstraksiyon yöntemleriyle elde edilen uçucu yağ içinde Decanal bolluğu

Decanal (CAS)/Capraldehyde Ekstraksiyon Yöntemi	% Bolluk
Geleneksel ekstraksiyon	1,24
250 W Mikrodalga ekstraksiyonu	1,7
300 W Mikrodalga ekstraksiyonu	1,62
350 W Mikrodalga ekstraksiyonu	2,73

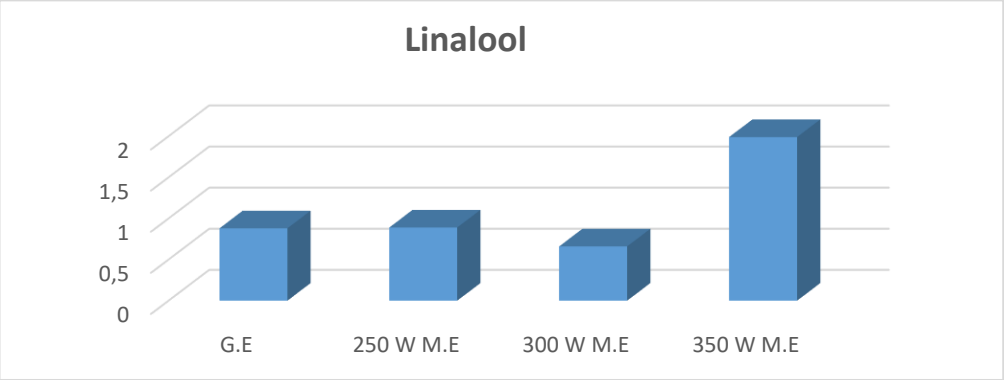


Şekil 4.21. Farklı uçucu yağ ekstraksiyon yöntemleriyle elde edilen Decanal bolluğu

Uçucu yağ içerisinde Decanal bileşiği için en düşük verim (% 1.24) ile geleneksel ekstraksiyon yöntemiyle elde edilmiştir. En yüksek verim (% 2,73) ise 350 Waat'ta yapılan mikrodalga ekstraksiyon yöntemiyle elde edilmiştir.

Çizelge 4.14. Farklı uçucu yağ ekstraksiyon yöntemleriyle elde edilen uçucu yağ içinde Linalol bolluğu

Linalool Ekstraksiyon Yöntemi	% Bolluk
Geleneksel ekstraksiyon	0,88
250 W Mikrodalga ekstraksiyonu	0,89
300 W Mikrodalga ekstraksiyonu	0,66
350 W Mikrodalga ekstraksiyonu	1,99

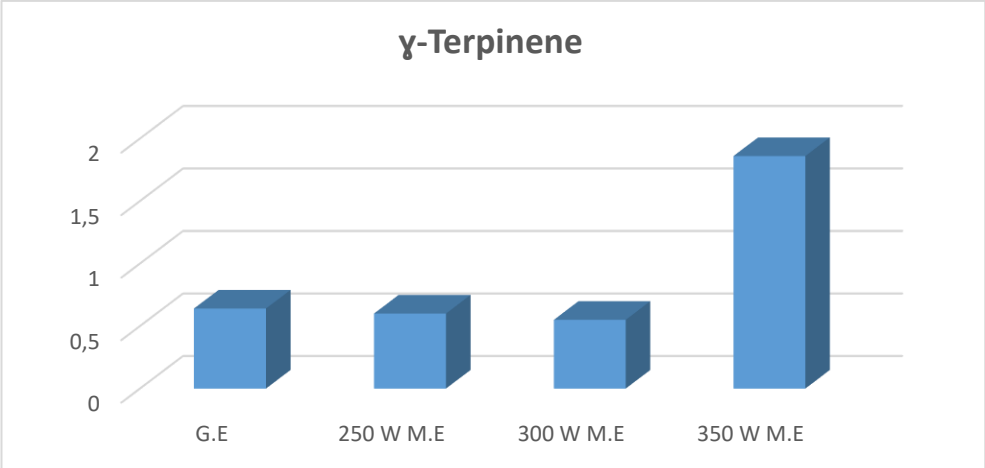


Şekil 4.22. Farklı uçucu yağ ekstraksiyon yöntemleriyle elde edilen Linalol bolluğu

Şekil 4.12'den gözlemleneceği üzere Linalol maddesi için % 1.99 ile optimum uçucu yağ ekstraksiyon yöntemi 350 Waat'ta yapılan mikrodalga ekstraksiyon yöntemi olurken, % 0.88 ile en düşük Linalol içeriğini veren ekstraksiyon yöntemi geleneksel ekstraksiyon yöntemi olmuştur.

Çizelge 4.15. Farklı uçucu yağ ekstraksiyon yöntemleriyle elde edilen uçucu yağ içinde ɤ-Terpinene bolluğu

ɤ-Terpinene Ekstraksiyon Yöntemi	% Bolluk
Geleneksel ekstraksiyon	0,64
250 W Mikrodalga ekstraksiyonu	0,6
300 W Mikrodalga ekstraksiyonu	0,55
350 W Mikrodalga ekstraksiyonu	1,86



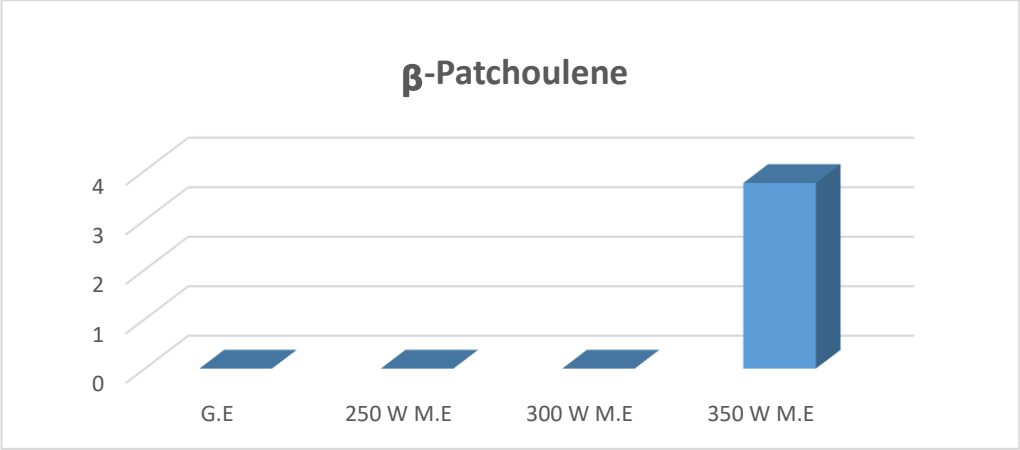
Şekil 4.23. Farklı uçucu yağ ekstraksiyon yöntemleriyle elde edilen ɤ-Terpinene bolluğu.

Uçucu yağ içerisinde ɤ-Terpinene bileşiği için en düşük verim (% 0.6) 250 Waat'ta yapılan mikrodalga ekstraksiyon yöntemiyle elde edilmiştir. En yüksek verim (% 1.86) ise 350 Waat'ta yapılan mikrodalga ekstraksiyon yöntemiyle elde edilmiştir.

Çizelge 4.16. Farklı uçucu yağ ekstraksiyon yöntemleriyle elde edilen uçucu yağ içinde β- Patchoulene bolluğu

β-Patchoulene Ekstraksiyon Yöntemi	% Bolluk
Geleneksel ekstraksiyon	T.E
250 W Mikrodalga ekstraksiyonu	T.E
300 W Mikrodalga ekstraksiyonu	T.E
350 W Mikrodalga ekstraksiyonu	3,75

T.E: Tain edilememiştir



Şekil 4.24. Farklı uçucu yağ ekstraksiyon yöntemleriyle elde edilen β- Patchoulene bolluğu

Farklı uçucu yağ ekstraksiyon yöntemleriyle elde edilen uçucu yağ eldelerinin CG/MS analizleri sonucunda β- Patchoulene uçucu yağ bileşenine sadece 350 Waat'ta yapılan mikrodalga ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen uçucu yağa içerisinde (% 3.74) rastlanmıştır.

