T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Zerdeçaldan Antioksidanların Doğal Derin Ötektik Çözücüler Kullanılarak Mikrodalga Destekli Ekstraksiyonunun Optimizasyonu ve Modellenmesi

Khadija Doldolova

DANIŞMAN
Doç. Dr. Mustafa Bener

Kimya Anabilim Dalı

Analitik Kimya Programı

İSTANBUL-2020

Bu çalışma, 15.12.2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı, Kimya Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Doç. Dr. Mustafa BENERİ(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Sema DEMİRCİ ÇEKİÇ
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Mühendislik Fakültesi

Prof. Dr. Aslı BAYSAL
İstanbul Aydın Üniversitesi
Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete'de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa'nın abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Lisansüstü Eğitim Enstitüsü'nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitim süresi boyunca, bana doğru bilimsel yaklaşımları araştırıp öğrenmem için yol gösteren, tezimin oluşmasında maddi ve manevi desteğini, sabrını, samimiyetini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili danışman hocam Doç.Dr. Mustafa BENER'e,

Tez çalışmamada kullandığım çözücülerin temini ve karakterizasyonu aşamalarında yardımcı olan Arş.Gör.Dr. Melisa LALİKOĞLU ve Doç.Dr. Yavuz Selim AŞÇI'ya,

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana destek olann, engin bilimsel tecrübelerini benimle paylaşan değerli hocalarım Prof. Dr. Reşat APAK, Doç.Dr. Burcu BEKDEŞER, Doç.Dr. Saliha Esin ÇELİK ve Analitik Kimya Anabilim Dalındaki bütün hocalarıma,

Hayatımın her aşamasında yanımda olan, beni maddi ve manevi destekleyen ve bir an bile desteğini esirgemeyen aileme, beni yalnız bırakmayan arkadaşlarıma ve tüm sevdiklerime, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Aralık 2020 Khadija Doldolova

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ ..... **iv**
İÇİNDEKİLER ..... **v**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **vii**
TABLO LİSTESİ ..... **ix**
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ ..... **xi**
ÖZET ..... **xiii**
SUMMARY ..... **xv**
1. GİRİŞ **1**
2. GENEL KISIMLAR **3**
2.1. ANTİOKSİDANLAR VE SERBEST RADİKALLER 3
2.2. KURKUMİN VE KURKUMİNOİDLER 8
2.3. DOĞAL DERİN ÖTEKTİK ÇÖZÜCÜ (NADES) 10
2.3.1. Doğal Derin Ötektik Çözücülerin Hazırlanmasında Kullanılan Bazı Kimyasallar 12
2.3.1.1. Kolin Klorür ($C_5H_{14}ClNO$) *12*
2.3.1.2. Laktik asit ($C_3H_6O_3$) *13*
2.3.1.3. Sakaroz ($C_{12}H_{22}O_{11}$) *13*
2.3.1.4. Fruktoz ($C_6H_{12}O_6$) *14*
2.4. TOPLAM ANTİOKSİDAN KAPASİTE TAYİN YÖNTEMİ 15
2.5. YANIT YÜZEY YÖNTEMİ 16
2.6. ZERDEÇALDAN KURKUMİNİN EKSTRAKSİYONUNDA MDE VE DİĞER EKSTRAKSİYON YÖNTEMLERİ İLE İLGİLİ YAPILAN ÇALIŞMALAR 19
MALZEME VE YÖNTEM **23**
3.1. KULLANILAN CİHAZLAR 23
3.2. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER 23
3.3. KULLANILAN Çözeltilerin hazırlanması **24**
3.3.1.NADES'lerin hazırlanması ve karakterizasyonu 24
3.4. Örneklerin hazırlanması **25**
3.4.1. NADES'lerin hazırlanması: 25
3.5. UYGULANAN YÖNTEMLER 26

3.5.1. CUPRAC Yöntemi 26
3.5.2. Kurkuminin HPLC Analizi ile Belirlenmesi 26
3.5.3. Mikrodalga destekli Ekstraksiyon Yöntemi 26
4.BULGULAR 29
4.1. NADES'LERİN KARAKTERİZASYONU 29
4.2. NADES'LER KULLANILARK TROLOKS İÇİN CUPRAC YÖNTEMİ İLE ELDE EDİLEN KALİBRASYON EĞRİLERİ 30
4.3. KURKUMİNİN FARKLI NADES ORTAMLARINDA HPLC İLE ELDE EDİLEN KALİBRASYONLARI VE ZERDEÇAL EKSTRAKTLARIININ HPLC ANALİZİ 31
4.4 İSTATİSTİKSEL ANALİZLER 32
4.4.1. MDE'nin optimizasyonu ve modellenmesi 32
4.5. EKSTRAKSİYON KOŞULLARININ MDE ÜZERİNDEKİ ETKİSİ 44
4.6. NADES'LER İLE MDE İŞEMİNDE ANTİOKSİDAN VE KURKUMİNİN EKSTRAKSİYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ 49
TARTIŞMA VE SONUÇ 50
KAYNAKLAR 57
EKLER 63
ÖZGEÇMİŞ 64

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1. Serbest radikallerin oluşmasını sağlayan iç ve dış kaynaklar.. 3

Şekil 2. Antioksidan ve serbest radikal arasındaki mekanizma 4

Şekil 3. α-tokoferol'ün kimyasal yapısı.....6

Şekil 4. Vitamin-C kimyasal yapısı.....6

Şekil 5. β-karotenin kimyasal yapısı. 8

Şekil 6. Likopenin kimyasal yapısı.....8

Şekil 7. Kurkuminin Keto ve Enol formları. 9

Şekil 8. Kurkuminoidlerin kimyasal formülleri (kurkumin, demetoksikurkumin ve bimetoksikurkumin). 9

Şekil 9. Kurkuminin farmakolojik özellikleri.....10

Şekil 10. Kolin Klörürün kimyasal yapısı 12

Şekil 11. Laktik asitin kimyasal yapısı.....13

Şekil 12. Laktik asitin izomerleri. 13

Şekil 13. Sükrozun kimyasal yapısı.....14

Şekil 14. Fruktozun izomerleri. 14

Şekil 15. CUPRAC reaksiyonu. 15

Şekil 16. Box-Behnken tasarımının kübik şekli. 17

Şekil 17. Merkezi kompozit tasarım modeli.....18

Şekil 18. MDE sisteminin şematik görünümü (a) Kapalı tip mikrodalga sistemi ve b) Açık tip mikrodalga sistemi) (Chan, C-H., ve diğ., 2011). 27

Şekil 19. NADES'in ve bileşenlerinin FTIR spektrumları; a) NADES-1, b)NADES-2, c)NADES-3, d)NADES-4 ve e) NADES-5.....29

Şekil 20. Sıcaklığın (a) ve kayma hızının (b) pn deneysel dinamik viskoziteye etkisi. 30

Şekil 21. 425 nm'de NADES'ler (a-NADES-1; b-NADES-2; c-NADES-3; d-NADES-4; e-NADES-5) ile zerdeçal ekstraktlarının HPLC kromatogramları: (1) bis-demetoksikurkumin (BDCC), demetoksikurkumin ve (3) kurkumin.....32

Şekil 22. NADES-1 ile zerdeçaldan antioksidanların ve kurkuminin ekstraksiyonuna ekstraksiyon sıcaklığı ve süresinin etkilerini gösteren 3D grafik.....44

Şekil 23. NADES-2 ile zerdeçaldan antioksidanların ve kurkuminin ekstraksiyonuna ekstraksiyon sıcaklığı ve süresinin etkilerini gösteren 3D grafik.....45

Şekil 24. NADES-3 ile zerdeçaldan antioksidanların ve kurkuminin ekstraksiyonuna ekstraksiyon sıcaklığı ve süresinin etkilerini gösteren 3D grafik.....45

Şekil 25. NADES-4 ile zerdeçaldan antioksidanların ve kurkuminin ekstraksiyonuna ekstraksiyon sıcaklığı ve süresinin etkilerini gösteren 3D grafik.....46

Şekil 26. NADES-5 ile zerdeçaldan antioksidanların ve kurkuminin ekstraksiyonuna ekstraksiyon sıcaklığı ve süresinin etkilerini gösteren 3D grafik.....46

Şekil 27. NADES-1 ile zerdeçaldan antioksidanların ve kurkuminin ekstraksiyonuna ekstraksiyon sıcaklığı ve çözücü-katı oranının etkilerini gösteren 3D grafik. 47

Şekil 28. NADES-2 ile zerdeçaldan antioksidanların ve kurkuminin ekstraksiyonuna ekstraksiyon sıcaklığı ve çözücü-katı oranının etkilerini gösteren 3D grafik. 47

Şekil 29. NADES-3 ile zerdeçaldan antioksidanların ve kurkuminin ekstraksiyonuna ekstraksiyon sıcaklığı ve çözücü-katı oranının etkilerini gösteren 3D grafik. 48

Şekil 30. NADES-4 ile zerdeçaldan antioksidanların ve kurkuminin ekstraksiyonuna ekstraksiyon sıcaklığı ve çözücü-katı oranının etkilerini gösteren 3D grafik. 48

Şekil 31. NADES-5 ile zerdeçaldan antioksidanların ve kurkuminin ekstraksiyonuna ekstraksiyon sıcaklığı ve çözücü-katı oranının etkilerini gösteren 3D grafik. 49

Şekil 32. Çözücü tipinin (a) CC ve (b) TAC üzerindeki etkisi.....49

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 1. Antioksidanların sınıflandırılması. 5

Tablo 2. DES oluşumunda hidrojen bağı alan ve veren bazı maddeler. 11

Tablo 3. DES oluşum tipleri. 11

Tablo 4. NADES bileşenleri ve molar oranları. 24

Tablo 5. Zerdeçala uygulanan MDE yönteminin deney planı. 28

Tablo 6. 25 ^{o}C'de NADES'lerin yoğunlukları. 30

Tablo 7. Troloks'un farklı NADES ortamlarında CUPRAC yöntemi ile elde edilen doğru denklemleri, korelasyon katsayıları ve lineer çalışma aralıkları. 31

Tablo 8. Kurkumin'in farklı NADES ortamlarında HPLC yöntemi ile elde edilen doğru denklemleri ve korelasyon katsayıları. 31

Tablo 9. RSM optimizasyonunda kullanılan bağımsız değişkenler ve onların değerleri. 33

Tablo 10. NADES-1 için MDE işleminde FCCD bağımsız faktörleri (X_1, X_2 ve X_3), TAC (mmol TR/g-DS) ve CC (mg/g-DS) için deneysel sonuçlar gösterilmiştir. 34

Tablo 11. NADES-2 için MDE işleminde FCCD bağımsız faktörleri (X_1, X_2 ve X_3), TAC (mmol TR/g-DS) ve CC (mg/g-DS) için deneysel sonuçlar gösterilmiştir. 35

Tablo 12. NADES-3 için MDE işleminde FCCD bağımsız faktörleri (X_1, X_2 ve X_3), TAC (mmol TR/g-DS) ve CC (mg/g-DS) için deneysel sonuçlar gösterilmiştir. 36

Tablo 13. NADES-4 için MDE işleminde FCCD bağımsız faktörleri (X_1, X_2 ve X_3), TAC (mmol TR/g-DS) ve CC (mg/g-DS) için deneysel sonuçlar gösterilmiştir. 37

Tablo 14. NADES-5 için MDE işleminde FCCD bağımsız faktörleri (X_1, X_2 ve X_3), TAC (mmol TR/g-DS) ve CC (mg/g-DS) için deneysel sonuçlar gösterilmiştir. 38

Tablo 15. NADES-1 için yapılan varyans analizi (ANOVA). 39

Tablo 16. NADES-2 için yapılan varyans analizi (ANOVA). 40

Tablo 17. NADES-3 için yapılan varyans analizi (ANOVA). 41

Tablo 18. NADES-4 için yapılan varyans analizi (ANOVA). 42

Tablo 19. NADES-5 için yapılan varyans analizi (ANOVA). 43

Tablo 20. Önerilen modeller için her yanıtın tahmini R^2, düzeltilmiş R^2 ve yeterli hassasiyet değerleri.....44

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
R^2	: Korelasyon katsayısı
R^2_a	: Ayarlanmış korelasyon katsayısı
W	: Güç
Y	: Yanıt
g	: Gram
mL	: Mililitre
µL	: Mikrolitre
mmol	: Milimol
Ɛ	: Deneysel Hata
β_0	: Model Kesişme Katsayısı
β_i. β_{ii}. β_{ij}	: Etkileşim Katsayıları

Kısaltmalar	Açıklama
MDE	: Mikrodalga destekli ekstraksiyon
UAE	: Ultrason destekli ekstraksiyon
EtOH	: Etanol
MeOH	: Metanol
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
TAC	: Toplam Antioksidan Kapasitesi
CC	: Kurkumin içeriği
Uv-Vis	: Ultraviole-görünür
NADES	: Doğal Derin Ötektik Çözücü
RSM	: Yanıt Yüzey Yöntemi
TR	: Troloks (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit)
TPP	: Üç Fazlı Bölümleme Yöntemi
DES	: Derin Ötektik Çözücü
DNA	: Deoksiribonükleik asid
ROS	: Reaktif oksijen türleri

RNS : Reaktif azot türleri

CUPRAC : Bakır (II)iyonu indirgeme andioksidan kapasitesi

Nc : Neokuproin

MKT : Merkezi Kompozit Tasarımı

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Zerdeçaldan Antioksidanların Doğal Derin Ötektik Çözücüler Kullanılarak Mikrodalga Destekli Ekstraksiyonunun Optimizasyonu ve Modellenmesi

Khadıja Doldolova

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Mustafa Bener

Serbest radikaller ve antioksidanlarla ilgili, son yıllarda yapılan çalışmaların önemi daha da artmaktadır. İnsan vücudunda gelişen çok sayıda biyolojik reaksiyonlar sonucu serbest radikaller devamlı olarak üretilmektedir. Serbest radikallerin vücutta meydana getirdiği hasara karşı savunma yapabilmek için organizma antioksidanlara ihtiyaç duyar. Antioksidanlar radikal oluşumunu engelleyerek radikalik reaksiyonları etkisiz hale getirirler.

Fenolik bileşiklerin antioksidan özellik gösterdiği bilinmektedir. Zerdeçalın ana bileşeni olan kurkumin antioksidan, antibakteriyel ve iltihap önleyici özellikleri olan doğal fenolik bir bileşiktir. Zerdeçal ayrıca kurkuminoidlerden demetoksikurkumin ve bisdemetoksikurkumin içermektedir. Kurkumin vücutta mutasyona uğramış kanser hücrelerini yok ederek, vücuda yayılmasını ve daha fazla zarar vermesini de engellemektedir. Antioksidan aktivitesi temel olarak fenolik OH grubuna bağlıdır. Önemli antioksidan aktivitesi nedeniyle bu tez çalışmasında doğal antioksidan kaynağı olarak zerdeçal seçilmiştir.