4.5. Turunçgil Uçucu Yağlarının Fizikokimyasal Analizleri

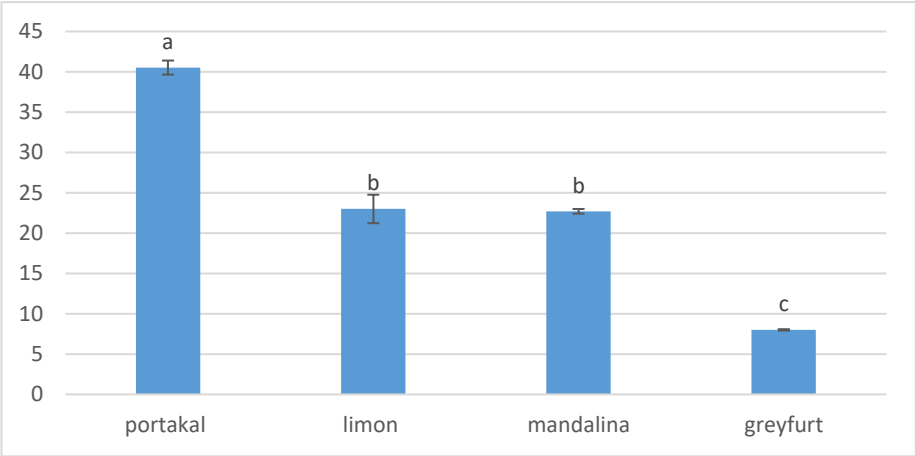
4.5.1. Farklı turunçgil kabuğu uçucu yağlarının DPPH ile % inhibisyon değerleri

Farklı turunçgil kabuklarından elde edilen uçucu yağlarının antioksidatif özelliği, DPPH serbest radikalini süpürme oranına göre incelenmiştir. Turunçgil kabuğu uçucu yağları uçucu yağlarının antioksidant madde miktarı literatürde bulunan DPPH metoduna uygun olarak bakılmıştır. Lineer artışın gözlendiği veriler ile doğrusal grafik oluşturulmuş ve R2 faktörü, oluşturulan doğrudaki denklem bilgileri verilmiştir. R2 faktörünün tüm örneklerde 1'e yakın olduğu belirlenmiştir. Çizelge 4.17.'te turunçgil kabuğu uçucu yağlarının 375, 250 ve 125 mg/100 ml konsantrasyonundaki DPPH % inhibisyonu, IC50 değeri ve trolox cinsinden değerleri verilmiştir. Dört turunçgil uçucu yağı da antioksidatif özellik göstermiştir. Yapılan çalışmalar incelendiğinde % süpürme cinsinden en yüksek antioksidant değeri 375 mg/100 ml konsantrasyonda 61,59 değer ilen portakal kabuğu uçucu yağında tespit edilmiştir. En düşük antioksidant değeri ise 375 mg/100 ml konsantrasyonda 11,97 greyfurt kabuğu uçucu yağında tespit edilmiştir. Trolok değeri , örneğin serbest radikalleri süpürme sonucu sonrası ortamda kalan DPPH miktarını göstermektedir. Bunun sonucunda Troloks eşdeğerleri incelendiğinde yüzde süpürme oranının konsantrasyon artışı ile ters orantılı olarak artttığı görülmüştür. Numunelerin antioksidatif değerleri arasında istatistiksel olarak farklılıklar bulunmuştur ($p<0.05$). Frassinetti ve ark., 2011 yılında yaptıkları çalışmada DPPH metodu ile farklı turunçgil uçucu yaplarının antioksidatif özelliklerine bakmışlardır. Yapılan araştırma turunçgil uçucu yağları % 39-90 arasında süpürme özelliği gösterilmiştir.

Çizelge 4.17. Farklı Turunçgil Kabuğu Uçucu Yağlarının DPPH (%) inhibisyon, trolox eş değeri ve IC50 değerleri analiz sonuçları

NUMUNE	EKSTRAKSİYON KONSANTRASY	ORTALAMA ANTİOKSİDAN	VARYASYoN	ORTALAMATROLOX	TROLOX VARYANS	DENKLEM	R^2	**IC50**
PORTAKAL	375	61,59±3,964[a]	6,437	236,021 ±24,742[c]	10,483	y = 0,1538x + 3,2886	0,9996	**303,72**
	250	40,52±0,874[aA]	2,157	367,537 ±5,45[cA]	1,484			
	125	23,13±2,126[a]	9,192	4766,038 ±13,27[c]	2,788			
LİMON	375	34,48±3,557[b]	10,136	405,198 ±22,20[b]	5,479	y =0,095x+ 1,0217	0,9997	**515,56**
	250	22,99±1,766[bA]	7,680	476,934 ±11,01[bA]	2,310			
	125	10,73±1,116[b]	10,403	553,453 ±6,96[b]	1,258			
MANDALİNA	375	31,94±0,544[b]	1,703	421,040 ±3,39[b]	3,395	y = 0,078x + 2,8736	0,9991	**604,18**
	250	22,70±0,287[bA]	1,266	478,728 ±1,79[bA]	1,793			
	125	12,45±0,709[b]	5,692	542,692 ±4,42[b]	4,443			
GREYFURT	375	11,97±0,544[c]	4,543	545,681 ±3,39[a]	3,395	y = 0,0326x – 0,2075	0,9998	**154,15**
	250	8,00±0,083[cA]	1,037	570,490	0,518			
	125	3,83±1,078[c]	28,146	596,494 ±6,73[a]	6,730			

Tukey testine göre aynı sütundaki farklı küçük harfler ilgili değerlerin antioksidant değerlerinin istatistiksel olarak farklı olduğunu göstermektedir ($p<0.05$)
a= en iyi değer
Pearcing kolerasyonuna göre büyük harfler ilgili değerlerin antioksidan değerlerinin istatiksel olarak benzer olduğunu göstermektedir($p<0,005$)



Şekil 4.25 Turunçgil uçucu yağlarının 250 mg/100 ml konsantrasyonundaki DPPH inhibisyon değerlerinin yüzde süpürme cinsinden değişim grafiği

4.5.2. Süperkritik çalışma parametrelerinde turunçgil kabuğu uçucu yağının DPPH % inhibisyon değeri

Belirlenen farklı süperkritik çalışma parametrelerinde turunçgil kabuğu uçucu yağları elde edilmiştir. Elde edilen uçucu yağlarının antioksidatif özelliği, DPPH serbest radikalini süpürme oranına göre incelenmiştir. Turunçgil kabuğu uçucu yağlarının antioksidant analizi literatürde bulunan DPPH metoduna uygun olarak yapılmıştır. Doğrusal artışın gözlendiği sonuçlar ile doğrusal grafik çizilmiş ve R2 faktörü, doğru üzerindeki denklem bilgileri verilmiştir. R^2 faktörünün tüm örneklerde 1'e yakın olduğu belirlenmiştir. 3 farklı konsantrasyonda yapılan çalışmanın sonucunda en yüksek antioksidatif değer 75 mg/100 ml konsantrasyonda 30 °C- 80 bar çalışma parametrelerinde % 40,57 süpürme ile elde edilmiştir. Rajput ve ark., 2022 yılında yaptıkları çalışmada turunçgil kabuklarında farklı süperkritik ekstraksiyon parametrelerini deneyerek optimum uçucu yağ verimini tespit etmişlerdir. Elde ettikleri bu uçucu yağların DPPH metodu ile antioksidan analizlerini yapmışlardır. Çıkan sonuçlarda uçucu yağlar minimum %25,87 süpürme gösterirken maksimum süpürme değeri ise %89,74 olmuştur.

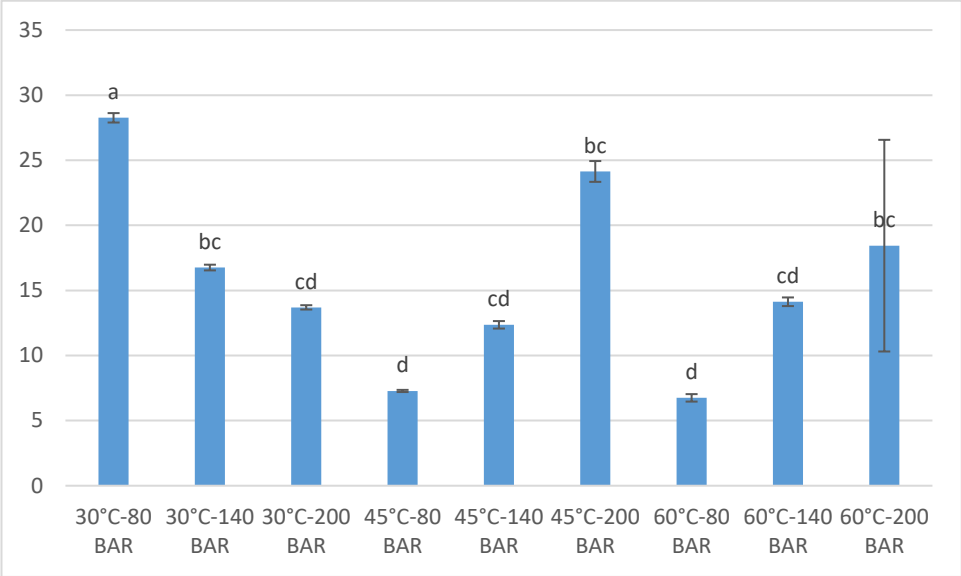
Çizelge 4.18. Farklı Süperkritik Çalışma Parametrelerinde DPPH % İnhibisyon, Trolox Eşdeğeri ve IC50 Değerleri Analiz Sonuçları

NUMUNE	EKSTRAKSİYON KONSANTRASYONU(mg/100ml)	ORTALAMA ANTİOKSİDAN SÜPÜRME (%)	VARYANS	ORTALAMA TROLOX	TROLOX VARYANS	DENKLEM	R2	IC50
30°C-80 BAR	75	40,57±0,709^{a}	1,747	282,051±4,423^{f}	1,568	y = 0,1011x + 2,7458	0,9998	467,40
	50	28,26±0,362^{aA}	1,280	358,869±2,257^{dA}	0,629			
	25	15,28±0,505^{a}	3,303	439,871±3,149^{d}	0,716			
30°C-140 BAR	75	23,04±0,979^{c}	2,947	391,449±4,238^{d}	1,083	y = 0,054x + 2,9374	0,9983	871,53
	50	16,76±0,219^{bcA}	1,309	430,605±1,370^{bcA}	0,318			
	25	9,53±1,009^{abcd}	10,589	475,739±6,298^{abcd}	1,324			
30°-200 BAR	75	20,55±0,249^{d}	1,211	406,992±1,553^{c}	0,382	y = 0,0331x + 7,2158	0,8755	1292,57
	50	13,70±0,166^{cdA}	1,211	449,734±1,035^{abB}	0,230			
	25	12,26±8,297^{abc}	67,668	458,701±51,^{bcd}	11,288			
45°-80 BAR	75	9,96±0,332^{f}	3,331	473,049±2,07^{a}	0,438	y = 0,023x + 1,4049	0,9985	2112,83
	50	7,28±0,083^{dA}	1,140	489,787±0,518^{aA}	0,106			
	25	4,21±0,791^{cd}	18,776	508,917±4,939^{a}	0,970			
45°C-140 BAR	75	17,34±0,219^{e}	1,266	427,018±1,370^{b}	0,321	y = 0,0425x + 1,5006	0,9987	1141,16
	50	12,36±0,287^{cdA}	2,326	458,104±1,^{793abA}	0,391			
	25	6,70±0,462^{bcd}	6,888	493,374±2,882^{abc}	0,584			
45°-200 BAR	75	33,14±0,935^{b}	2,821	328,381±5,834^{e}	1,777	y=0,0814x+3,0013	0,9956	577,38
	50	24,14±0,800^{bcA}	3,314	384,574±4,993^{cdA}	1,298			
	25	12,79±0,380^{ab}	2,973	455,413±2,372^{cd}	0,521			

Tukey testine göre aynı sütundaki farklı küçük harfler ilgili değerlerin antioksidant değerlerinin istatistiksel olarak farklı olduğunu göstermektedir ($p<0.05$)
a= en iyi değer
Pearcing kolerasyonuna göre büyük harfler ilgili değerlerin antioksidan değerlerinin istatiksel olarak benzer olduğunu göstermektedir($p<0,005$)

Çizelge 4.18. Farklı Süperkritik Çalışma Parametrelerinde DPPH % İnhibisyon, Trolox Eşdeğeri ve IC50 Değerleri Analiz Sonuçları **(devam)**

NUMUNE	EKSTRAKSİYON KONSANTRASYONU(mg/ml)	ORTALAMA ANTİOKSİDAN SÜPÜRME (%)	VARYANS	ORTALAMA TROLOX	TROLOX VARYANS	DENKLEM	R2	IC50
60°C-80 BAR	75	9,58±0,544^{f}	5,679	475,440±3,39^{a}	0,714	y = 0,0243x + 0,5268	0,9983	2035,93
	50	6,75±0,287^{fA}	4,255	493,075±1,79^{aA}	0,364			
	25	3,50±0,544^{d}	15,559	513,400±3,39^{a}	0,661			
60°C-140 BAR	75	20,35±0,219^{d}	1,078	408,187±1,37^{c}	0,336	y = 0,0506x + 1,4208	0,9999	960,06
	50	14,13±0,332^{cdA}	2,349	447,044±2,07^{abA}	0,463			
	25	7,71±0,723^{abcd}	9,379	487,0,97±4,51^{abcd}	0,927			
60°C-200 BAR	75	34,87±1,222^{b}	3,505	317,621±7,62^{e}	2,401	y = 0,095x - 2,2829	0,9534	502,29
	50	18,44±8,129^{bcA}	44,089	420,143±50,76^{bcA}	12,076			
	25	11,11±0,679^{abcd}	6,111	465,875±4,23^{absc}	0,910			



Şekil 4.26. Farklı Süperkritik Çalışma Parametrelerinde Elde Edilen Turunçgil Kabuğu Uçucu Yağlarının 50 mg/100 ml konsantrasyondaki DPPH İnhibisyon Değerlerinin % Süpürme Cinsinden Değişim Grafiği

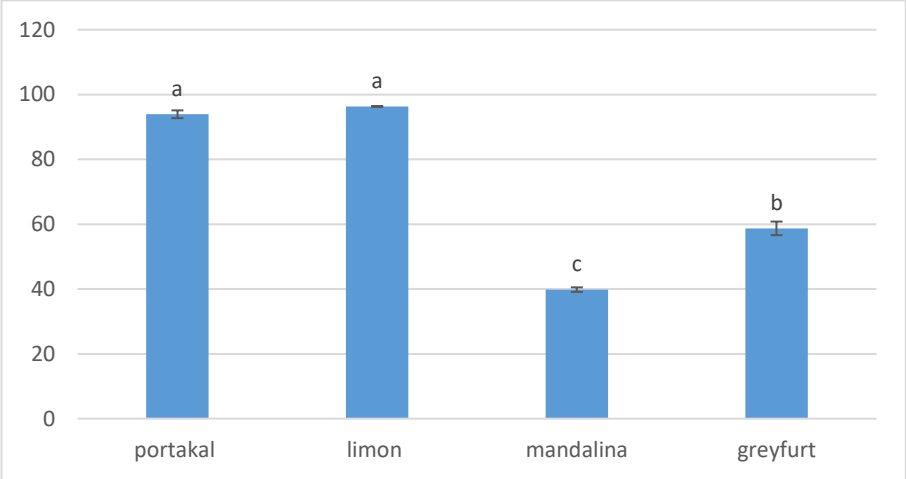
4.5.3. Farklı turunçgil kabuğu uçucu yağlarının ABTS ile % inhibisyon değeri

Turunçgil kabuğu uçucu yağlarının ABTS serbest radikal süpürme aktivitesi analizi ile antioksidant aktivite analizleri yapılmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.19.'da verilmiştir. ABTS analizinde litaratürde bulunan metotta belirtilen miktarlarda hacim kullanılmıştır. Analizler 3 ayrı konsantrasyonda 3 tekerürlü olacak şekilde yapılmıştır. Doğrusal artışın gözlendiği sonuçlar ile grafik çizilmiş ve R2 faktörü, doğru üzerindeki denklem bilgileri verilmiştir. Ayrıca denklem yardımıyla yarı inhibisyon aktivitesi olan IC50 değeri de hesaplanmıştır. Hesaplamalarda R^2 faktörlerin genel olarak 1'e yakın olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca sonuçların Trolox eşdeğeri de hesaplanmış ve çizelgede belirtilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde en yüksek süpürme aktivitesini 375 mg/ 100 ml konsantrasyonda %98 süpürme ile portakal kabuğu uçucu yağında tespit edilmiştir. En düşük süpürme aktivitesi 750 mg/100 ml konsantrasyonda % 56 süpürme oranıyla mandalina kabuğu uçucu yağında elde etiik.

Çizelge 4.19. Farklı Turunçgil Kabuğu Uçucu Yağlarının ABTS % İnhibisyon, Trolox, Eşdeğeri ve IC50 Değerleri Analiz Sonuçları

NUMUNE	EKSTRAKSİYON KONSANTRASYON (mg/100Ml)	ORTALAMA ANTİOKSİDAN SÜPÜRME (%)	VARYASYON	ORTALAMA TROLOX	TROLOX VARYANS	DENKLEM	R^2	**IC50**
PORTAKAL	375	98,300±0^{a}	0	27,728±0,67^{c}	2,424	y = 0,0915x + 66,33	0,8877	**82,86**
	250	93,909±1,202^{aA}	1,279	46,744±4,21^{cA}	9,009			
	125	75,425±0,100^{a}	0,132	119,318±3,54^{d}	2,968			
LİMON	375	97,450±0^{a}	0	31,027±0,33^{c}	1,083	y = 0,0977x + 64,62	0,7834	**86,68**
	250	96,317±0^{aA}	0	35,549±3,36^{cA}	10,018			
	125	72,096±1,202^{b}	1,667	137,558±5,59^{c}	4,066			
MANDALİNA	750	56,20±1,102^{c}	1,196	202,564±4,07^{a}	2,012	y = 0,1457x + 3,8881	0,9929	**658,56**
	500	39,873±0,701^{cA}	1,758	267,569±2,04^{aA}	0,764			
	250	18,201±0,300^{d}	1,650	354,308±3,96^{a}	1,118			
GREYFURT	375	73,229±2,203c	3,008	134,842±10,03^{b}	7,444	y = 0,1291x + 26,535	0,9941	**196,08**
	250	58,711±2,103^{bA}	3,582	194,802±10,25^{bA}	5,264			
	125	39,731±0,100^{c}	0,252	268,928±1,54^{b}	0,573			

Tukey testine göre aynı sütundaki farklı küçük harfler ilgili değerlerin antioksidant değerlerinin istatistiksel olarak farklı olduğunu göstermektedir ($p<0.05$) Pearcing kolerasyonuna göre büyük harfler ilgili değerlerin antioksidan değerlerinin istatiksel olarak benzer olduğunu göstermektedir($p<0.005$)



Şekil 4.27. Turunçgil Kabuğu Uçucu Yağlarının 250 mg/100 mL konsantrasyonunndaki ABTS İnhibisyon Değerinin % Süpürme Cinsinden Değişim Grafiği

4.5.4. Farklı süperkritik çalışma parametrelerinde turunçgil kabuğu uçucu yağının ABTS % inhibisyon değeri

Belirlenen farklı süperkritik çalışma parametrelerinde turunçgil kabuğu uçucu yağları elde edilmiştir. Elde edilen uçucu yağlarının antioksidatif özelliği, ABTS serbest radikalini süpürme oranına göre incelenmiştir. Turunçgil kabuğu uçucu yağlarının antioksidant analizi literatürde bulunan ABTS metoduna uygun olarak yapılmıştır. Doğrusal artışın gözlendiği sonuçlar ile doğrusal grafik çizilmiş ve R^2 faktörü, doğrunun oluşturduğu denklem Çizelge 4.20.'de bilgileri verilmiştir. R^2 faktörünün tüm örneklerde 1'e yakın olduğu belirlenmiştir. 3 farklı konsantrasyonda yapılan çalışmanın sonucunda en yüksek antioksidatif değer 75 mg/100 ml konsantrasyonda 60 °C- 200 bar çalışma parametrelerinde % 70 süpürme ile elde edilmiştir. IC50 değeri verilerine bakıldığında en düşük IC50 değeri yine 60°C- 200 bar çalışma parametrelerinde belirlenmiştir. 75 mg/100 ml konsantrasyonda en düşük süpürme aktivitesi % 20 süpürme ile 30°C-80 bar çalışma parametlerinde tepit edilmiştir.