Bu çalışmada, beş farklı NADES kullanılarak zerdeçaldan kurkumin ve antioksidanların mikrodalga destekli ekstraksiyonu, yüz merkezli kompozit tasarım ile modellenmiş ve optimize edilmiştir.

NADES'ler, NADES bileşenleri olan kolin klorür, laktik asit, fruktoz ve sükrozun ikili kombinasyonları ile hazırlandı ve hazırlanan NADES'ler FTIR analizi, yoğunluk ve viskozite değerleri ile karakterize edildi. MDE yönteminde, bazı parametrelerin, kurkumin ve

antioksidanların ekstraksiyonu üzerindeki etkileri incelenmiş ve parametreler her NADES için optimize edilmiştir. Ekstraksiyon sıcaklığının, tüm NADES'ler için ekstraksiyon işleminde en önemli operasyonel faktör olduğu bulunmuştur.

NADES türüne göre ekstraksiyon sıcaklığı, ekstraksiyon süresi ve çözücü-katı oranı sırasıyla 64.7-71.8 ℃, 15.4-21.6 dakika ve 14.5-16.5 mL/0.2 g aralıklarında olduğunda en yüksek kurkumin içerik (CC) ve toplam antioksidan kapasite (TAC) verimi elde edilmiştir. NADES-1 hariç tüm NADES çözücüleri ile elde edilen ekstraktlar literatürde turmerik için en uygun çözücü olarak seçilen %80 metanol:su karışımından daha yüksek antioksidan kapasite ve kurkumin içeriği sergilemiştir.

Ek olarak, MDE yöntemi diğer ekstraksiyon tekniklerine kıyasla daha kısa ekstraksiyon süresi, otomasyon kolaylığı, çoklu numune işleme ve düşük çözücü gereksinimi gibi avantajlar sağlar. Önerilen çözücüler ve optimize edilen MDE yöntemi, zerdeçaldan antioksidanlar ve kurkumin ekstraksiyonu için ilaç, doğal boya ve gıda endüstrilerinde etkili ve sürdürülebilir bir prosedür olma potansiyeline sahiptir.

Haziran 2020, 80 sayfa.

Anahtar kelimeler: Mikrodalga destekli ekstreksiyon, NADES, Zerdeçal, Kurkumin, Antioksidan

SUMMARY

M.Sc. THESIS

Optimization and Modeling of Microwave Assisted Extraction of Antioxidants from Turmeric Using Natural Deep Eutectic Solvents

Khadıja Doldolova

Istanbul University-Cerrahpasa

Institute of Graduate Studies

Department of Chemistry

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Mustafa Bener

The importance of studies on free radicals and antioxidants in recent years is increasing. Free radicals are continuously produced as a result of many biological reactions that develop in the human body. In order to be able to defend against the damage caused by free radicals in the body, the organism needs antioxidants. Antioxidants neutralize radical reactions by preventing the formation of radicals.

It is known that phenolic compounds show antioxidant properties. Curcumin, the main component of turmeric, is a natural phenolic compound with antioxidant, antibacterial and anti-inflammatory properties. Turmeric also contains demetoxycurcumin and bisdemetoxycurcumin from curcuminoids. Curcumin also prevents the mutated cancer cells from spreading to the body and causing further damage. Its antioxidant activity is mainly due to the phenolic OH group. Due to its significant antioxidant activity, turmeric was chosen as a natural antioxidant source in this thesis study.

In this study, microwave-assisted extraction of curcumin and antioxidants from turmeric using five different NADES was modeled and optimized with a face-centered composite design.

NADES were prepared with binary combinations of NADES components choline chloride, lactic acid, fructose and sucrose, and the prepared NADES were characterized by FTIR analysis, density and viscosity values. In the MDE method, the effects of some parameters on the extraction of curcumin and antioxidants were investigated and the parameters were

optimized for each NADES. It has been found that the extraction temperature is the most important operational factor in the extraction process for all NADES.

The highest curcumin content (CC) and total antioxidant capacity (TAC) yield were obtained when extraction temperature, extraction time and solvent-solid ratio according to the NADES type were in the range of 64.7-71.8 ℃, 15.4-21.6 min and 14.5-16.5 mL/0.2 g, respectively. Extracts obtained with all NADES solvents except NADES-1 exhibited higher antioxidant capacity and curcumin content than the 80% methanol:water mixture selected as the most suitable solvent for turmeric in the literature.

In addition, the MAE method provides advantages such as shorter extraction time, ease of automation, multiple sample handling and low solvent requirement compared to other extraction techniques. The proposed solvents and optimized MAE method have the potential to be an effective and sustainable procedure in the pharmaceutical, natural dye and food industries for extracting antioxidants and curcumin from turmeric.

December 2020, 80 pages.

Keywords: Microwave assisted extraction, NADES, Turmeric, Curcumin, Antioxidant

1. GİRİŞ

Hücre metabolizması ve diğer birçok biyokimyasal reaksiyonlar sonucu oluşan serbest radikaller, aerobik hücrelerde protein denatürasyonuna, lipid peroksidasyonuna ve oksidatif hasarın oluşumuna yol açmaktadır.

İkincil metabolitler grubundan olan ve her yerde bulunan fenolik bileşikler, birçok hastalığın tedavisinde kullanılarak iyi sonuçlar alınmıştır. Bunlar, antioksidan ve çeşitli enzimlerin aktivitesini modüle etme özellikleri sayesinde, insan sağlığını korumak için sinerjik rol oynamaktadırlar. Vücutta antioksidanların ana özelliği, nükleik asitleri, proteinleri, lipitleri ve DNA'yı oksitleyebilen serbest radikalleri etkisiz hale getirmektir. Meyve ve sebzelerde bulunan besleyici olmayan biyoaktif bileşiklerin sağlığı koruma özelliklerinin dikkate alınması, doğal kökenli antioksidanların araştırılmasına büyük katkı sağlamıştır (Dubey ve diğ., 2020).

Zerdeçalın asli bileşeni olan kurkumin antioksidan, antibakteriyel ve iltihap önleyici özellikleri olan doğal fenolik bir bileşiktir. Zerdeçal ayrıca kurkumin türevleri demetoksikurkumin ve bisdemetoksikurkumin içermektedir. Önemli antioksidan aktivitesi nedeniyle tez çalışmasında doğal antioksidan kaynağı olarak zerdeçal seçilmiştir.

Endüstride ve laboratuvarlarda zararlı kimyasal çözücülerin kullanımı, sağlık ve çevre açısından tehlikelidir. Bu nedenle "Yeşil Kimya" görüşü ortaya çıkmıştır ve bu durum doğal çözücülere olan ilgiyi arttırmıştır. Son yıllarda büyük ilgi gören yeşil çözücüler ise iyonik sıvılar, süperkritik akışkanlar ve derin ötektik çözücülerdir. İyonik sıvıların kullanımı avantajlara sahip olduğu kadar dezavantajlara da sahiptir. Örneğin: uçucu maddelerin ayrılmasında kullanılsalar da, katı veya düşük uçuculuktaki maddelerin ayrılması sorun teşkil etmektedir. Ayrıca bir diğer dezavantajı ise kullanılmış iyonik sıvının geri kazanımıdır. Bu geri kazanımın nasıl yapılabileceği ile ilgili araştırmaya ihtiyaç vardır (Yang ve diğ., 2005). İyonik sıvıların dezavantajlarının giderilebilmesi için yeni nesil çözücüler ortaya çıkmıştır (Zhang ve diğ., 2012). Doğal derin ötektik çözücüler (NADES) olarak adlandırılan bu yeni nesil çözücüler amonyum veya fosfonyum organik tuzları ile alkol, asit veya amit gibi hidrojen bağı donörü (HBD) arasındaki bağ ile oluşurlar. NADES'lerin ucuz olmaları, hazırlanmalarının kolaylığı, biyobozunur olmaları, düşük buhar basıncına ve yüksek ısıl kararlılığa sahip çözücüler

olamaları önemli avantajlarıdır (Durand ve diğ., 2013b). Bu özellikleri nedeniyle doğal derin ötektik çözücüler bu çalışmadan ekstraksiyon çözücüsü olarak seçilmiştir.

Ayrıca mikrodalga destekli ekstraksiyonun diğer ekstraksiyon tekniklerine göre daha az çözücü kullanıp, çevreye daha az zarar vermesi, kısa sürede işlemin tamamlanması, otomasyona elverişliliği ve diğer tekniklere göre aynı anda daha birden fazla ekstraktın hazırlanabilmesi gibi avantajları nedeniyle bu tez çalışmasında ekstraksiyon yöntemi olarak tercih edilmiştir.

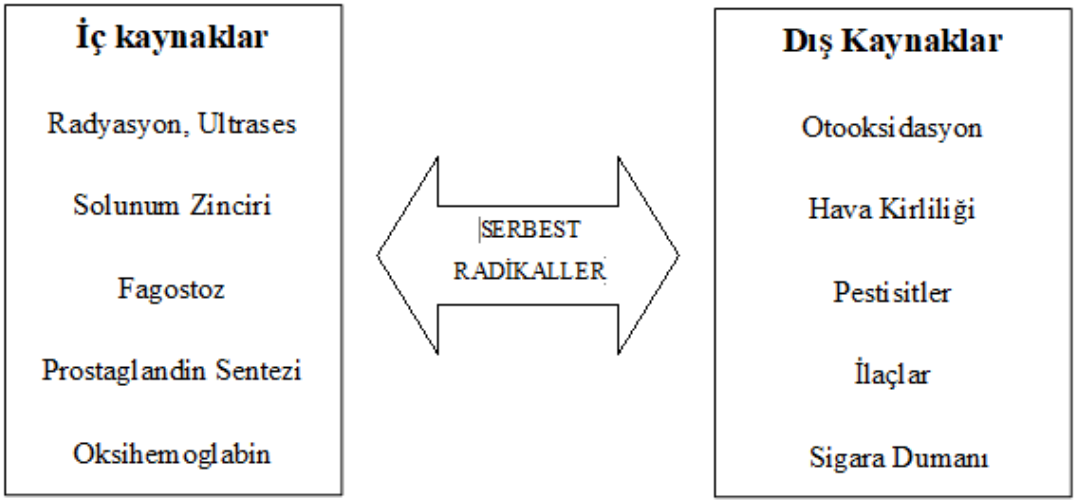
Bu tez çalışmasının amacı, çevre dostu doğal derin ötektik çözücüler kullanarak zerdeçalda bulunan antioksidanların ekstraksiyonunun incelenmesidir. Ayrıca, antioksidanların en verimli şekilde mikrodalga destekli ekstraksiyonunun yapılması için ekstraksiyon parametrelerinin optimizasyonu ve modellenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. ANTİOKSİDANLAR VE SERBEST RADİKALLER

İnsan vücudunda gelişen çok sayıda fizyolojik ve biyokimyasal reaksiyonlar sonucu, yan ürün olarak oksijen merkezli serbest radikaller ve diğer reaktif oksijen türleri üretilmektedir. Dış yörüngelerinde bir ve birden daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip moleküller ''Serbest radikaller'' olarak tanımlanır. Bu radikaller genellikle kararsız, molekül ağırlığı düşük, kısa ömürlü ve çok reaktiftirler (Ivanisova ve diğ., 2013).

Bu serbest radikallerin oluşumunun artmasında hava kirliliğinin, radyasyonun, sigara dumanın, pestisitlerin, bazı kimyasal maddelerin, gıda yoluyla alınan yağların, aşırı güneş ışığının, oksidan ilaçların, stres gibi etkenlerin çok büyük rolü vardır. Radikallerin oluşmasını sağlayan iç ve dış kaynaklar (Şekil 1)'de gösterilmiştir (Güner, 2014).

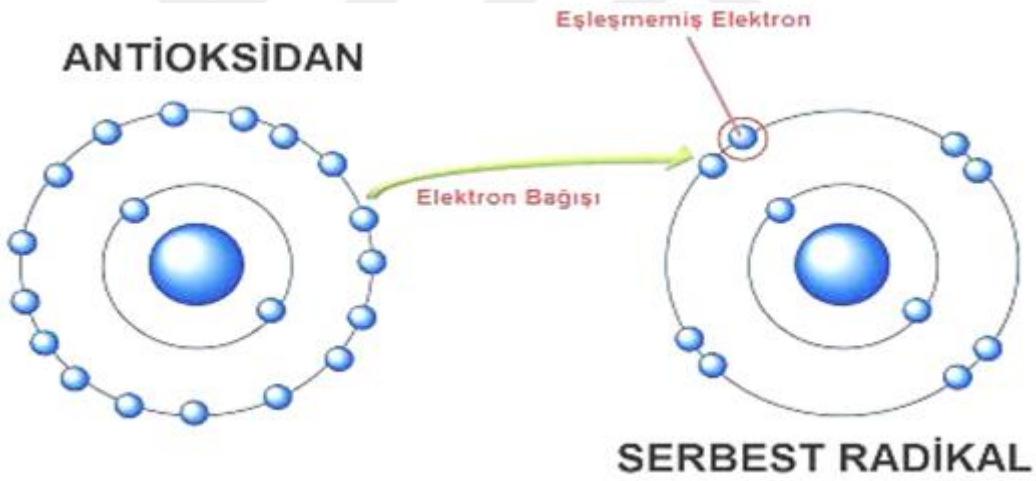


Şekil 1. Serbest radikallerin oluşmasını sağlayan iç ve dış kaynaklar..

Bu tür serbest radikallerin organizmada aşırı üretimi, biyomoleküllerde (örneğin lipidler, proteinler, DNA) oksidatif hasara neden olabilmekte ve sonunda ateroskleroz, kanser, diyabet, yaşlanma ve insanlarda diğer dejeneratif hastalıklar gibi birçok kronik hastalığa yol açabilmektedirler (Ivanisova ve diğ., 2013).

Oksijen ve azot kaynaklı olan serbest radikaller reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif azot türleri (RNS) olarak nitlendirilmektedirler. Serbest radikallerin süperoksit (O_2•-), peroksil (ROO•), hidroksil (OH•), hidroperoksil (HO_2•), alkoksi (RO•) radikalleri gibi reaktif oksijen türlerini oluşturmaktadır. Reaktif azot türlerinin ise azot oksit (NO•) ve azot dioksit (NO_2•) radikallerini oluşturmaktadır. Genellikle oksidanlar olarak adlandırılan hidrojen peroksit (H_2O_2), ozon (O_3), singlet oksijen ($^1O_2$), hipokloröz asit (HOCl), peroksinitrit (ONOO-), nitrik asit (HNO_2) ve diazot trioksit (N_2O_3) ise serbest radikaller arasında gösterilmemektedirler (Fang ve diğ., 2002).