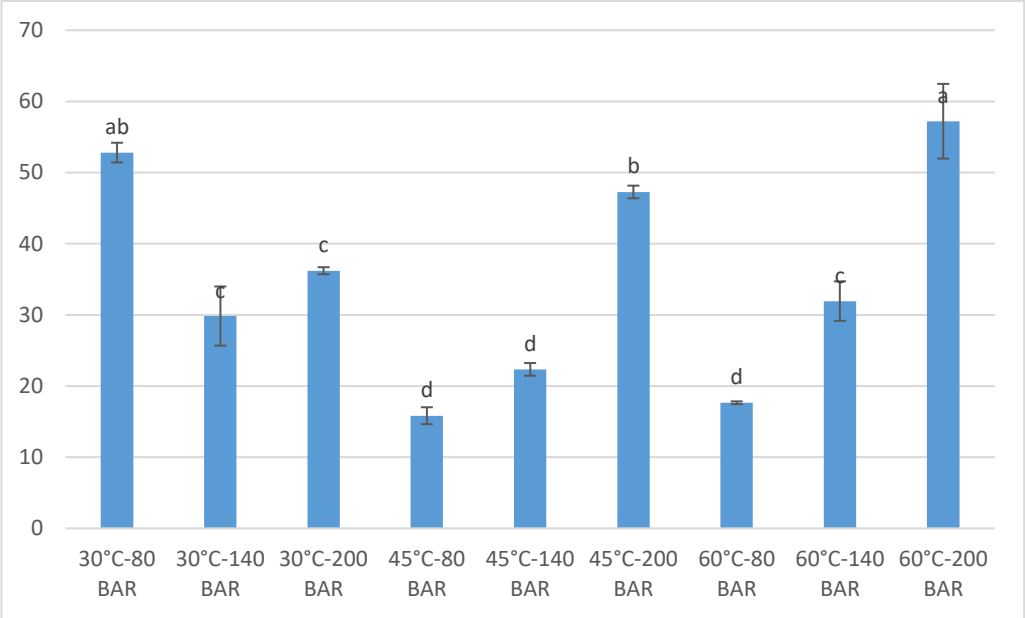
Çizelge 4.20. Farklı Süperkritik Çalışma Parametrelerinde ABTS % İnhibisyon, Trolox Eş Değeri ve IC50 Değerleri Analiz Sonuçları

NUMUNE	EKSTRAKSİYON KONSANTRASYONU(mg/ml)	ORTALAMA ANTİOKSİDAN SÜPÜRME (%)	VARYANS	ORTALAMA TROLOX	TROLOX VARYANS	DENKLEM	R2	IC50
30°C-80 BAR	75	69,048±1,188^{b}	1,721	150,171±4,03^{ef}	2,686	y = 0,1495x + 14,734	0,9922	48,91
	50	52,801±1,386^{cdA}	2,625	219,834±7,01^{cdA}	3,192			
	25	30,672±0^{cde}	0	307,737±1,34^{e}	0,437			
30°C-140 BAR	75	47,339±1,783^{a}	3,765	243,896±9,61^{d}	3,944	y = 0,1102x + 6,2756	0,9815	81,69
	50	29,832±4,159^{bA}	13,94	305,991±16,03^{bA}	5,249			
	25	19,048±0,792^{b}	4,159	355,667±3,08^{b}	0,866			
30°-200 BAR	75	49,300±0,792^{a}	4,159	227,790±6,17^{d}	2,709	y = 0,1026x + 12,165	1	76,29
	50	36,204±0,495^{aA}	1,367	285,616±1,46^{bA}	0,513			
	25	22,969±1,386^{a}	6,036	341,695±4,54^{c}	1,331			
45°-80 BAR	75	21,429±2,377^{d}	11,091	349,457±8,24^{a}	2,358	y = 0,0445x + 6,8213	0,9999	199,99
	50	15,826±1,88^{fA}	7,509	370,608±3,57^{aA}	0,960			
	25	10,014±1,089^{f}	10,878	395,834±4,07^{a}	1,029			
45°C-140 BAR	75	32,353±0,594^{b}	1,836	302,110±2,01^{b}	0,668	y = 0,0816x + 3,6608	0,9994	116,77
	50	22,339±0,891^{cA}	3,989	343,830±2,87^{aA}	0,835			
	25	11,415±0,297^{bcd}	2,602	387,684±1,74^{a}	0,450			
45°-200 BAR	75	64,216±1,684^{b}	2,621	166,471±6,71^{e}	4,033	y = 0,146x + 10,982	0,997	55,23
	50	47,269±0,891^{cA}	1,885	241,567±4,39^{cA}	1,819			
	25	26,751±0,792^{bcd}	2,961	326,172±3,31^{d}	1,015			

Tukey testine göre aynı sütundaki farklı küçük harfler ilgili değerlerin antioksidant değerlerinin istatistiksel olarak farklı olduğunu göstermektedir ($p<0.05$)
a= en iyi değer
Pearcing kolerasyonuna göre büyük harfler ilgili değerlerin antioksidan değerlerinin istatiksel olarak benzer olduğunu göstermektedir($p<0,005$)

Çizelge 4.20. Farklı Süperkritik Çalışma Parametrelerinde ABTS %İnhibisyon, Trolox eşdeğeri (**devam**)

NUMUNE	EKSTRAKSİYON KONSANTRASYONU(mg/ml)	ORTALAMA ANTİOKSİDAN SÜPÜRME (%)	VARYANS	ORTALAMA TROLOX	TROLOX VARYANS	DENKLEM	R2	IC50
60°C-80 BAR	75	20,728±0c^{d}	0	349,845±0^{a}	0	y = 0,0352x + 10,05	0,9674	234,33
	50	17,647±0,198^{fA}	1,122	363,429±1,465^{aA}	0,403			
	25	11,695±0,891^{ef}	7,621	386,908±2,751^{a}	0,711			
60°C-140 BAR	75	40,406±1,089^{c}	2,696	267,958±3,206^{c}	1,197	y = 0,0857x + 10,641	0,9828	94,90
	50	31,933±2,773^{dA}	2,773	306,961±10,354^{bA}	3,373			
	25	18,417±0,297^{de}	1,613	356,249±5,614^{b}	1,576			
60°C-200 BAR	75	70,448±2,377^{b}	3,373	140,469±8,423^{f}	5,996	y = 0,1539x + 15,621	0,965	46,37
	50	57,213±5,249^{cdA}	9,174	204,504±18,902^{dA}	9,243			
	25	30,952±0,792^{bc}	2,559	310,454±5,860^{f}	1,888			



Şekil 4.28. Farklı Süperkritik Çalışma Parametrelerinde Elde Edilen Turunçgil Kabuğu Uçucu Yağlarının 50 mg/100 ml Konsantrasyondaki ABTS İnhibisyon Değerinin % Süpürme Cinsinden Değişim Grafiği

4.5.5.Farklı turunçgil uçucu yağlarının CUPRAC metodu ile antioksidant tayini

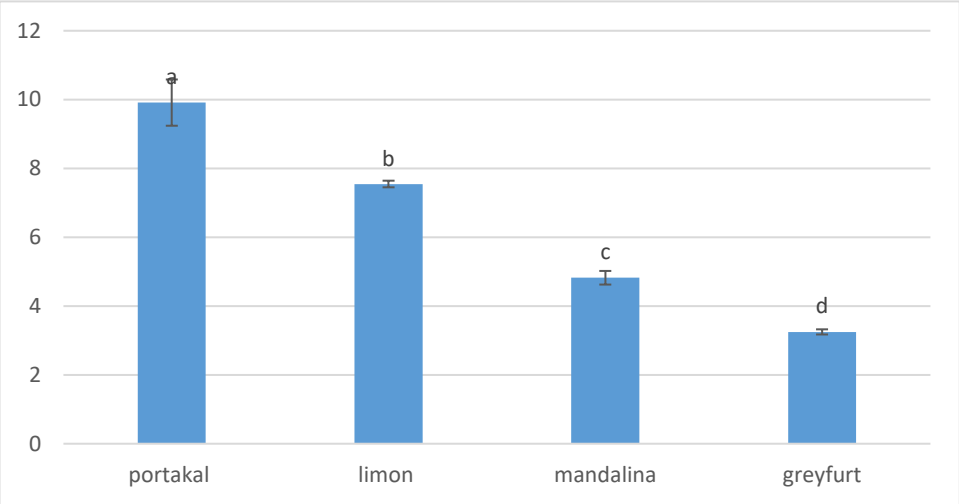
Çizelge 4.21.Farklı Turunçgil Kabuğu Uçucu Yağlarının CUPRAC Metodu ile Antioksidant Analiz Sonuçları