İnsan vücudunda serbest radikallere karşı doğal bir savunma mekanizması vardır. Bu savunma mekanizmasını oluşturan bileşiklere "antioksidanlar" denir. Antioksidanlar radikal oluşumunu engelleyen ve oluşan radikalleri etkisiz hale getiren moleküllerdir. Antioksidanlar gıdaların bozulmasını önlemek ve besin değerini korumak amacıyla da kullanılır. Antioksidan ve serbest radikal arasındaki mekanizma Şekil 2'de gösterilmiştir (Gökpınar ve diğ., 2006).



Şekil 2. Antioksidan ve serbest radikal arasındaki mekanizma .

Antioksidanlar dört temel mekanizma kullanarak oksidanları (serbest radikalleri) etkisiz hale getirirler.

1. Süpürme etkisi (Scavenging): Serbest radikallere etki ederek onları daha zayıf bir moleküle çevirirler. Örnek olarak antioksidan enzimler gösterilebilir.
2. Söndürme etkisi (Quenching): Serbest radikallerle etkileşim haline geçerek, bu moleküllere tek hidrojen aktarıp etkinliklerini azaltır ya da inaktif hale getirirler. Örnek olarak Vitaminler gösterilebilir.

3. Geçiş metallerini şelatlama (chelating): Geçiş metalleri ile şelat oluştururlar.
4. Onarma etkisi (Repair): Hasar görmüş biyomolekülleri onarırlar (Gökpınar ve diğ., 2006**)**.

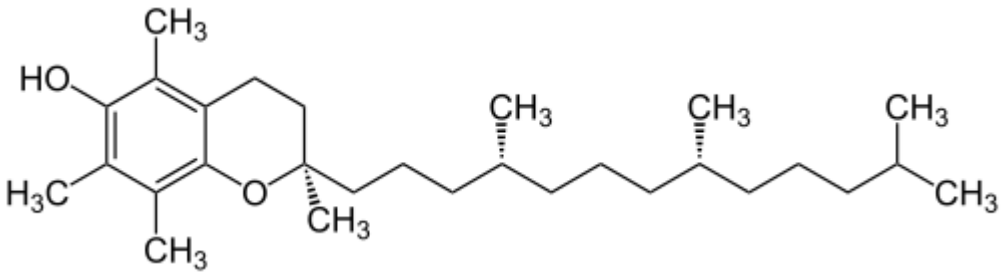
Antioksidanlar doğal ve sentetik antioksidanlar olmak üzere iki ana gruba ayrılır. Sentetik antioksidanların çoğu fenolik yapıya sahibtir (Flora ve diğ., 2013). Antioksidanların genel sınıflandırılması Tablo 1'de gösterilmiştir (Pradedova ve diğ., 2010).

Tablo 1. Antioksidanların sınıflandırılması.

ANTİOKSİDANLAR			
DOĞAL ANTİOKSİDANLAR			**Sentetik ANTİOKSİDANLAR**
ENZİMATİK OLANLAR	**ENZİMATİK OLMAYANLAR**		
Süperoksit dismutaz	**Endojen Antioksidanlar**	**Eksojen Antioksidanlar**	Bütillenmiş hidroksi anisol
Katalaz	Glutatyon	E Vitamini (Tokoferoller)	
Glutatyon peroksidaz	Seruloplazmin		Bütillenmiş hidroksi toluen
Glutatyon- S - transferaz	Bilirubin	β-Karoten	
Glutatyon redüktaz	Ferritin		Propil gallat
Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz	Laktoferrin	C Vitamini (Askorbik asit)	
	Ürik asit		
	Haptoglobinler		
	Albumin		

Doğal antioksidanlar arasında enzimler (süperoksit dismutaz-SOD, katalaz-CAT, glutatyon peroksidaz-GP, glutatyon redüktaz, sitokrom-C-oksidaz, hidroksiperoksidaz), makromoleküller (seruloplazmin, transferrin, ferritin, myoglobin, haptoglobilin) ve mikromoleküller (β-karoten, A-vitamini, C-vitamini, E-vitamini, tokoferoller, tiyol içerenler (glutatyon (GSH), N-asetil sistein, metiyonin, kaptopril, ubiguinon)) sayılabilir (Hilmi, 1994).

Tokoferoller (E-vitamini). Tokoferoller insan vücudunda sentezlenemez ve dışarıdan alınma zorunlulukları vardır. Vücutta en çok α-tokoferol bulunmaktadır. α-tokoferol'ün kimyasal yapısı Şekil 3'de gösterilmiştir.



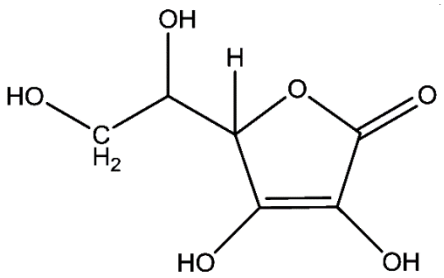
Şekil 3. α-tokoferol'ün kimyasal yapısı

Tokoferol türlerinin antioksidan aktiviteleri farklıdır ve radikal süpürme kapasitesi alfa>beta>gamma>delta tokoferole doğru gittikçe azalmaktadır (Kazanç, 1997). Bu vitamin, α-tokoferol'ün aktif kısmını, yani fenolik hidroksil grubu içeren aromatik halkasında bulunan hidrojeni, peroksil radikallerine vererek zincir reaksiyonlarını kırar ve böylece antioksidan etkisini gösterirler (Akkuş, 1995; Karagül ve diğ., 2000; Altıner ve diğ., 2017).

$$ROO\bullet + \alpha\text{-Tokoferol} - OH \Rightarrow ROOH + \alpha\text{- Tokoferol-}O\bullet$$

Yeşil bitkilerde, bitkisel yağlarda (mısır yağı), sütte, yumurtada bu vitamin bol miktarda bulunmaktadır (McDowell, 2000).

Vitamin C (L-askorbik asit). Vitamin C beş üyeli bir heterosiklik lakton halkası içine yerleştirilmiş bir enediyol grubu olan bir dibazik asittir . Vitamin-C'nin kimyasal yapısı Şekil 4'gösterilmiştir (Pehlivan, 2017).



Şekil 4. Vitamin-C kimyasal yapısı.

Vitamin C, lipit peroksidasyon zincir reaksiyonunu sonlandırmak için lipit radikaline bir elektron vererek, askorbat radikaline dönüşür. Askorbat radikal çiftleri, bir askorbat molekülü ve bir dehidroaskorbat molekülü üretmek üzere hızla reaksiyona girerler. Dehidroaskorbat

hiçbir antioksidan kapasiteye sahip olmadığı için, iki elektron ilavesiyle tekrar askorbata dönüştürülür. Bu reaksiyon oksidoredüktazlar tarafından gerçekleştirilir (İriş ve Çınar, 2019). Suda çözünür bir vitamin olduğu için vücudunda depolanmaz. İnsanlarda L-glonolakton oksidaz enzimi (laktonaz) bulunmadığı için vitamin C sentezi yapılamaz . Büyüme ve gelişme sürecinde önemli olduğu kadar, enfeksiyonlara karşı korunmada ve demir emilimine yardımcı olan bir antioksidandır (Aslan, 2018). C vitaminin kaynağı olarak limon, portakal, greyfurt, çilek, kivi gibi meyveler ve ıspanak, lahana, tere turp gibi sebzeler gösterilmektedir (Güçlü ve diğ., 2005).

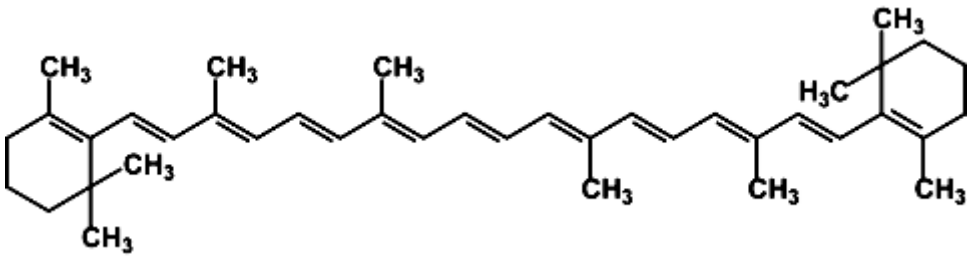
Karotenoidler. Karotenoidler fitoplanktonlar, algler, bitkiler ve bakteriler tarafından üretilebilen doğal pigmentlerdir. Karotenoidler güçlü antioksidanlardır. Genel olarak karotenoidler sebze ve meyvelerin kırmızı, turuncu, sarı ve yeşil renklerinden sorumludurlar. Doğada 700'den fazla yağda çözünebilen renk pigmente sahip karotenoid bulunmaktadır (Frel, 1994). Tüm karatenoidlerin yapısında konjuge çift bağlı polien zincirli, asiklik $C_{40}H_{56}$ hidrokarbonu vardır (Surai, 2012). Konjuge C=C bağı içeren, konjuge polien zincirine sahip karotenoidlerin bu yapısı; hem pigment özelliğini hem de bu bileşiklerin serbest radikaller ve singlet oksijen ile etkileşime girmesini sağlamaktadır, ayrıca bu konjuge bağ sayısı artıkça renk yoğunluğu da artmaktadır (Stahl ve Sies, 2003).

Karotnoidler içinde en önemlileri: α-karoten, β-karoten, likopen, α-kriptoksantin, lutein ve zeokantaksantin'dir (Bacanlı ve diğ., 2017). İki gruba ayrılırlar:

1- Karoten, yapısında karbon ve hidrojen atomları bulunduran karotenoidler; likopen, α-karoten, β-karoten vb.

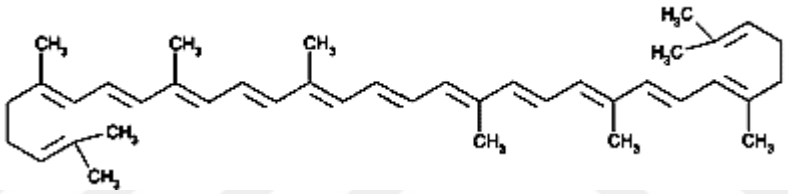
2- Ksantofiller, yapısında hidroksil, keton, metoksi gibi en az bir oksijen atomu içeren karotenoidler; Lutein, zeaksantin vb.

β-karoten doğada en yaygın olarak bulunan pigmenttir. β-karoten yeşil yapraklı sebzelerin yanı sıra turuncu ve sarı meyve ve sebzelerde de bulunur. β-karotenin kimyasal yapısı Şekil 5'de gösterilmiştir (Krinsky ve Johnson, 2005).



Şekil 5. β-karotenin kimyasal yapısı.

Likopen; domates, karpuz gibi kırmızı meyve ve sebzede bulunan, kırmızı karoten ve karotenoid olan fitokimyasal bir pigmentdir . En güçlü antioksidanlar arasında yer almaktadır. Likopen kimyasal yapısında 11 konjuge, 2 adet konjuge olmayan çift bağ içeren hidrokarbon zincirine sahiptir. Likopenin kimyasal yapısı Şekil 6'da gösterilmiştir (Bacanlı ve diğ., 2017).



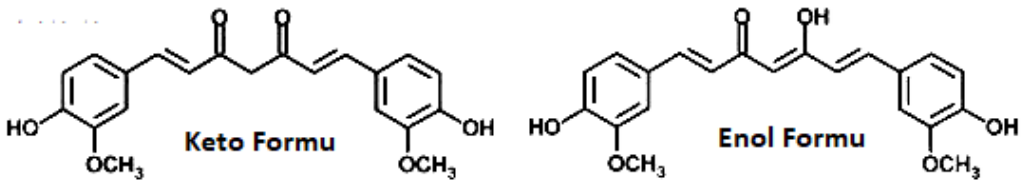
Şekil 6. Likopenin kimyasal yapısı.

2.2. KURKUMİN VE KURKUMİNOİDLER

Zerdeçal (*Curcuma longa* L.) bitkisi Asya ülkelerinde yaygın olarak kullanılan, 'Turmerik', 'Hint safranı', 'Sarıboya'ya da 'Sarıçöp' olarak da isimlendirilen, Zingiberaceae (zencefilgiller) familyasına ait, sarı çiçekli otsu bir bitkidir (Karaman, B,E., ve Köseler, E., 2017). Zerdeçal kurkumince zengin bir baharattır. Kurkumin, zerdeçal bitkisinin köklerinden elde edilen sarı renkli bir bileşendir (Altern, 2001).

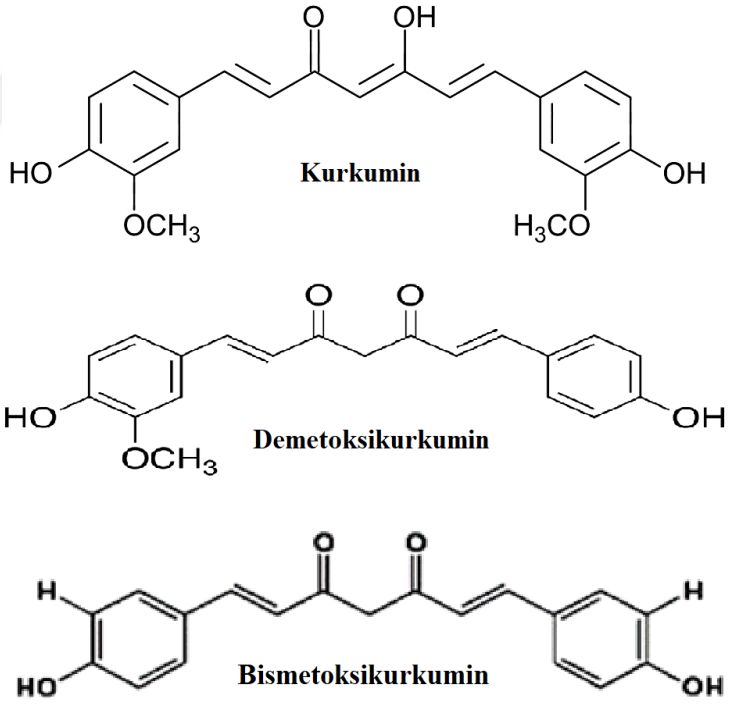
Kurkumin, molekül ağırlığı (368.37 g/mol) olan, 183 ˚C'de eriyen, metanol, etanol, aseton ve DMSO'da çözünebilen, suda çözünmeyen, ışığa duyarlı, hidrofobik karakterde ve tautomerik bir bileşiktir (Çoban ve Patır, 2010). Yapısında iki fenolik halka bulunduran kurkumin bileşiği, orto konumunlarında birer metoksi eter içerir ve para konumlarından bir alifatik doymamış hepten bağlayıcı ile birleştirilmiştir (Yalçın ve diğ., 2017).