NUMUNE	EKSTRE KONSANTRASYONU (mg/100 ML)	ORTALAMA TROLOX	TROLOX VARYANS
PORTAKAL	750	11,625±0,23^{a}	1,999
	500	9,912±0,67^{aA}	6,779
	250	6,416±1,14^{a}	22,507
LİMON	750	12,283±0,39^{a}	3,233
	500	7,547±0,09^{bA*}	1,273
	250	3,508±0,01^{b}	0,492
MANDALİNA	750	11,351±0,03^{a}	0,274
	500	4,823±0,19^{cA*}	4,114
	250	2,422±1,16^{bc}	6,595
GREYFURT	750	3,662±0,22^{b}	6,124
	500	3,249±0,07^{dA}	2,299
	250	0,973±0,03^{c}	3,545

Tukey testine göre aynı sütundaki farklı küçük harfler ilgili değerlerin antioksidant değerinin istatiksel olarak farklı olduğunu göstermektedir ($p<005$) a: en büyük değer

Pearcing kolerasyonune göre aynı sütundaki büyük harfler ilgili değerlerin antioksidant değerinin istatiksel olarak aynı olduğunu göstermektedir($p<0,005$) A*$p<0,05$

Farklı turunçgil kabuğu uçucu yağlarının antioksidatif özelliği CUPRAC metodu bakır(II) indirgeme aktivitelerine göre belirlenmiştir. Çizelge 4.21'de turunçgil uçucu yağlarının artan konsantrasyonda antioksidant aktivite oranları ve bunların trolox karşılığı verilmiştir. Uçucu yağların konsantrasyonlarının artmasıyla ortalama trolox değerleri de artış göstermektedir.



Şekil 4.29. Farklı Turunçgil Kabuğu Uçucu Yağlarının 500 mg/ 100 mlTrolox Eşdeğeri Cinsinden Değişim Grafiği

4.5.6. Süperkritik çalışma paremetrelerinde turunçgil uçucu yağının CUPRAC metodu ile antioksidant tayini

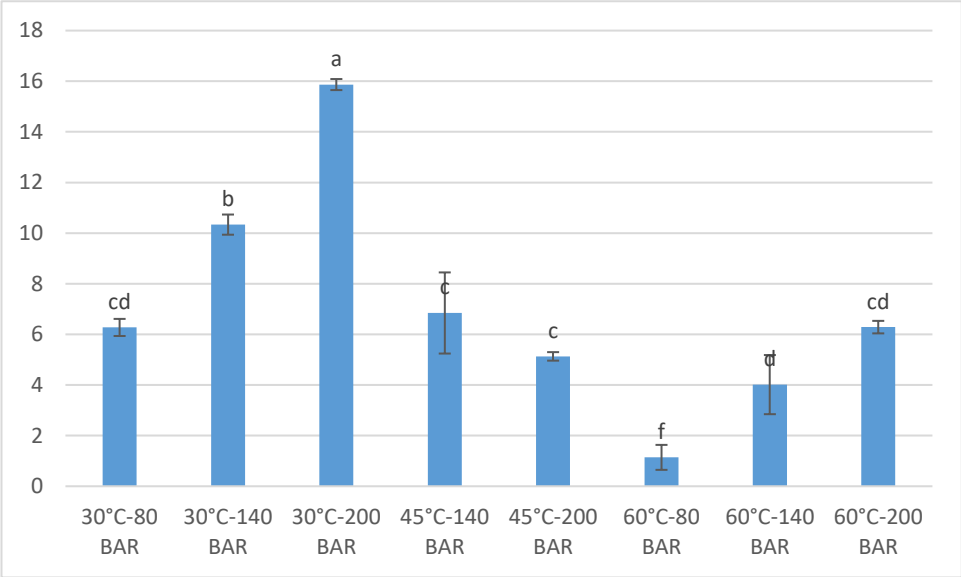
Farklı süperkritik parametrelerinde elde edilen uçucu yağların antioksidatif değerleri CUPRAC metodu bakır(II) indirgeme aktivitelerine göre incelenmiştir. Çizelge 4.22'de uçucu yağların artan konsantrasyonda antioksidant aktivite oranları ve bunların trolox cinsinden değerleri verilmiştir. Uçucu yağların konsantrasyonlarının artmasıyla ortalama trolox değerleri de artış göstermektedir. En yüksek antioksidatif değer 30°C-200 bar parametlerinde elde edilmiş turunçgil kabuğu uçucu yağında elde edilmiştir.

Çizelge 4.22. Farklı Süperkritik Çalışma Parametrelerinde Elde Edilen Uçucu Yağların CUPRAC Metodu ile Antioksidant Tayini

NUMUNE	EKSTRE KONSANTRASYONU (mg/100 ML)	ORTALAMA TROLOX	TROLOX VARYANS
30°C-80 BAR	75	10,181±0,418^{b}	4,109
	50	6,287±0,338^{cdA}	5,368
	25	1,675±0,067^{cde}	4,021
30°C-140 BAR	75	16,416±0,576^{a}	3,509
	50	10,336±0,398^{bA}	3,853
	25	4,006±0,060^{b}	1,507
30°C-200 BAR	75	20,206±4,004^{a}	19,816
	50	15,868±0,218^{aA}	1,372
	25	7,178±0,166^{a}	2,318
45°C-80 BAR	75	0,465±0,046^{d}	9,811
	50	-0,227±0,099^{fA}	-43,818
	25	-0,665±0,078^{f}	-11,669
45°C-140 BAR	75	12,258±0,535^{b}	4,362
	50	6,845±1,602^{cA}	23,408
	25	2,731±0,186^{bcd}	6,796
45°C-200 BAR	75	8,737±0,862^{b}	9,871
	50	5,131±0,168^{cA}	3,281
	25	1,964±0,015^{bcd}	0,761
60°C-80 BAR	75	2,208±0,099^{cd}	4,505
	50	1,142±0,493^{fA*}	43,153
	25	0,635±0,974^{ef}	153,479
60°C-140 BAR	75	5,146±0,149^{c}	2,903
	50	4,016±1,168^{dA}	29,075
	25	1,147±0,048^{de}	4,185
60°C-200 BAR	75	10,141±0,881^{b}	8,683
	50	6,287±0,247^{cdA}	3,922
	25	2,826±1,341^{bc}	47,459

Tukey testine göre aynı sütundaki farklı küçük harfler ilgili değerlerin antioksidant değerinin istatiksel olarak farklı olduğunu göstermektedir ($p<0,05$) a: en büyük değer

Pearcing kolerasyonune göre aynı sütundaki büyük harfler ilgili değerlerin antioksidant değerinin istatiksel olarak aynı olduğunu göstermektedir($p<0,005$) A*$p<0,05$



Şekil 4.30. Farklı Süperkritik Çalışma Parametrelerinde Elde Edilen Uçucu Yağların 50 mg/100 ml Trolox Eşdeğeri Cinsinden Değişim Grafiği

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada geleneksel ekstraksiyon, mikrodalga destekli ekstraksiyon ve Süperkritik CO_2 ekstraksiyon yöntemleri gibi farklı ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak her bir uçucu yağ bileşeni için optimum ekstraksiyon yöntemi belirlenmesi amaçlanmıştır.

Turunçgil kabuğu uçucu yağ verimi açısısından bakıldığından en yüksek yağ verimi % 3.6 ile 300 Waat değerinde çalıştığımız mikrodalga yöntemi ile elde ettik. En düşük yağ verimi %0.76 ile 30 ^{0}C- 80 bar süperkritik ekstraksiyon yöntemiyle elde edilmiştir.

Geleneksel ekstraksiyon ve mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak uçucu yağ bileşenlerinin izolasyonunda optimum ekstraksiyon yönteminin belirlenmesi doğrultusunda yapılan çalışmalar neticesinde D-limonen (% 81.85) ve β-Mirisen (%4.53) için optimum ekstraksiyon yöntemin 300 wat'ta yapılan mikrodalga ekstraksiyon yöntemi olduğu belirlenmiştir. İdeal ekstraksiyon süresi 2 saat olarak belirlenmiştir. Valence için optimum ekstraksiyon yöntemi % 3.19 ile 250 wat mikrodalga (3 saat) ekstraksiyon yöntemi belirlenirken, Decanal (% 2.73), Linalol (%1.99), ɤ-Terpinine (1.86) ve β- Patchoulene (3.55) için optimum yöntem 350 wat'ta (1.5-2 saat) yapılan mikrodalga ekstraksiyon yöntemi olduğu belirlenmiştir. α-Piren (%1.32) uçucu yağ bileşeni için ise optimum ekstraksiyon yöntemi geleneksel ekstraksiyon yöntemi olarak belirlenmiştir.

DPPH, ABTS radikalleri ve CUPRAC bakır iyonu indirgeme metodu ile yapılan antioksidan aktivite analizleri sonucunda uçucu yağların minimum antioksidant inhibisyon aktivite değerleri belirlenmiştir. Bu sonuçlar doğrusal olarak konsnatrasyon ile doğru orantılı artış göstermiş ve doğru denklemi elde edilmiştir. Doğruluk oranının 1 e yakın olduğu sonuçların yarı inhibisyon değerini temsil eden IC50 değerleri hesaplanabilmiştir. Trolox sonuçlarının DPPH ve ABTS metotlarında ters orantılı olarak artması gerekmektedir. Trolox miktarının antioksidantların inhibe ettiği

miktarlardan sonra ortamda kalan ABTS ve DPPH miktarını temsil ettiği bilinmektedir.