Kurkuminin keto ve enol formları bulunmaktadır. Enol formu alkali ortamlarda yani pH 8'in üzerinde elektron verici, bis-keto formu ise nötral ve asidik yani pH 3-7 aralığındaki çözeltilerde güçlü bir proton vericisi olarak işlem görmektedir. Kurkuminin Keto ve Enol formları Şekil 7'de gösterilmştir (Sharma ve diğ., 2005).



Şekil 7. Kurkuminin Keto ve Enol formları.

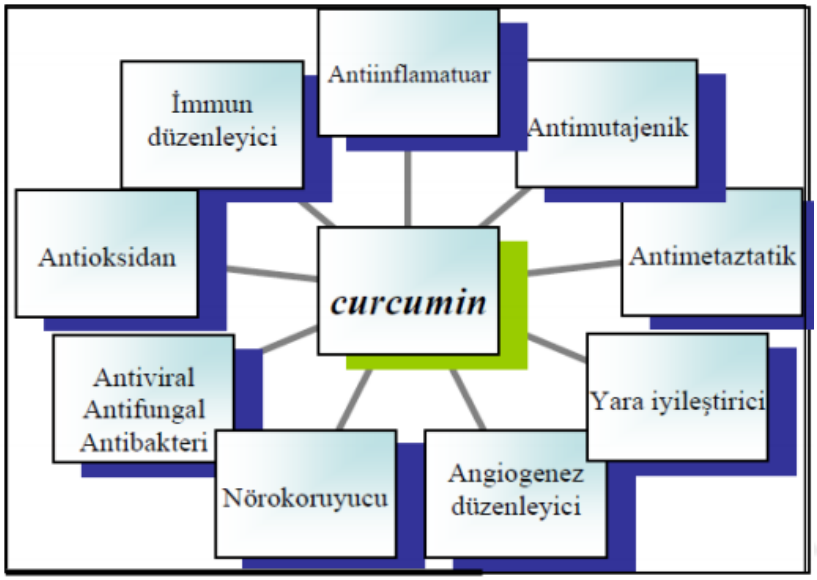
Zerdeçalın ana bileşenini kurkuminoidler olub: kurkumin (~77%), demetoksikurkumin (~18%) ve bimetoksikurkumin (~5%) içermektedir. Şekil 8'de Kurkuminoidlerin kimyasal formülleri verilmiştir (Çoban ve Patır, 2010).



Şekil 8. Kurkuminoidlerin kimyasal formülleri (kurkumin, demetoksikurkumin ve bimetoksikurkumin).

Doğal fenolik bir bileşik olan kurkumin acımsı tada, antioksidan, antibakteriyel ve iltihap önleyici özelliklere sahiptir. Kurkuminin antioksidan özelliği, dokuda oluşan ve DNA'ya

(Deoksiribo Nükleik Asit) zarar verebilen, serbest radikallerden doku hücrelerinin korunmasında önemli bir olanak sağlar. Kanserli hücrelerin oluşma nedenlerinden biri, doku hücrelerinde ki DNA'nın mutasyonudur. Kurkumin vücutta mutasyona uğramış kanser hücrelerini yokederek, vücuda yayılmasını ve daha fazla zarar vermesini engellemektedir (Akpolat ve diğ., 2010). Şekil 9'da kurkuminin farmakolojik özellikleri gösterilmektedir.



Şekil 9. Kurkuminin farmakolojik özellikleri

2.3. DOĞAL DERİN ÖTEKTİK ÇÖZÜCÜ (NADES)

Abbott tarafından 2003 yılında keşfedilen derin ötektik çözücüler (DES) iki veya üç farklı bileşenin karıştırılması ile elde edilen iyonik yapıdaki çözücülerdir. DES çözücülerinin erime noktasın onu oluşturan bileşenlerden daha düşüktür ve bu özellik karışımın oda sıcaklığında kullanılmasını sağlar. DES oluşumunda hidrojen bağı alan ve veren bazı maddeler Tablo 2'de gösterilmiştir. DES'ler dört şekilde elde edilebilmektedir ve bu oluşum tipleri Tablo 3'de özetlenmiştir (Abbott, A., 2003).

Tablo 2. DES oluşumunda hidrojen bağı alan ve veren bazı maddeler.

PROTON VERİCİ (proton sağlayan)	**PROTON KABUL EDİCİ** (elektron sağlayan)
ASİTLER (HO_2C-R_1) Oksalik asit (HO_2CCO_2H) Malonikasit ($HO_2CCH_2CO_2H$) Laktik asit Malik asit Nikotinik asit **AMİDLER (H_2N-C=O-R_2)** Üre (NH_2CONH_2) Tiyoüre (NH_2CSNH_2) **ALKOLLER (HO-R_3)** Gliserin ($C_3H_8O_3$) Etilen glikol ($C_2H_6O_2$)	Kolin Klorür Betain Alanin Glisin Histidin ve b.

Tablo 3. DES oluşum tipleri.

1	Metal tuzu + organik tuz (Örn: $ZnCl_2$ + kolin klorür)
2	Metal tuzu hidrat + orgaik tuz (Örn: $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ + kolin klorür)
3	Organik tuz + hidrojen bağı donörü (Örn: kolin klorür + üre)
4	Metal tuzu (hidrat) + hidrojen bağı donörü (Örn: $ZnCl_2$ + üre)

Doğal derin ötektik çözücüler (NADES), doğal bileşiklerin, yani organik asitlerin ve bazların, amino asitlerin, şekerlerin, şeker alkollerinin ve hidrojen bağı ile belirli molar oranlarda etkileşime giren ve birleştirildiğinde sıvılaşan polialkollerin karışımıdır (Vanda ve diğ., 2018). NADES'ler, tüm organizmaların hücre zarlarının etrafında bulunur ve hücrelerde çeşitli suda çözünmeyen metabolitlerin ve kararsız bileşiklerin biyosentezinde, çözündürülmesinde ve depolanmasında büyük rol oynar.

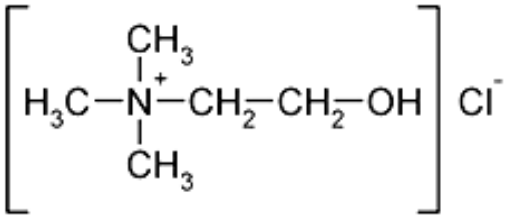
NADES'ler geleneksel çözücülerle kıyaslandıkladıklarında tamamen farklı özelliklere sahip oldukları görülmektedir. NADES'lerin polariteleri oldukça yüksek olduğundan, klasik çözücülerde çözünmeyen pek çok organik veya inorganik maddeyi çözebilme özelliğine sahiptirler. NADES'ler organik maddelerden oluşmakta olup, ucuz, biyobozunur, yanıcı olmayan, uçucu olmayan, çevre dostu, hazırlanması kolay, kokusuz ve renksiz çözücülerdir. NADES'ler sudan daha yüksek yoğunluğa ve viskoziteye, düşük iyonik iletkenliğe sahip çözücülerdir (Yang ve diğ., 2018).

NADES'lerin ana bileşeni doğal birincil metabolitlerdir. Örneğin amino asitler, aminler, şeker alkolleri, organik asitler, çeşitli hidroksil, karboksil veya amino grupları olan şekerlerdir (Choi ve diğ., 2011). Bu gruplar, iki molekül arasında hidrojen bağı etkileşimlerine yol açarak, yüksek oranda yapılandırılmış viskoz sıvıların oluşmasını sağlarlar (Zhang ve diğ., 2012). Bu sıvılar, çözünenler ile ek hidrojen bağları oluşturarak çözünme kabiliyetlerini (örneğin fenolik bileşiklerin) artırabilir. Ayrıca, iyonik sıvılarda olduğu gibi, NADES'lerin de geleneksel çözücülere kıyasla daha yüksek viskozite değerlerine sahip olduğu bilinmektedir (Dai ve diğ., 2013). Ötektik karışımların viskozitelerinin sıcaklık ve su içeriğine bağlı olarak büyük ölçüde değiştiği bulunmuştur. Son çalışmalar, ötektik çözücülerin viskozitesinin artan sıcaklık ile azaldığını kanıtlamaktadır. Sıcaklıktaki artış, moleküllerin enerjilerinin artmasına neden olur, böylece moleküller arasındaki ortalama kuvvetleri azaltır. Bununla birlikte, NADES içindeki moleküllerin hızı artar ve sonuç olarak karışımların viskozitesi azalır. Ekstraksiyon işlemlerinde etkili kütle transferi sağlamak için, çözücülerin viskozitesi uygun değerlere düşürülmelidir. Bu nedenle, yüksek viskoziteli NADES'lerin hazırlanması sırasında bileşime su eklenir. Sentezden sonra veya ekstraksiyondan önce su ile seyreltilmesi de yaygındır (Hayyan ve diğ., 2012; Al Omar ve diğ., 2016; Aroso ve diğ., 2017; Ghaedi, ve diğ., 2017).

2.3.1. Doğal Derin Ötektik Çözücülerin Hazırlanmasında Kullanılan Bazı Kimyasallar

2.3.1.1. Kolin Klorür ($C_5H_{14}ClNO$)

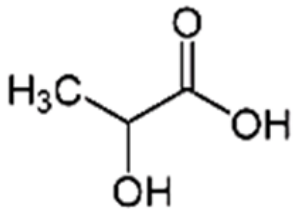
Organik bir bileşik olan kolin klorür, hem kuaterner amonyum tuzu hem de alkol içermektedir. Kolin-katyonuna ve klörür-anyonuna sahiptir. Esas olarak hayvan yeminde kullanılan beyaz, suda çözünür bir tuzdur. Molekül ağırlığı 139.6 g/mol‘dür. Kimyasal yapısı Şekil 10’da gösterilmiştir (Abbott, 2010).



Şekil 10. Kolin Klorürün kimyasal yapısı.

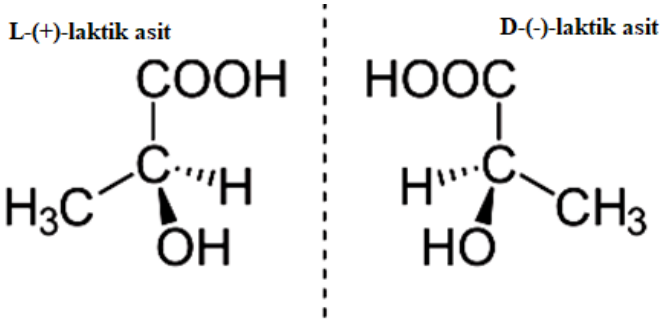
2.3.1.2. Laktik asit ($C_3H_6O_3$)

Laktik asit (alfa-hidroksipropiyonik, 2-hidroksipropanoik asit), bir hidroksil grubu içeren üç karbon atomlu bir monobazik karboksilik asittir. Laktik asidin tuzları ve esterleri laktatlar olarak adlandırılır. Şekerlerin fermantasyonu sırasında oluşur ve metabolizmada önemli rol oynar. Kimyasal yapısı Şekil 11'de gösterilmiştir.



Şekil 11. Laktik asitin kimyasal yapısı.

Oksitleyicilerle etkileşime girdiğinde laktik asit ayrışır. Demir veya bakır varlığında, atmosferik oksijen veya nitrik asit ile oksitlendiğinde: formik asit, asetik asit, oksalik asit, asetaldehit, karbondioksit ve pirüvik aside dönüştürülür. Laktik asit, hidrojen iyodürün etkisiyle propiyonik aside indirgenebilir. Laktik asit, iki enantiyomer formunda bulunabilir: L-(+)-laktik asit, D-(-)-laktik asit veya bunların rasemik karışımı DL-laktik asit. Şekil 12'de Laktik asitin izomerleri verilmiştir (https://ru.wikipedia.org/wiki/молочная_кислота).

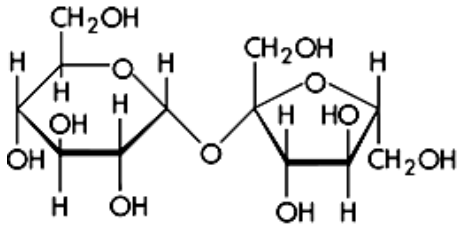


Şekil 12. Laktik asitin izomerleri.

2.3.1.3. Sakaroz ($C_{12}H_{22}O_{11}$)

Sakaroz (Sükroz), doğada çok yaygın olan bir disakkarittir. Birçok meyvede, şeker pancarında ve şeker kamışında yüksek oranda bulunmaktadır. Saf haliyle renksiz monoklinik kristallerdir. Erimiş sükroz katılaştığında, amorf şeffaf bir kütle oluşur. Sakkaroz suda oldukça çözünürdür,

metanolde az çözünür, dietil eterde ise hiç çözünmez. Molekül ağırlığı 342.29 g/mol‘dür. Kimyasal yapısı Şekil 13’de gösterilmiştir (https://ru.wikipedia.org/wiki/Сахароза).

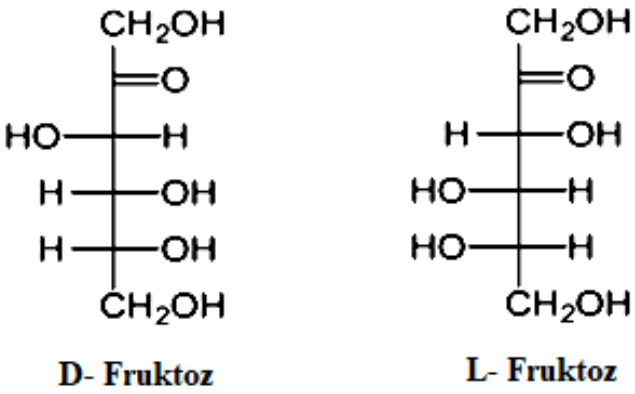


Şekil 13. Sükrozun kimyasal yapısı.

2.3.1.4. Fruktoz ($C_6H_{12}O_6$)

Fruktoz (levuloz, meyve şekeri), ketoheksoz sınıfından bir monosakkaritdir. Aynı zamanda glikozun izomeridir. Doğadaki en yaygın şekerlerden biri olarak, hem bireysel hem de disakkaritlerin (sukroz) ve polisakkaritlerin (inülin) bileşiminde bulunmaktadır. Gıda endüstrisinde tatlandırıcı olarak yaygın kullanılmaktadır. İnsan vücudunda önemli biyokimyasal işlevleri yerine getirir.

Fruktoz, C-2 atomunda bir keto grubu ve beş hidroksil grubu olan bir polihidroksi ketondur. Fruktozun kendisi ve sorboz, tagatoz ve psicose stereoizomerlerinin yapısında üç kiral karbon atomu vardır; bu nedenle, bu yapı sekiz stereoizomere (dört çift enantiomer) sahiptir. Fisher'in projeksiyon formülleri şeklinde yazılmış D-fruktoz (solda) ve L-fruktozun (sağda) yapısal formülleri Şekil 14’de gösterilmiştir (https://ru.wikipedia.org/wiki/Фруктоза).

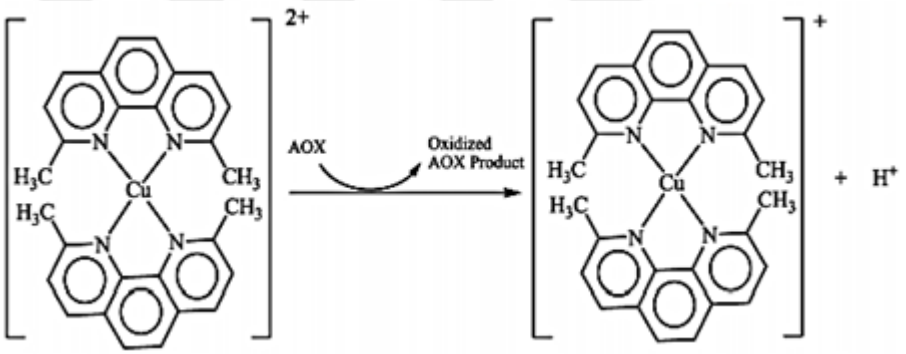


Şekil 14. Fruktozun izomerleri.

2.4. TOPLAM ANTİOKSİDAN KAPASİTE TAYİN YÖNTEMİ

2.4.1. CUPRAC (Cu(II) İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasite) Yöntemi.

Antioksidan kapasitesini belirlemek için Apak ve ark. tarafından geliştirilen CUPRAC yönteminde, 2,9-dimetil-1,10-fenantrolin (Neocuproin-Nc)'in Cu (II) ile oluşturduğu bakır (II)-neokuproin kompleksinin (Cu(II)-Nc) antioksidanlar varlığında bakır(I)-neokuproin (Cu(I)-Nc) kelatına indigenme özelliğinden faydalanılarak yapılmaktadır (Apak ve diğ., 2004). Cu(I)-Nc kelatının maksimum absorbsiyon yaptığı dalga boyu 450 nm'dir. Şekil 15'de CUPRAC reaksiyonunun mekanizması gösterilmiştir. CUPRAC yöntemi birçok flavonoidlerin, fenolik asitlerin, hidroksisinamik asitlerin, tiyollerin, sentetik antioksidanların ve C ve E vitaminlerinin antioksidan kapasitesinin belirlemesinde basit ve yaygın olarak uygulanan bir yöntemdir.



Şekil 15. CUPRAC reaksiyonu.

Neokuproin çözeltisi etanolde, Cu(II) klorür ve amonyum asetat (NH_4Ac) çözeltisi ise suda hazırlanmaktadır. Cu(II) klorürün sulu çözeltisine sırasıyla neokuproin ve amonyum asetatın sulu çözeltisi eklendikten sonra belli bir hacimde örnek ve su ilave edilip, karışımı 30 dakika inkübe etdikden sonra 450 nm'de referans çözeltiye (antioksidan bulunmayan) karşı absorbans okunmaktadır. Oluşan turuncu-sarı renk Cu(I)-Nc yük transfer kompleksinden kaynaklanmaktadır.

Geliştirilen bu yöntemde kromojenik yükseltgeyici reaktif, yani Cu(II)-Nc, n-elektron indirgeyici (AO_X) antioksidanlar ile aşağıdaki şekilde reaksiyona girer (Apak ve diğ., 2013).

$nCu(Nc)_2^{2+}$ + n-elektron indirgen (AOx) → $nCu(Nc)^{2+}$ + n-elektron yükseltgen ürün + nH^+

2.5. YANIT YÜZEY YÖNTEMİ

Box ve Wilson tarafından 1951 yılında geliştirilmiş olan, yanıt yüzey yöntemi, "proseslerin geliştirilmesinde ve optimizasyonunda gerekli olan istatistiksel ve matematiksel tekniklerin birlikte kullanıldığı bir yöntem" olarak tanımlanmaktadır (Myers ve diğ., 1995). Yanıt yüzey yönteminin amacı, deneyler için gerekli olan optimum koşulları elde etmek ve yapılan çalışmaya ilişkin bir matematiksel formülasyon gerçekleştirmektir (Değirmecioğlu ve diğ., 2006). Bu yöntem genelde, sistemin yanıtı ve bağımsız değişkenler arasındaki ilişkiyi belirlemek için kullanılmaktadır. Prosesi etkileyen parametreler bağımsız değişkenler, yanıtlar ise bağımlı değişkenlerdir. Optimum noktalar: yanıtların izohips eğrilerinin üst üste yerleştirilmesi veya lineer olmayan programlama yöntemleri kullanılarak belirlenmektedir. Yanıt yüzey yöntemi 3 aşamadan oluşmaktadır. Bunlar: eleme denemeleri, bölge araştırması ve ürünün optimizasyonudur.

Eleme denemeleri, daha az sayıda ve daha verimli deneme yapılmasını sağlamaktadır. Eleme denemenin ikinci aşaması olan, bölge araştırmasının amacı, eleme denemeleri ile elde edilen bağımsız değişkenlerin sistemin yanıtında oluşturdukları değerlerin, optimum noktaya yakın sonuçlar verip vermediğini belirlemektir. Yanıt yüzey yönteminin üçüncü aşaması ise, işlem optimum noktaya yaklaşıldığında başlar ve burada gerçek yanıt fonksiyonu önemli bir eğrilik gösterir. Bu eğriliğin tahminlenmesinde lineer olmayan modeller, genellikle ikinci dereceden polinominal modeller, üssel modeller veya eksponensiyel modeller kullanılmaktadır. YYM çalışmalarında kullanılan 2. dereceden model denklemi (Denk.1)'de gösterildiği gibidir.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^{k} \beta_i \, x_i + \sum_{i=1}^{k} \beta_{ii} \, x_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=2}^{k} \beta_{ij} \, x_i \, x_j + \varepsilon \qquad \text{(Denk. 1)}$$

Denklemde Y yanıt, ε hata, β_0 sabit bir katsayı olan denklemin kesim noktası, β_i lineer, β_{ii} ikinci derece, β_{ij} ikili etkileşim katsayılarıdır. Uygun bir model elde edilerek, optimum noktanın belirlenmesinde kullanılır (Koç ve diğ., 2010).

Deneylerin tasarlamasına katkıda bulunan farklı deneysel tasarım modelleri vardır. Tam faktöriyel, kesirli faktöriyel, Box-Behnken ve merkezi kompozit tasarımı, D-optimal tasarım en çok bilinen tasarım modelleri arasında yer almaktadırlar.

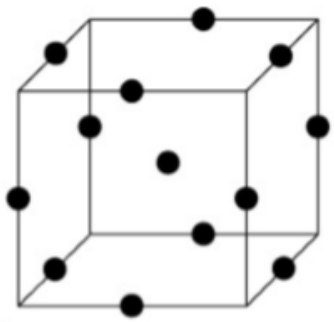
Box-Behnken Tasarımı

Box-Behnken deney tasarımına göre yapılacak deney sayısı, aşağıdaki denklemi kullanarak yapılmaktadır.

$$N = 2k(k - 1) + C_0$$

Denklemde: N deney sayısı, k bağımsız değişken sayısı, C_0 merkez noktasındaki tekrar sayısıdır.

Her bir faktör için Box-Behnken tasarımı bu üç seviyeyi (-1, 0, +1) kullanmaktadır. Faktörlerden ikisi 0 seviyesinde sabit kalırken, diğer kalan faktörler +1 ve -1 seviyesinde bulunurlar. Farklı gruplar için bu proses tekrarlanabilir.



Şekil 16. Box-Behnken tasarımının kübik şekli.

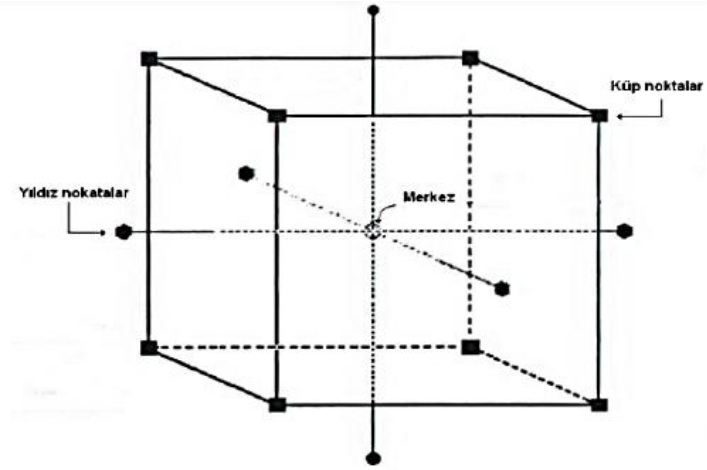
Merkezi Kompozit Tasarımı

Merkezi kompozit tasarımda üç tür tasarım noktası vardır, bunlar: iki seviyeli tam faktöriyel, eksenel ve merkezi noktalardır. İki seviyeli tam faktöriyel noktalar, bir faktörün +(max) veya –(min) düzeylerinden oluşmaktadır. Eksenel noktalar, önceden belirlenen iki düzey noktalarının daha ötesinde olan ve program tarafından aşağıda gösterilen denklem ile belirlenen +α ve -α değerlerdir. Merkezi noktalar ise, deneysel hataları tespit etmek için tekrar edilen noktalardır (Türk, 2016).

$$\alpha = 2k/4 \text{ (k çalışılan bağımsız değişken sayısı)} \quad (1)$$

Bu tasarımda her bir faktörün beş düzeyi vardır. Bunlar +1 ve -1 ile ifade edilen faktöriyel noktalar +α ve –α ile ifade edilen eksenel noktalar ve 0 olarak ifade edilen merkez noktalardır.

Deneysel tasarım noktaları ile birlikte bir MKT modeli şekil 17'de gösterilmiştir (Turan ve Altundoğan, 2011).



Şekil 17. Merkezi kompozit tasarım modeli

Regrasyon ve Varyans analizi

Bilimsel olarak yapılan deneylerin güvenirliğini kanıtlamak için bir takım istatistiksel analizler yapılmaktadır. Bunlar: standart sapma, varyans, korelasyon katsayısı, regresyon analizi, varyans analizidir.

Korelasyon katsayısı iki değişken arasında doğrusal bir ilişki olup olmadığını göstermektedir. Özetle, değişkenlerde oluşan değişikliklerin birbirilerini etkileyip etkilemediklerini göstermektedir.

Regresyon analizi, iki ya da daha çok değişken arasındaki doğrusal bir ilişki olup olmadığını ve doğrusal ilişkinin bir doğrusal denklemle nasıl ifade edildiğinin gösteren analiz metodudur. Eğer tek bir değişken kullanılarak analiz yapılırsa buna tek değişkenli regresyon, birden fazla değişken kullanılıyorsa çok değişkenli regresyon analizi olarak isimlendirilmektedir.

İstatistiksel olarak kullanılan diğer bir terim ise "p" değeri yani olasılık (probability) değeridir. Deneyler %95 güven aralığında yapılmaktadırlar yani, %5 hata kabul edilmektedir. $p<0.05$ olduğunda, faktörler istatistiksel olarak anlamlıdır.

2.6. ZERDEÇALDAN KURKUMİNİN EKSTRAKSİYONUNDA MDE VE DİĞER EKSTRAKSİYON YÖNTEMLERİ İLE İLGİLİ YAPILAN ÇALIŞMALAR

Bener ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, zerdeçaldan kurkuminin geri kazanımı için mikrodalga destekli ekstraksiyon (MDE) tekniği araştırılmıştır ve geleneksel ısı destekli ekstraksiyon tekniği ile kıyaslanmıştır. Ayrıca bu çalışmada, toplam antioksidan kapasitesi (TAC), toplam fenolik içeriği (TPC), serbest radikal süpürme aktivitesi (FRS), hidrojen peroksit süpürme aktivitesi (HPS) ve süperoksit anyon radikalinin (SARS) süpürme aktivitesi belirlenmiştir. En yüksek kurkumin ekstraksiyonu 5 dakika süre, 80 °C sıcaklık, (80:20 v/v) oranlı MeOH-Su çözeltisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Solvent karışımlarında su konsantrasyonu arttığında ve sıcaklığın 80 °C 'dan yüksek olduğunda ekstraksiyonun azaldığı tespit edilmişdir. Sonuç olarak, kısa ekstraksiyon süresi ve solvent tüketimi ile antioksidan bileşenlerin ekstrakte edilerek geri kazanımı için MDE tekniğinin geleneksel ısı destekli ekstraksiyon tekniğinden daha faydalı olduğu ortaya konulmuştur. Ekstrakte edilen kurkuminin tanımlanması ve nicelleştirilmesi için HPLC-DAD sistemi kullanılmıştır (Bener ve diğ., 2016).

Deepak ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, zerdeçal'dan kurkuminoidlerin geri kazanımı için mikrodalga destekli ekstraksiyon (MDE) tekniği araştırılmıştır. Kurkuminoidlerin ekstraksiyon derecesi ve saflığı, seçilen çözücüye ve mikrodalga işlem süresine bağlı olduğu bulunmuştur. Ekstraksiyon işlemi, optimize edilmiş %20 güç seviyesinde (PL), aseton kullanılarak 1 dakika içinde yapılmıştır. Diğer klasik ekstraksiyon teknikleriyle karşılaştırıldığında, MDE daha az emek sarf edilerek, daha verimli ve hızlı bir ekstraksiyon işlemi sağlamaktadır (Deepak ve diğ., 2002).

Rezaeia ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, zerdeçaldan kurkuminin geri kazanımı için formik asit ve mikrodalga destekli ekstraksiyon (MDE) yöntemi araştırılmıştır. İranın (Amol) marketinden elde edilen kurkumin kökleri ögütülerek, farklı parçacık boyutlarındaki süzgeçlerden geçirdikden sonra ekstraksiyon yapılmıştır. Kurkumin ekstraksiyonu için optimize edilmiş koşullar: parçacık boyutu 0.21 mm, mikrodalga gücü 100 W ve uygun çözücü olarak aseton olarak kabul edilmiştir. Parçacık boyutu 2.00'dan 0.21 mm'ye düştükçe, kurkumin konsantrasyonunun arttığı, diğer taraftan parçacık boyutu 0.21'den 0.177 mm'ye düştüğünde ise kurkumin içeriği azaldığı görülmüştür.. Mikrodalga destekli ekstraksiyon ile ekstrakte edilen kurkuminin organik çözücünün polaritesi ile ilişkili olduğu, fakat dielektrik sabiti ile spesifik

bir ilişkisi olmadığı görülmüştür. Dielektrik sabitinin, kurkumin ekstraksiyonu için değil, hücre duvarının bozulması için uygun bir parametre olduğu bulunmuştur. Ayrıca, metanol ve su karışımı kullanılarak yüksek saflıkta kurkumin elde edilmiştir. Ekstrakte edilen kurkuminin tanımlanması ve nicelleştirilmesi için HPLC sistemi kullanılmıştır (Rezaeia ve diğ., 2016).