Fiziksel zenginleştirme tekniği olarak kullanılması planlanan kolon dizayn sisteminde, zenginleştirme işleminde sırasında kolon çıkışında yağ damlacıklarının gelmeye başladığı gözlemlenmiştir. Fakat bu miktar yeterli seviyede olmadığı için karakterizasyon ve verim analizleri yapılamamıştır. Kolon dizaynında yağ çıkışının istenen düzeyde olmamasının sebebi; uçucucu yağı ısıtmak için kullanılan silikon yağının belirli sıcaklık değerinde sabit tutulamaması ve istenenden daha yüksek sıcaklıklara çıkmasıyla birlikte turunçgil uçucu yağının içerisinde bulunan santrifüj tüpüne zarar vermesidir. Aynı zamanda turunçgil uçucu yağının bulunduğu santrifüj tüpünün kolon sisteminin giriş kısmıyla tam bağlantı kurulamaması sebebiyle uçucu yağların sağlıklı bir şekilde kolona taşınamamıştır ve zenginleştirme işlemini olumsuz şekilde etkilemiştir.

KAYNAKLAR

ATILGAN, B. 2018. Kızıçam (Pinus brutia) kabuk taneni eldesinde ekstraksiyon yöntemlerinin verim ve kimyasal bileşim üzerine etkisi (Master's thesis, Bursa Teknik Üniversitesi).

AYDIN, A., ve ALÇİÇEK, A. 2018. Effects of the supplementation of essential oil isolated from orange peel (Citrus sinensis L.) to broiler diets on the performance. Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi, 5(2), 127-135.

BURCU, E. S. E. R., ve DINÇEL, A. S. 2018. Kromatografiye giriş, yüksek performanslı sıvı kromatografi kullanımında basit ipuçları. Sağlık Hizmetleri ve Eğitimi Dergisi, 2(2), 51-57.

CAMPOLO, O., CHERİF, A., RİCUPERO, M., SİSCARO, G., GRİSSA-LEBDİ, K., RUSSO, A., ... and PALMERİ, V. 2017. Citrus peel essential oil nanoformulations to control the tomato borer, Tuta absoluta: chemical properties and biological activity. Scientific reports, 7(1), 1-10.

CHOİ, H. S. 2006. Lipolytic effects of citrus peel oils and their components. Journal of agricultural and food chemistry, 54(9), 3254-3258.

COSTA, R., D'ACAMPORA ZELLNER, B., CRUPİ, M. L., FİNA, M. R. D., VALENTİNO, M. R., DUGO, P., and MONDELLO, L. 2008. GC–MS, GC–O and enantio–GC investigation of the essential oil of Tarchonanthus camphoratus L. Flavour and Fragrance Journal, 23(1), 40-48.

DALİMUNTHE, N. A., ALFİAN, Z., and WİRJOSENTONO, B. 2022. Detection of Methamphetamine using Nanobentonite as a Novel Solid Phase Extraction Column Matrix Assisted with Gas Chromatography-Mass Spectroscopy. Baghdad Science Journal, 0816-0816.

FRASSİNETTİ, S., CALTAVUTURO, L., CİNİ, M., DELLA CROCE, C. M., and MASERTİ, B. E. 2011. Antibacterial and antioxidant activity of essential oils from Citrus spp. *Journal of Essential Oil Research*, *23*(1), 27-31.

GÖK, A., İŞLEMLER, T., ve KIRBAŞLAR, Ş. İ. 2012. Turunçgillerden farklı yöntemlerle uçucu yağ elde edilmesi ve kimyasal bileşiminin incelenmesi. İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

GÖKTAŞ, Ö., ve GIDIK, B. 2019. Tıbbi ve aromatik bitkilerin kullanım alanları. Bayburt Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, 2(1), 145-151.

GÖNÜLŞEN, İ., SARİİŞİK, M., ERKAN, G., ve SALİH, O. K. U. R. 2016. Portakal yağı içeren mikro ve moleküler kapsül aktarılmış kumaşlardan salım davranışlarının incelenmesi. Tekstil ve Mühendis, 23(101), 21-33.

GÜNEŞER, O., ve YÜCEER, Y. K. 2010. Gıdalarda aroma maddelerinin belirlenmesinde gaz kromatografisi-olfaktometri (GCO) tekniklerinin kullanılması. Gıda, 35(5), 371-378.

KAYA, D., ve ERGÖNÜL, P. G. 2015. UÇUCU YAĞLARI ELDE ETME YÖNTEMLERİ. GIDA/The Journal of FOOD, 40(5).

KHAN, M. M., IQBAL, M., HANİF, M. A., MAHMOOD, M. S., NAQVİ, S. A., SHAHİD, M., and JASKANİ, M. J. 2012. Antioxidant and antipathogenic activities of citrus peel oils. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 15(6), 972-979.

KILIÇ, A. 2008. Uçucu yağ elde etme yöntemleri. Bartın Orman Fakültesi Dergisi, 10(13), 37-45.
KILIÇ, A. 2008. Uçucu yağ elde etme yöntemleri. Bartın Orman Fakültesi Dergisi, 10(13), 37-45.
MAHDAVİ, S. A., SADEGHİ, R., FARİDİ, A., HEDAYATİ, S., SHADDEL, R., DİMA, C., and JAFARİ, S. M. 2022. Nanodelivery systems for d-limonene; techniques and applications. Food Chemistry, 132479.
MURALİ, R., KARTHİKEYAN, A., and SARAVANAN, R. 2013. Protective effects of D-limonene on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats. Basic & clinical pharmacology & toxicology, 112(3), 175-181.
NAİR, A., KURUP SR, R., NAİR, A. S., and BABY, S. 2018. Citrus peels prevent cancer. Phytomedicine, 50, 231-237.
ÖZTEKİN, S., ve SOYSAL, Y. 1998. Tıbbi ve Aromatik Bitkilerde Ekstraksiyon Yöntemleri.
RAJPUT, S., KAUR, S., PANESAR, P. S., and THAKUR, A. 2022. Supercritical fluid extraction of essential oils from Citrus reticulata peels: Optimization and characterization studies. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-10.
RAVENTÓS, M., DUARTE, S., and ALARCÓN, R. 2002. Application and possibilities of supercritical CO2 extraction in food processing industry: an overview. Food Science and Technology International, 8(5), 269-284.
SEVEN, Ü. 2006. Gıda örneklerinde aromatik aminlerin gaz kromatografisi kütle spektrometresi (GC-MS) ile tayinlerinde katı faz ekstraksiyonu uygulamaları (Master's thesis, Uludağ Üniversitesi).
SİDDİQUİ, S. A., PAHMEYER, M. J., ASSADPOUR, E., and JAFARİ, S. M. 2022. Extraction and purification of d-limonene from orange peel wastes: Recent advances. Industrial Crops and Products, 177, 114484.
SUN, J. 2007. D-Limonene: safety and clinical applications. Alternative medicine review, 12(3).
SUNAR, İ., KOPAN, M., and AKGÜN, S. 2020. Gaz kromatografi-kütle spektrometresi ile gazdan arındırma ve tutma yöntemiyle Kocaeli bölgesi içme sularında trihalometan analizi. Journal of Health Sciences and Medicine, 3(3), 269-277.
TEMEL, M., TINMAZ A, B., ÖZTÜRK, M., ve GÜNDÜZ, O. 2018. Dünyada ve Türkiye'de tıbbi-aromatik bitkilerin üretimi ve ticareti.
TURNER, D., and CONSULTING, A. 2020. Gas chromatography–how a gas chromatography machine works, how to read a chromatograph and GCxGC. Analysis & Separations from Technology Neworks.
UÇAR, Y. 2020. Narenciye Kabuğu Esansiyel Yağları Kullanılarak Hazırlanan Mikroenkapsüle Balık Yağı Tozlarında Depolama Süresince Meydana Gelen Duyusal ve Renk Değişimleri. KSÜ Tarım ve Doğa Dergisi, 23(2), 515-526.
WADA, L., and OU, B. 2002. Antioxidant activity and phenolic content of Oregon caneberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(12), 3495-350
WADA, L., and OU, B. 2002. Antioxidant activity and phenolic content of Oregon caneberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(12), 3495-3500.

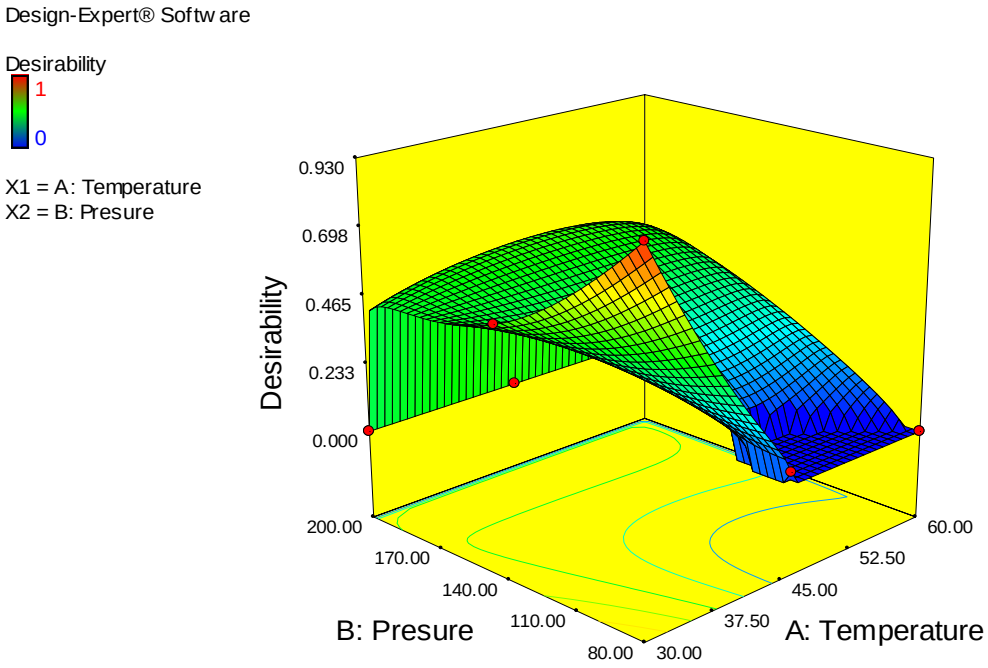
YAMAN, T., ve KULEAŞAN, Ş. 2016. Uçucu yağ elde etmede gelişmiş ekstraksiyon yöntemleri. Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 7(Özel (Special) 1), 78-83.