Jayaprakasha ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada ise, kurkumin, bisdemetoksikurkumin ve demetoksikurkumin gibi bireysel kurkuminoidlerin antioksidan aktivitelerini test etmek için, ilk defa fosfomolibden ve linoleik asit peroksidasyon yöntemleri gibi in vitro model sistemleri kullanılmıştır. Fosfomolibden yönteminde, 50 ppm konsantrasyonda ekstraktların antioksidan kapasitesi sırasıyla: kurkumin (3099±66)> demetoksikurkumin (2833 ± 25) > bisdemetoksikurkumin (2677 ± 30) askorbik asit eşdeğeri (μmol/g) olarak belirlenmiştir. Kurkumin, bisdemetoksikurkumin, demetoksikurkumin ve Butil Hidroksil Tolueni (BHT) varlığında, linoleik asidin oksidasyonu çok yavaş olduğu için, renk gelişimi de yavaştır. Bu nedenle, kurkumin, demetoksikurkümin ve bisdemetoksikürkuminin antioksidan aktivitelerinin 120 saatte sırasıyla %81.98, %81.77 ve %73 olduğu bulunmuştur. İnvitro modeller tarafından elde edilen veriler, ilk defa olarak bireysel kurkuminoidlerin antioksidan potansiyellerini açıkça ortaya koymuştur (Jayaprakasha, G.K ve diğ., 2006).

Wakte ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, zerdeçal'ın kurutulmuş ve ıslatılmış köklerinden kurkuminin geri kazanımı için, soxhlet, MDE, ultrases destekli ekstraksiyon (UAE) ve süperkritik karbondioksit (SC-CO_2) destekli ekstraksiyon yöntemleri ile araştırılmıştır. Soxhlet ekstraksiyon yöntemi ile %2.1±0.1 kurkumin ekstrakte edilmiştir. Kurutulmuş köklerin MDE ve UAE yöntemlerinde çözücü olarak aseton ve etanol kullanılmıştır. Aseton ile yapılan ekstraksiyonda 1-5 dakikada sırasıyla MDE ve UAE için %13.71- 68.57 ve % 6.57–32.85; EtOH ile yapılan ekstraksiyonda ise sırasıyla % 9.71- 48.57 ve % 8-40 kurkumin ekstrakte edilmiştir. Burdan da anlaşıldığı gibi aseton kurkuminin ekstraksiyonunda daha uygun çözücüdür. Kurkumin kökleri su ve etanol ile 24 saat içerisinde 25 ^{o}C sıcaklıkta ıslatılmıştır. MDE ve UAE yöntemlerinde, EtOH ıslatma ve ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanılarak elde edilen kurkumin içeriği 1-5 dakikada sırasıyla %15.54–57.14 ve % 17.55–61.90 olmuştur. Su ile ıslatılmış köklerden aseton ile ekstraksiyon yapıldığında 1-5 dakikada sırasıyla %37.49-90.69 ve %22.15–71.42 kurkumin içeriği elde edilmiştir. SC-CO_2 yöntemi ile optimum ekstraksiyon koşulları kullanılarak %69.37 kurkumin konsantrasyonu elde edilmiştir.

Sonuç olarak bu çalışmada zerdeçal'dan kurkuminin geri kazanımı için MDE, UAE ve SC-CO_2 ekstraksiyon yöntemleri geliştirilip birbirileri ile karşılaştırılmıştır. Yapılan çalışmada MDE yöntemi ile minimum ekstraksiyon süresinde yüksek ekstraksiyon verimi elde edilmiştir. Ayrıca, köklerin su ile ıslatılması etkili sonuç vermiştir. Kurkumin ekstraksiyon hızı, zerdeçal köklerinin su ile ıslatılması ve asetonun ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanılması ile artmıştır. Çalışmada, ekstrakte edilen kurkuminin tanımlanması ve nicelleştirilmesi için HPLC sistemi kullanılmıştır (Wakke, ve diğ., 2011).

Sujata ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, zerdeçal'dan kurkuminoidlerin ve biyoaktif bileşenlerin geri kazanımı için Ultrason Destekli Üç Fazlı Bölümleme (UA-TPP) yöntemi araştırılmıştır. Çözücü, ekstraksiyon süresi, amonyum sülfat konsantrasyonu, zerdeçal sulu bulamacın t-bütanol'e oranı, zerdeçal tozunun suya oranı ve UA-TPP üzerindeki görev döngüsü ile birlikte ultrasonik güç olmak üzere çeşitli işlem parametrelerinin etkisi incelenmiştir. %30 (w/v) amonyum sülfat konsantrasyonu, 1:40 (w/v) çözünen-su oranı, 1:1 (v/v) bulamaç-solvent oranı, 60 W ultrasonik güç, %40 görev döngüsü ve 30±2 °C sıcaklıkta 30 dakika ekstraksiyon süresinde, t-butanol çözücüsü kullanarak en yüksek kurkuminoid konsantrasyonu elde edilmiştir. Bu çalışma, ultrasonun üç fazlı bölümleme ile sinerjik etkisinin, geleneksel ekstraksiyon tekniklerine kıyasla kurkuminoidlerin ekstraksiyonunu kolaylaştırmak için önemli bir potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir. Çalışmanın doğrulanması için geleneksel yöntemler ve soxhlet ekstraksiyonu ile karşılaştırma yapılmıştır. Referans yöntem olarak soxhlet ekstraksiyonu göz önüne alındığında, UA-TPP ile %75.5 ve TPP ile %65.6 kurkuminioid içeriği elde edilmiştir. Bu çalışma, UA-TPP'nin sadece süreci arttırmakla kalmayıp, aynı zamanda TPP ile karşılaştırıldığında ekstraktın antioksidan ve anti-inflamatuar aktivitesini de geliştirdiğini ortaya koymuştur. Ekonomik açıdan bakıldığında, ultrason yüksek yatırım maliyeti gerektirse de, proses maliyetinin soxhlet ekstraksiyon işlemine kıyasla daha uygun olduğu bulunmuştur (Sujata ve diğ., 2020).

Sahne ve arkaşları tarafından yapılan bir çalışmada ise, zerdeçaldan biyoaktif bileşik olan kurkuminin farklı yollarla ekstraksiyonu yapılmıştır. Bu amaçla, MDE, UAE ve enzim destekli ekstraksiyon tekniklerinin, gerekli ekstraksiyon parametrelerinin bazıları optimize edilmiştir ve sonuçlar geleneksel ve referans yöntem olarak soxhlet ekstraksiyonu ile karşılaştırılmıştır. Soxhlet ekstraksiyonu: 60^{o}C sıcaklıkta 8 saatte, MDE ekstraksiyonu 300W mikrodalga gücünde 2 dakikada, UAE ekstraksiyonu: 35 ^{o}C sıcaklıkta 30 dakikada, Enzim destekli ekstrakiyon ise

%3 w/w'lük enzim konsantrasyonun kullanarak 4 saatde gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak, MDE ile % 3.72, UAE ile %3.92, enzim destekli ekstraksiyon ile %4.1 ve Soxlet ekstraksiyon yöntemi ile %6.9 kurkumin elde edilmiştir. Ekstaktlarda kurkuminin varlığı nicelleştirilmesi için yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) kullanılmıştır (Sahne ve diğ., 2016).

MALZEME VE YÖNTEM

3.1. KULLANILAN CİHAZLAR

Zerdeçalı toz haline getirmek için RENAS marka RTB-1250 modeli sert bitki öğütme makinası, toz halindeki zerdeçalları süzmek için parçacık boyutu 355 μm olan süzgeç, bu çalışmada kullanılan zerdeçalı ve kimyasal maddeleri tartmak için RADWAG marka Was 220X model analitik terazi, kimyasalların çözünmesine yardımcı olması için Bandelin ultrasonik banyo, bidistile su üretimi için Millipore Simpak 1 Synergy 185 bidistile su sistemi kullanılmıştır. Absorbans ölçümlerinde Agilent marka CARY 100 Bio model UV-Vis spektrofotometre (Mulgrave, Victoria, Australia) kullanılmıştır. HPLC analizlerinde Waters Breeze ™ 2 model HPLC sistemi (Milford, MA), Waters 1525 Binary HPLC pompa, Waters 2998 photodiode array (PDA) detektör (Chelmsford, MA), Waters In-line degasser AF, ters fazlı Waters C18 kolon (250 mm x 4.6 mm, 5μm) ve 50 μL hacimli enjeksiyon şırıngası kullanılmıştır. Zerdeçal ekstraktının hazırlanması için Milestone ETHOS One kapalı kap mikrodalga ekstraksiyon sistemi (Shelton, CT, ABD) kullanılmıştır.

3.2. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

Kurkumin, Etanol (>%99.5), metanol (>%99.8), 2,9-dimetil-1,10-fenantrolin (Neocuproin), 6-hidroksi 2,5,7,8-tetrametilkroman-2- karboksilik asit (Troloks, TR), asetonitril (CH_3CN) Sigma-Aldrich (St. Louis. Mo., USA) firmasından temin edilmiştir. Bakır(II) klorür dihidrat ($CuCl_2.2H_2O$), Amonyum asetat (NH_4Ac), L-fruktoz ($C_6H_{12}O_6$), sukroz ($C_{12}H_{22}O_{11}$), laktik asit ($C_3H_6O_3$), kolin klörür ($C_5H_{14}ClHO$), asetik asit (CH_3COOH) Merck (Darmstadt, Germany) firmasından temin edilmiştir. Zerdeçal ise Natural Çözüm Ahmet Evlüce Bitkisel Ürünler (Istanbul, Turkey) firmasından temin edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan kimyasalların hepsi analitik saflıktadır.

3.3. KULLANILAN ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI

3.3.1.NADES'lerin hazırlanması ve karakterizasyonu

Çalışmada kullanılan NADES'ler, ısıtma ve karıştırma yöntemi ile hazırlanmıştır. Bileşenler, Tablo 4'te gösterilen molar oranlarda, kapaklı erlenlerde tartılarak, 50 °C' sıcaklıkta su banyosunda, homojen şeffaf sıvı haline gelene kadar karıştırılarak hazırlandı. Sıcaklığı kontrol etmek için (IKA CMAG HS7) kontak termometreli ısıtıcı kullanılmıştır. Stabilitelerini kontrol etmek için elde edilen NADES'ler (VOS 60 a STİK) model vakum fırınında 24 saat bekletilmiştir. NADES'lerin yapısal olarak oluşumunu kanıtlamak için, FTIR spektrumları ATR olarak kaydedilen Perkin Elmer Spectrum 100 optik FT-IR Spektrometresi kullanılmıştır. NADES'lerin yoğunlukları 25℃ sıcaklıkta kem-Kyoto Da645-CHD502 yoğunluk ve Özgül Ağırlık ölçerde ölçülmüştür. Numunelerin, sıcaklığa (30-120 ℃) ve kayma hızına (1-100 s^{-1}) bağlı viskozite değerleri, 25 mm çapında paralel plaka geometrisi ile donatılmış bir dönme reometresi (Discovery Hybrid Reometer-1, DHR-1, TA, USA) kullanılarak belirlenmiştir.

Tablo 4. NADES bileşenleri ve molar oranları.

Solvent Kodu	**Bileşenler**	**Molar Oranı**
NADES-1[1]	Fruktoz; Kolin klorür; Su	2:5:5
NADES-2[2]	Sukroz; Kolin klorür; Su	1:4:4
NADES-3	Fruktoz; Laktik asit; Su	1:5:5
NADES-4	Sukroz; Laktik asit; Su	1:5:7
NADES-5	Laktik asit; Kolin klorür; Su	1:1:2

[1] Ekstraksiyondan önce 9:1 (v:v) oranında su ile seyreltildi.
[2] Ekstraksiyondan önce 8:2 (v:v) oranında su ile seyreltildi.

3.4. ÖRNEKLERİN HAZIRLANMASI

Kök halinde temin edilen zerdeçallar (100 g) labaratuvarda öğütüp toz haline getirdikden sonra, parçacık boyutu 355 μm olan süzgeçden geçirerek kilitli naylon poşet içersinde saklandı.

3.4.1. NADES'lerin hazırlanması:

NADES-1 (Fruktoz + Kolin klörür + Su): 7.2 g fruktoz, 13.96 g kolin klörür ve 1.8 g distile su su banyosunda 65 ºC sıcaklıkta manyetik karıştırıcı yardımıyla 30 dakika boyunca karıştırırarak NADES-1 hazırlanmıştır. Oluşan NADES viskoz olduğu için su ile (9:1) oranında seyreltilmiştir.

NADES-2 (Sukroz + Kolin klörür + Su): 13.68 g sukroz, 22.34 g kolin klörür ve 2.88 g distile su su banyosunda 65 ºC sıcaklıkta magnetik karıştırıcı yardımıyla 30 dakika boyunca karıştırarak NADES-2 hazırlanmıştır. Oluşan NADES viskoz olduğu için su ile **(4:1)** seyreltildi.

NADES-3 (Laktik asit + Fruktoz + Su): 20 g laktik asit, 7.2 g fruktoz ve 1.6 g distile su su banyosunda 65 ºC sıcaklıkta manyetik karıştırıcı yardımıyla 30 dakika boyunca karıştırarak NADES-3 hazırlanmıştır.

NADES -4 (Laktik asit + Sukroz + Su): 4.5 g laktik asit, 3.423 g sukroz ve 1.26 g distile su su banyosunda 65 ºC sıcaklıkta manyetik karıştırıcı yardımıyla 30 dakika boyunca karıştırarak NADES-4 hazırlanmıştır.

NADES-5 (Laktik asit + Kolin klörür + Su): 10 g laktik asit, 14 g kolin klörür ve 2.6 g distile su su banyosunda 65 ºC sıcaklıkta magnetik karıştırıcı yardımıyla 30 dakika boyunca karıştırarak NADES-5 hazırlanmıştır.

CUPRAC yöntemi için; $1.0x10^{-2}$ M $CuCl_2$ çözeltisi ve 1 M amonyum asetat tampon çözeltisi (pH 7.0) saf suda, $7.5x10^{-3}$ M 2,9-Dimetil-1,10-fenantrolin (neokuproin:Nc) çözeltisi etanolde hazırlanmıştır.

Kurkumin ve troloks çözeltilerini hazırlamak için uygun miktarda kurkumin ve troloks tartılarak, yukarıda beriltilen NADES'ler ile ultrasonik banyo da hazırlanmıştır.