YILDIZ, P. O. 2019. Turunçgil kabuk yağlarının gökkuşağı alabalığı (Oncorhynchus mykiss) filetolarının raf ömrü üzerine etkileri. Journal of Limnology and Freshwater Fisheries Research, 5(1), 17-26.

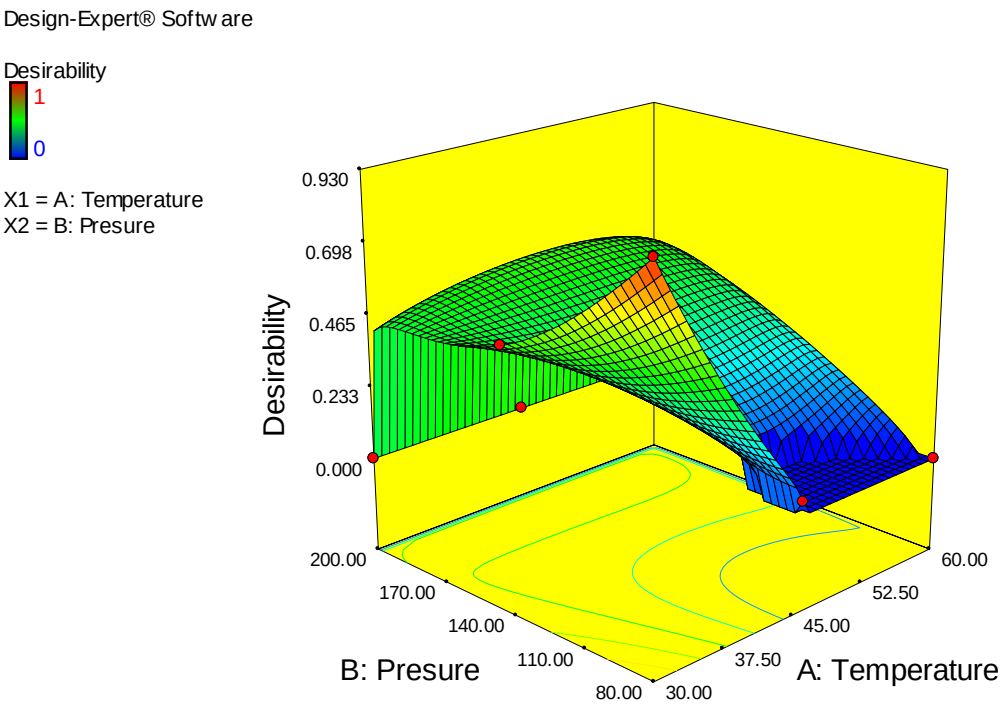
YUN, J. 2014. Limonene inhibits methamphetamine-induced locomotor activity via regulation of 5-HT neuronal function and dopamine release. Phytomedicine, 21(6), 883-887.

EKLER

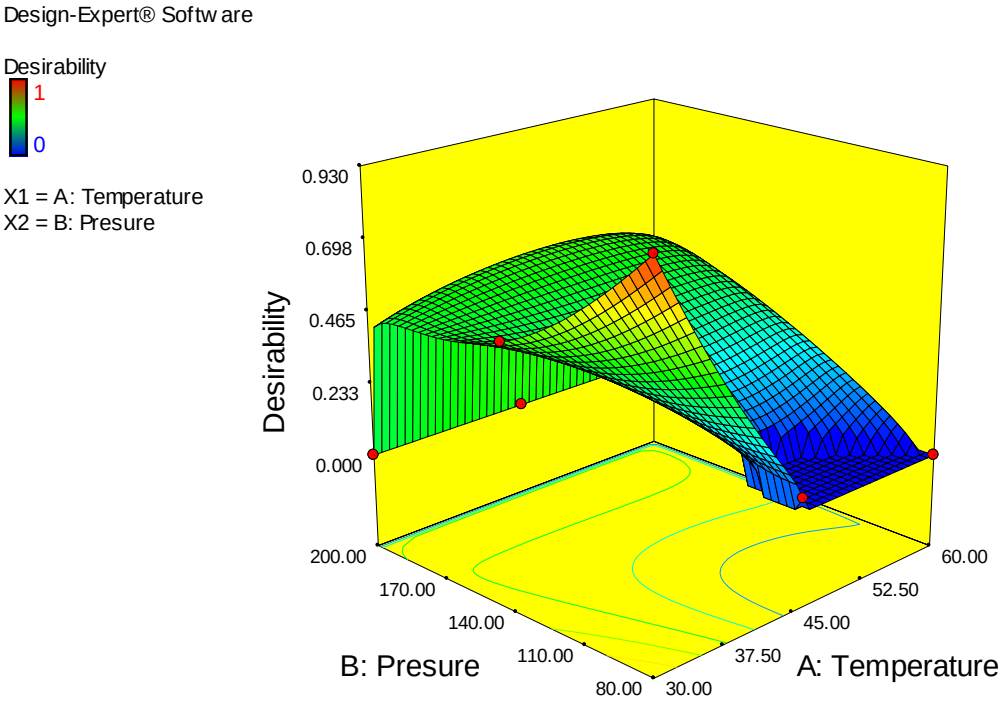
EK-1. Deney dizaynına göre turunçgil uçucu yağ veriminin basınç-sıcaklığa bağlı değişim haritası



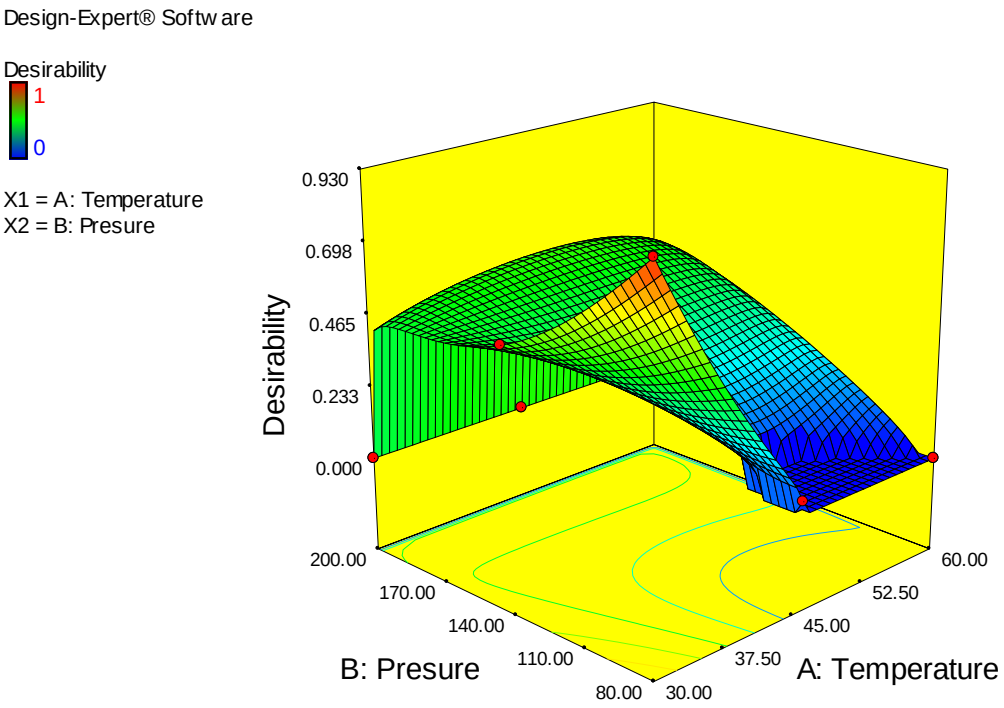
EK-2. Deney Dizaynına göre 50mg/100 ml'de DPPH Yüzde Süpürme Miktarının Basınç-sıcaklığa bağlı değişim haritası