HPLC Yönteminde kullanılmak üzere mobil fazın için 240 mL asetonitril; 360 mL bidistile su; 7.2 mL %2'lik asetik asit karışımı hazırlanmıştır.

3.5. UYGULANAN YÖNTEMLER

3.5.1. CUPRAC Yöntemi

Bir tüpün içerisine sırasıyla 1 mL 1.0×10^{-2} M Cu(II) çözeltisi, 1 mL 7.5×10^{-3} M neokuproin (Nc) ve 1 mL amonyum asetat (pH 7.0) tampon çözeltisi ilave edilmiştir. Daha sonra x mL örnek ve (1.1-x) mL çözücü ilave edilerek son hacmi 4.1 mL'ye tamamlanmıştır. Çözeltiler karıştırıldıkdan sonra tüplerlerde 30 dakikada süre boyunca oda sıcaklığında ağzı kapalı olarak bekletilmiştir. Bu süre sonunda referans numuneye karşı 450 nm dalgaboyunda absorbans değerleri ölçülmüştür. Ölçümde elde edilen absorbanslardan hesap yaparak zerdeçal örneklerinin toplam antioksidan kapasiteleri troloks eşdeğeri olarak (mmol TR/g-kuru katı (DS)) aşağıda belirtilen formül ile hesaplanmıştır. Formülde bulunan ε_{TR} yani molar absorptivite değeri TR için ilgili NADES ortamında elde edilen doğru denkleminin eğim değeridir.

$$TAC\ (mmol\ TR/g-DS)\ =\ \frac{Absorbans}{\varepsilon_{TR}} \times \frac{Toplam\ hacim\ (mL)}{Örnek\ hacmi\ (mL)} \times \frac{Ekstraksiyon\ hacmi}{Örnek\ miktarı\ (g)}$$

3.5.2. Kurkuminin HPLC Analizi ile Belirlenmesi

Zerdeçaldan kukuminin belirlenmesi için Wichitnithad ve ark. (Wichitnithad ve diğ., 2009) tarafından geliştirilen HPLC analizi bazı ufak modifikasyonlar yapılarak kullanılmıştır. HPLC analizinde ters faz izokratik bir elüsyon programı kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı 33 ºC, dalga boyu 425 nm, akış hızı 1.6 mL/dakika olarak belirtilmiştir. Her bir örnek için, 25 dakikalık toplam çalışma süresi yapılmıştır. Mobil faz olarak (40:60 v/v) asetonitril:%2'lik asetik asit karışımı, HPLC şartlandırılması için su ve MeOH kullanılmıştır. HPLC yöntemi ile her bir NADES için kurkuminin pik alanı ve konsantrasyon (M) arasında kalibrasyon eğrileri oluşturulmuş ve doğru denklemleri elde edilmiştir. Doğru denklemleri lkullanılarak ilgili ekstraktların kurkumin içeriğini (CC) hesaplanmıştır.

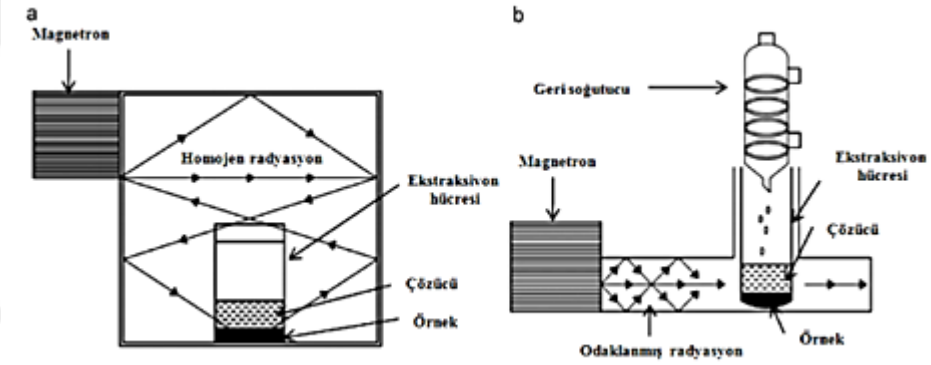
3.5.3. Mikrodalga destekli Ekstraksiyon Yöntemi

Mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemi, diğer yöntemlere göre avantajlar sergilemekte olup 0.3–300 GHz aralığında değişen elektromanyetik dalgalara sahip bir yöntemdir. Mikrodalga destekli ekstraksiyon yönteminin avantajları: yüksek verimliliği, düşük maliyetti, ekstraksiyon parametrelerinin (zaman, güç, sıcaklık, karıştırma hızı vb.) tamamen otomasyona açık olması, kısa sürede ve daha az çözücü kullanarak ekstraksiyon prosesinin gerçekleştirilmesi ve bunun

sonucu olaraktan daha kaliteli ürün elde edilmesi olarak sıralanabilmektedir. Dezavantajı ise genellikle polar solventler ile çalışabilmesidir (Cellat, 2011).

MDE yönteminde geleneksel ısıtma yöntemlerinden farklı olarak ısıtılacak örneğe derinlemesine nüfuz ederek malzeme içerisinde ısı oluşturulur ve tüm malzemenin hemen hemen aynı oranda ısıtılmasını sağlar. Geleneksel yöntemlerin ısı transferi ise konveksiyon ve kondüksiyon yolu ile iletilir ve ısı termal olarak maddenin dış yüzeyinden aktarılır (Mahesar ve diğ., 2008).

MDE yönteminde iki tür sistem kullanılmaktadır bunlar: kapalı ve açık kap sistemlerdir. Kapalı sistemde sıcaklık ve basınç kontrolü ile ekstraksiyon prosesi gerçekleştirilir. Açık sistem ise atmosfer basıncının altında çalışılır. Açık sistem sıcaklığa duyarlı bileşenlerin ekstraksiyonunda daha uygundur (Chan ve diğ., 2011).



Şekil 18. MDE sisteminin şematik görünümü ((a) Kapalı tip mikrodalga sistemi ve (b) Açık tip mikrodalga sistemi) (Chan ve diğ., 2011).

Ekstraksiyon prosesi toz halindeki zerdeçaldan 0.2 g alınarak teflon kaba konulduktan sonra beş farklı NADES ile modellemede belirtilen koşullar altında gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyondan sonra, ekstraktlar bir filtre kağıdından ve daha sonra 0.45 μm selüloz filtreden geçirildikten sonra tüplere konularak analize kadar +4°C ' de buzdolabında saklanmıştır.

Toplam her bir NADES için 20 ekstraksiyon yapılmıştır. Tablo 5'de zerdeçala uygulanan MAE deney planı verilmiştir.

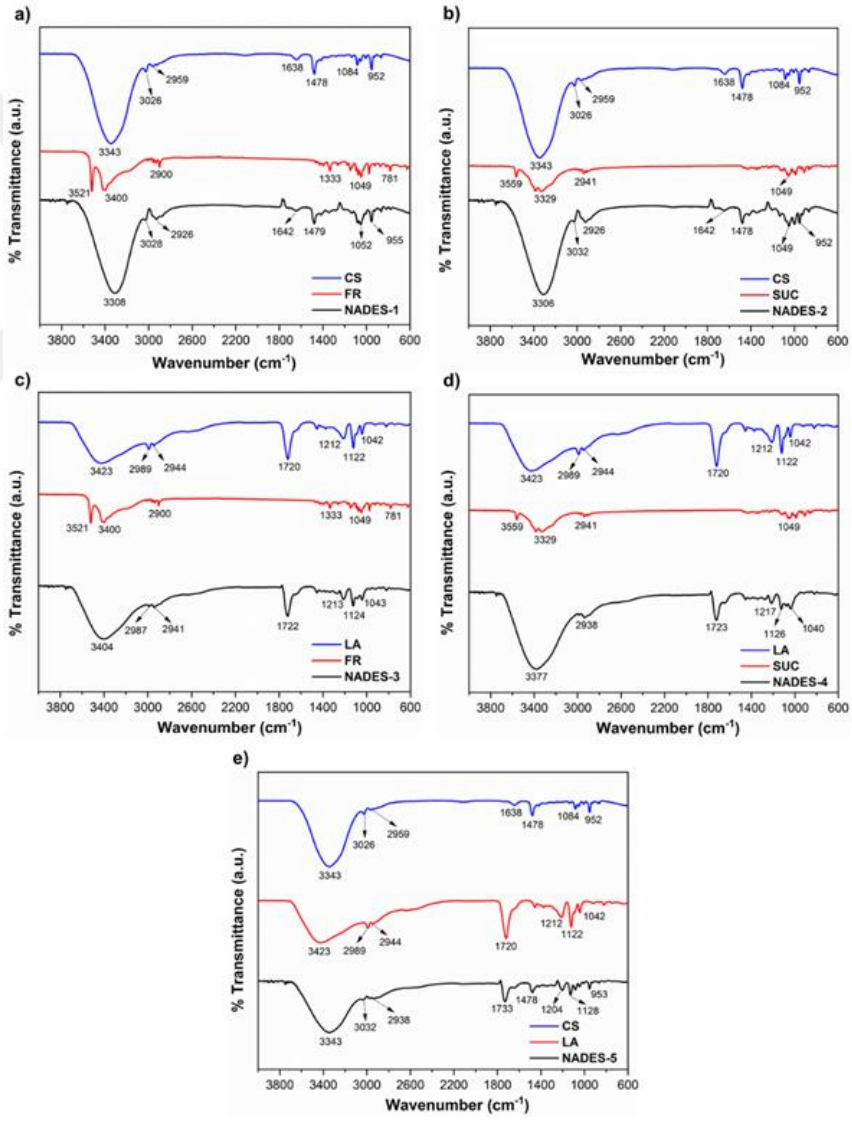
Tablo 5. Zerdeçala uygulanan MDE yönteminin deney planı.

Örnekler	**Sıcaklık (ºC)**	**Çözücü hacmi (ml)**	**Zaman(dakika)**
1	45	10	5
2	75	10	5
3	45	10	30
4	75	10	30
5	45	20	5
6	75	20	5
7	45	20	30
8	75	20	30
9	45	15	17.5
10	75	15	17.5
11	60	15	5
12	60	15	30
13	60	10	17.5
14	60	20	17.5
15	60	15	17.5
16	60	15	17.5
17	60	15	17.5
18	60	15	17.5
19	60	15	17.5
20	60	15	17.5

4.BULGULAR

4.1. NADES'LERİN KARAKTERİZASYONU

Tez Çalışmasının bir parçası olarak, yeni nesil yeşil çözücüler arasında yer alan Doğal Derin Ötektik Çözücüler (NADES), ekstraksiyon işlemlerinde çözücü faz oluşturmak için kullanılmıştır. Beş farklı NADES'in yapılarını aydınlatmak ve kanıtlamak için FTIR analizleri yapılmıştır. Ayrıca, çözücülerin fiziksel ve reolojik özelliklerini belirlemek için de ölçümler yapılmıştır. Şekil 19'da, hazırlanan NADES'lerin ve saf bileşenlerin FTIR spektrumlarını gösterilmiştir.



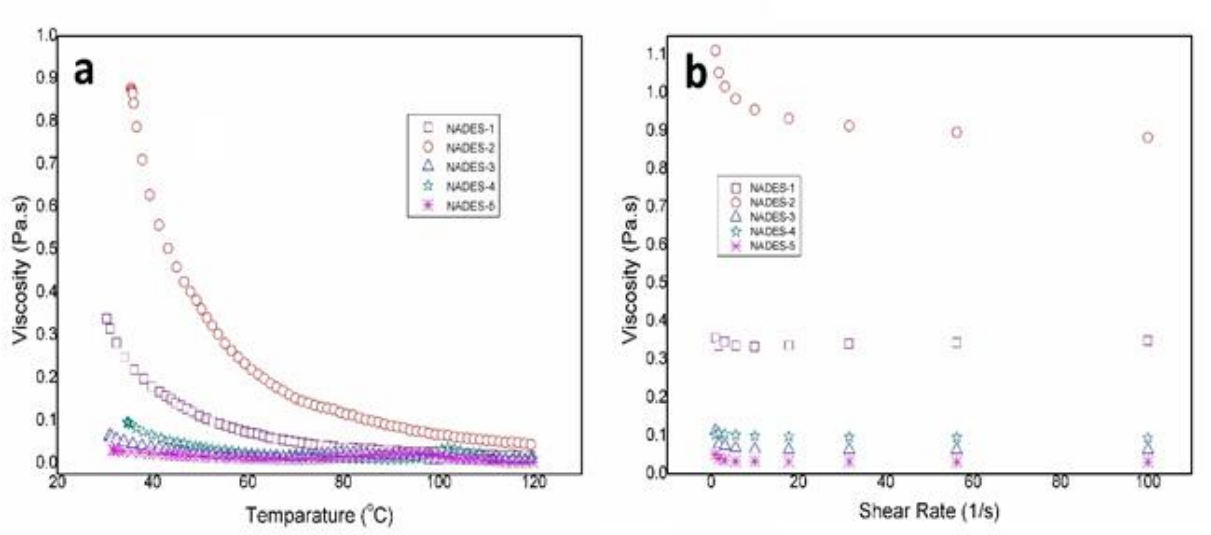
Şekil 19. NADES'in ve bileşenlerinin FTIR spektrumları; a) NADES-1, b)NADES-2, c)NADES-3, d)NADES-4 ve e) NADES-5.

Ötektik karışımların g/cm^3 cinsinden yoğunlukları Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6. 25 ^oC'de NADES'lerin yoğunlukları.

Çözücü kodu	NADES-1	NADES-2	NADES-3	NADES-4	NADES-5
Yoğunluk (g/cm^3)	1.2078	1.2269	1.2365	1.2983	1.1380

Şekil 20 a ve b'de sırasıyla çalışmada kullanılan NADES'lerin viskoziteleri ve gerilme-gevşeme eğrileri gösterilmiştir.



Şekil 20. Sıcaklığın (a) ve kayma hızının (b) pn deneysel dinamik viskoziteye etkisi.

4.2. NADES'LER KULLANILARAK TROLOKS İÇİN CUPRAC YÖNTEMİ İLE ELDE EDİLEN KALİBRASYON EĞRİLERİ

Ekstraktların toplam antioksidan kapasitesi, troloksun kalibrasyon eğrisinden elde edilen eğim değerine dayanan bir troloks (TR) eşdeğeri (mmol TR/g-DS) olarak ifade edilmektedir. İlgili ekstrakların toplam antioksidan kapasitelerini hesaplamak için her NADES için TR kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur. Elde edilen kalibrasyon eğrilerinin doğru denklemleri, korelasyon katsayıları ve lineer çalışma aralıkları Tablo 7'de gösterilmiştir.

Tablo 7. Troloks'un farklı NADES ortamlarında CUPRAC yöntemi ile elde edilen doğru denklemleri, korelasyon katsayıları ve lineer çalışma aralıkları.