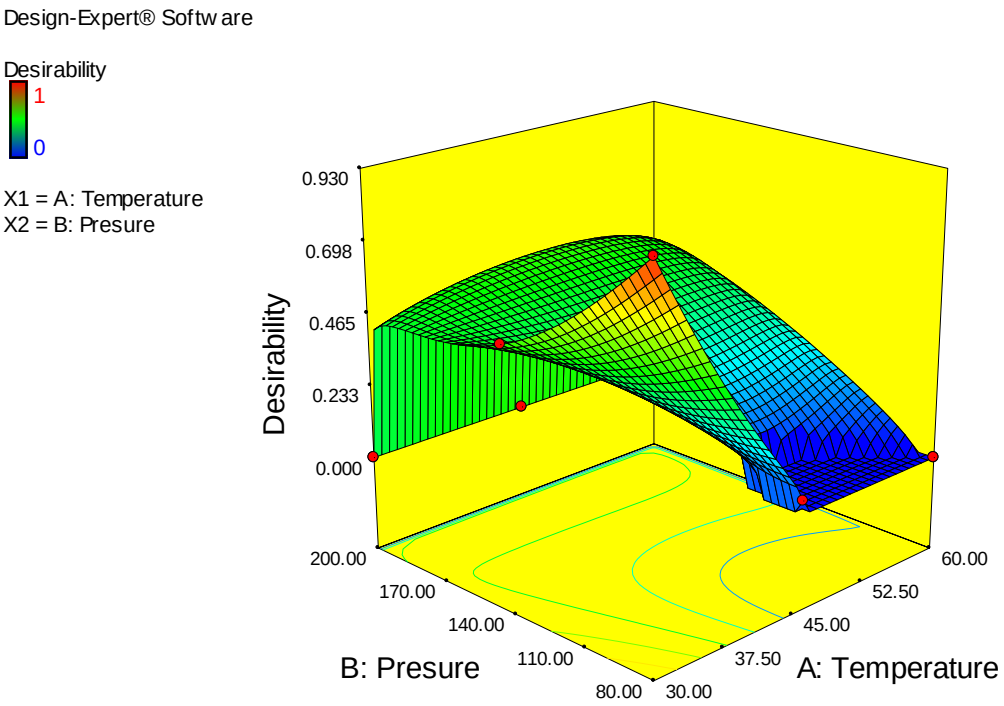
EK-3. Deney Dizaynına göre 50mg/100 ml'de DPPH Trolox Miktarının Basınç-sıcaklığa bağlı değişim haritası



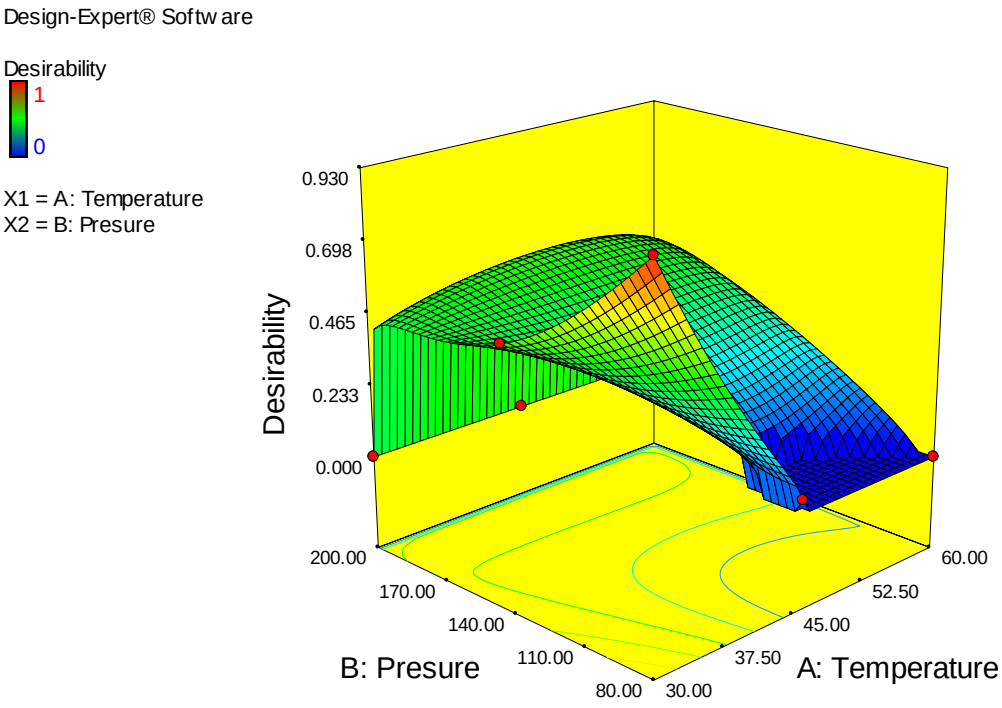
EK-4. Deney Dizaynına göre 25 mg/100 ml'de ABTS Yüzde Süpürme Miktarının Basınç-sıcaklığa bağlı değişim haritası



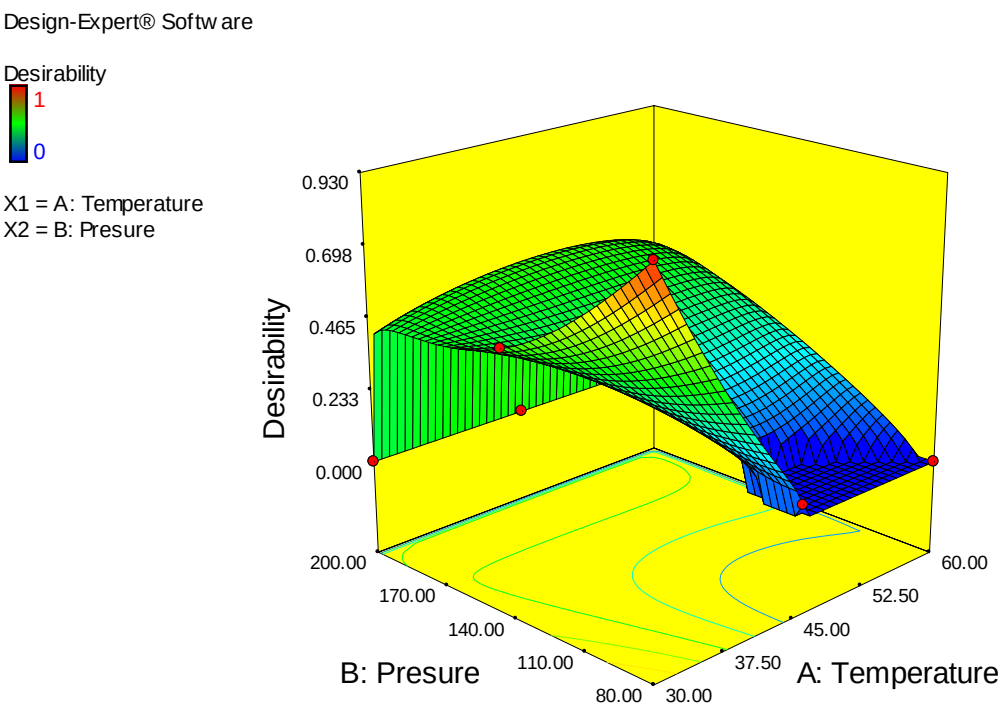
EK-5. Deney Dizaynına göre 75 mg/100 ml'de ABTS Trolox Miktarının Basınç-sıcaklığa bağlı değişim haritası



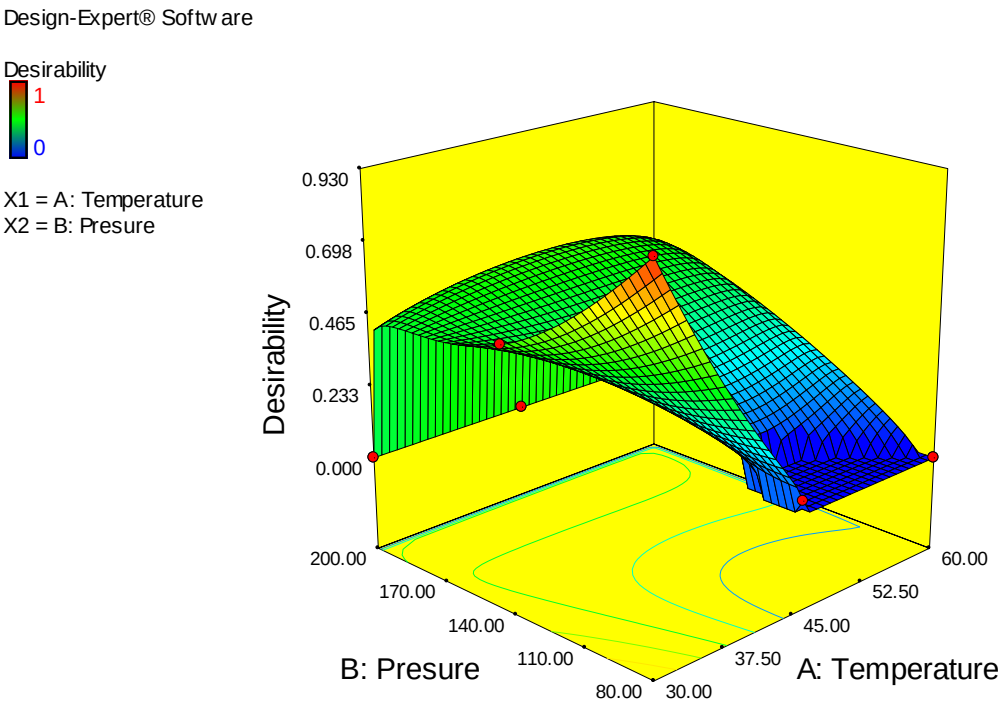
EK-6. Deney Dizaynına göre 50 mg/100 ml'de ABTS Trolox Miktarının Basınç-sıcaklığa bağlı değişim haritası



EK-7. Deney Dizaynına göre 25 mg/100 ml'de ABTS Trolox Miktarının Basınç-sıcaklığa bağlı değişim haritası



EK-8. Deney Dizaynına göre 75 mg/100 ml'de CUPRAC Trolox miktarının basınç- sıcaklığa göre değişim haritası



EK-9. Deney Dizaynına göre DPPH IC50 değerinin basınç-sıcaklığa göre Değişim Haritası