NADES	Doğru denklemi	Korelasyon Katsayısı	Lineer Çalışma Aralığı (µM)
NADES-1	A = 6677C - 0.0144	r = 0.9995	9.65 – 181.88
NADES-2	A = 6373C - 0.0335	r = 0.9993	13.10 – 193.55
NADES-3	A = 7249C + 0.0117	r = 0.9997	5.28 – 163.93
NADES-4	A = 7315C + 0.0285	r = 0.9996	2.93 – 160.15
NADES-5	A = 6681C - 0.0104	r = 0.9997	9.04 – 195.18

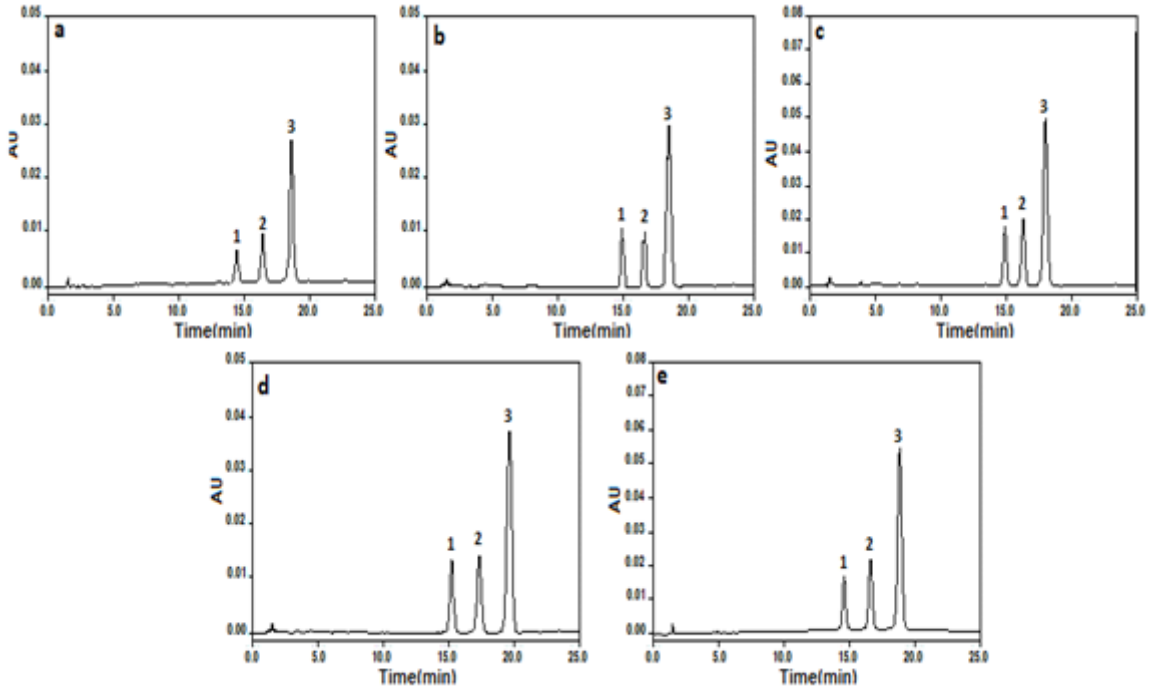
A: Absorbans; C: Molar knsantrasyon; r: Korelasyon katsayısı.

4.3. KURKUMİNİN FARKLI NADES ORTAMLARINDA HPLC İLE ELDE EDİLEN KALİBRASYONLARI VE ZERDEÇAL EKSTRAKTLARIININ HPLC ANALİZİ

Kurkumin için elde edilen doğru denklemleri ve korelasyon katsayıları Tablo 8'de gösterilmiştir. Ayrıca, Şekil 21'de 425 nm'de NADES'ler ile zerdeçal ekstraktlarının HPLC kromatogramları gösterilmiştir.

Tablo 8. Kurkumin'in farklı NADES ortamlarında HPLC yöntemi ile elde edilen doğru denklemleri ve korelasyon katsayıları.

NADES	Doğru denklemi	Korelasyon katsayısı
NADES-1	$A = 1.49x10^{10}C - 40397$	r = 0.9981
NADES-2	$A = 1.41x10^{10}C + 17773$	r = 0.9999
NADES-3	$A = 1.97x10^{10}C - 82392$	r = 0.9981
NADES-4	$A = 1.49x10^{10}C - 13641$	r = 0.9993
NADES-5	$A = 2.10x10^{10}C + 29294$	r = 0.9996



Şekil 21. 425 nm'de NADES'ler (a-NADES-1; b-NADES-2; c-NADES-3; d-NADES-4; e-NADES-5) ile zerdeçal ekstraktlarının HPLC kromatogramları: (1) bis-demetoksikurkumin (BDCC), demetoksikurkumin ve (3) kurkumin.

4.4 İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

4.4.1. MDE'nin optimizasyonu ve modellenmesi

Bu çalışmada, Yüz Merkezli kompozit tasarım (FCDD) (Design-Expert® Software Version 11 (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, USA)) MDE işleminde üç değişkenin (ekstraksiyon sıcaklığı (°C), ekstraksiyon süresi (dakika) ve çözücü-katı oranının (mL/g-DS) iki yanıt (toplam antioksidan kapasite (TAC) ve kurkumin içeriği (CC)) üzerindeki etkisini araştırmak ve optimal koşulları belirlemek için kullanılmıştır. Tablo 9'da MDE optimizasyonunda kullanılan bağımsız değişkenler ve onların değerleri gösterilmiştir. Tablo 5'te sunulan deneysel plan, Design-Expert programından elde edilmiştir.

Tablo 9. RSM optimizasyonunda kullanılan bağımsız değişkenler ve onların değerleri.

Faktörler	**Birimler**	**Değişkenlerin sembolü**	**Seviyeler**		
			-1	**0**	**1**
Ekstraksiyon sıcaklığı	℃	X_1	45	60	75
Ekstraksiyon süresi	dakika	X_2	5	17.5	30
Çözücü-katı oranı	mL/0.2 g	X_3	10	15	20

Deneysel sekans, dış etkenlere bağlı yanıtlardaki beklenmedik varyasyonların etkilerini en aza indirmek için rastgele dağıtılmıştır. Bağımsız değişkenlere verilen yanıtları ilişkilendiren deneysel bir model geliştirmek için ikinci dereceden bir polinomial denklem kullanılmıştır. Genel bir ikinci dereceden polinomial denklem Denk.1'de görülmektedir.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^{k} \beta_i x_i + \sum_{i=1}^{k} \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=2}^{k} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \qquad \text{(Denk. 1)}$$

Burada Y yanıttır; X bağımsız değişkendir; β_0 model kesişme katsayısıdır; β_i. β_{ii}. β_{ij} etkileşim katsayılarıdır; k bağımsız faktörlerin sayısıdır; ve Ɛ deneysel hatadır.

Faktörler ve yanıtlar arasındaki ilişki, Design-Expert programında varyans analizi (ANOVA) testi kullanılarak kurulmuştur. Tablo 10-14'te NADES'ler için MDE işleminde FCCD bağımsız faktörleri (X_1, X_2 ve X_3), ayrıca TAC (mmol TR/g-DS) ve CC (mg/g-DS) yanıtları için elde edilen deneysel sonuçlar gösterilmiştir.

Tablo 10. NADES-1 için MDE işleminde FCCD bağımsız faktörleri (X_1, X_2 ve X_3), TAC (mmol TR/g-DS) ve CC (mg/g-DS) için deneysel sonuçlar gösterilmiştir.

	Bağımsız Faktörler			**Yanıtlar**	
No	**X_1**	**X_2**	**X_3**	**NADES-1**	
				TAC	**CC**
1	75	5	10	0.084	11.99
2	75	5	20	0.089	12.45
3	60	5	15	0.081	11.77
4	75	30	20	0.091	13.07
5	60	17.5	15	0.094	13.83
6	60	17.5	15	0.091	13.83
7	60	17.5	15	0.093	13.87
8	45	30	10	0.069	9.88
9	60	17.5	20	0.089	13.22
10	75	30	10	0.086	13.22
11	60	17.5	15	0.093	13.83
12	60	17.5	10	0.084	12.07
13	45	5	20	0.068	9.98
14	45	5	10	0.062	9.51
15	75	17.5	15	0.094	13.43
16	60	17.5	15	0.096	13.84
17	60	17.5	15	0.094	13.89
18	45	30	20	0.071	10.28
19	45	17.5	15	0.072	10.28
20	60	30	15	0.092	13.38

Tablo 11. NADES-2 için MDE işleminde FCCD bağımsız faktörleri (X_1, X_2 ve X_3), TAC (mmol TR/g-DS) ve CC (mg/g-DS) için deneysel sonuçlar gösterilmiştir.

	Bağımsız Faktörler			**Yanıtlar**	
No	**X_1**	**X_2**	**X_3**	**NADES-2**	
				TAC	**CC**
1	75	5	10	0.084	11.99
2	75	5	20	0.089	12.45
3	60	5	15	0.081	11.77
4	75	30	20	0.091	13.07
5	60	17.5	15	0.094	13.83
6	60	17.5	15	0.091	13.83
7	60	17.5	15	0.093	13.87
8	45	30	10	0.069	9.88
9	60	17.5	20	0.089	13.22
10	75	30	10	0.086	13.22
11	60	17.5	15	0.093	13.83
12	60	17.5	10	0.084	12.07
13	45	5	20	0.068	9.98
14	45	5	10	0.062	9.51
15	75	17.5	15	0.094	13.43
16	60	17.5	15	0.096	13.84
17	60	17.5	15	0.094	13.89
18	45	30	20	0.071	10.28
19	45	17.5	15	0.072	10.28
20	60	30	15	0.092	13.38

Tablo 12. NADES-3 için MDE işleminde FCCD bağımsız faktörleri (X_1, X_2 ve X_3), TAC (mmol TR/g-DS) ve CC (mg/g-DS) için deneysel sonuçlar gösterilmiştir.

	Bağımsız Faktörler			**Yanıtlar**	
No	**X_1**	**X_2**	**X_3**	**NADES-3**	
				TAC	**CC**
1	75	5	10	0.174	20.03
2	75	5	20	0.179	20.28
3	60	5	15	0.168	22.98
4	75	30	20	0.189	21.56
5	60	17.5	15	0.198	23.98
6	60	17.5	15	0.195	24.35
7	60	17.5	15	0.194	24.06
8	45	30	10	0.146	14.23
9	60	17.5	20	0.192	24.49
10	75	30	10	0.181	20.96
11	60	17.5	15	0.197	25.18
12	60	17.5	10	0.179	22.05
13	45	5	20	0.142	13.99
14	45	5	10	0.136	14.06
15	75	17.5	15	0.192	21.85
16	60	17.5	15	0.196	22.58
17	60	17.5	15	0.195	25.03
18	45	30	20	0.161	14.82
19	45	17.5	15	0.167	16.28
20	60	30	15	0.178	23.79

Tablo 13. NADES-4 için MDE işleminde FCCD bağımsız faktörleri (X_1, X_2 ve X_3), TAC (mmol TR/g-DS) ve CC (mg/g-DS) için deneysel sonuçlar gösterilmiştir.

	Bağımsız Faktörler			**Yanıtlar**	
No	**X_1**	**X_2**	**X_3**	**NADES-4**	
				TAC	**CC**
1	75	5	10	0.157	27.43
2	75	5	20	0.151	26.43
3	60	5	15	0.152	27.53
4	75	30	20	0.141	24.85
5	60	17.5	15	0.161	31.36
6	60	17.5	15	0.159	31.76
7	60	17.5	15	0.16	31.65
8	45	30	10	0.124	17.03
9	60	17.5	20	0.141	27.53
10	75	30	10	0.146	26.46
11	60	17.5	15	0.159	31.44
12	60	17.5	10	0.153	26.36
13	45	5	20	0.111	18.02
14	45	5	10	0.112	18.29
15	75	17.5	15	0.16	30.75
16	60	17.5	15	0.161	31.97
17	60	17.5	15	0.163	30.73
18	45	30	20	0.114	18.49
19	45	17.5	15	0.121	20.09
20	60	30	15	0.161	28.32

Tablo 14. NADES-5 için MDE işleminde FCCD bağımsız faktörleri (X_1, X_2 ve X_3), TAC (mmol TR/g-DS) ve CC (mg/g-DS) için deneysel sonuçlar gösterilmiştir.

	Bağımsız Faktörler			**Yanıtlar**	
No	**X_1**	**X_2**	**X_3**	**NADES-5**	
				TAC	**CC**
1	75	5	10	0.141	21.12
2	75	5	20	0.145	21.67
3	60	5	15	0.166	20.16
4	75	30	20	0.157	22.81
5	60	17.5	15	0.177	22.01
6	60	17.5	15	0.181	22.24
7	60	17.5	15	0.179	22.71
8	45	30	10	0.098	17.84
9	60	17.5	20	0.172	20.91
10	75	30	10	0.156	21.99
11	60	17.5	15	0.177	21.82
12	60	17.5	10	0.169	21.14
13	45	5	20	0.098	17.68
14	45	5	10	0.083	15.66
15	75	17.5	15	0.168	23.18
16	60	17.5	15	0.1768	21.66
17	60	17.5	15	0.177	22.05
18	45	30	20	0.089	18.26
19	45	17.5	15	0.093	18.72
20	60	30	15	0.164	20.88

Tablo 15-19 ikinci dereceden modelin regresyon parametrelerine ilişkin varyans analiz sonuçları görülmektedir.

Tablo 15. NADES-1 için yapılan varyans analizi (ANOVA).

	Karelerin toplamı	**df**	**Ortalama kare**	**F değeri**	**p- değeri**
Model (TAC)	0.0020	9	0.0002	31.66	< 0.0001
X_1- Ekstraksiyon sıcaklığı	0.0010	1	0.0010	146.07	< 0.0001
X_2- Ekstraksiyon süresi	0.0001	1	0.0001	8.77	0.0142
X_3- Katı-Sıvı oranı	0.0001	1	0.0001	7.43	0.0214
X_1X_2	4.5×10^{-6}	1	4.5×10^{-6}	0.6318	0.4452
X_1X_3	5.0×10^{-7}	1	5.0×10^{-7}	0.0702	0.7964
X_2X_3	2.0×10^{-6}	1	2.0×10^{-6}	0.2808	0.6077
X_1^2	0.0002	1	0.0002	21.19	0.0010
X_2^2	0.0000	1	0.0000	5.90	0.0355
X_3^2	0.0000	1	0.0000	5.90	0.0355
Kalıntı	0.0001	10	7.123×10^{-6}		
Uyum eksikliği	0.0001	5	0.0000	4.28	0.0684
Saf Hata	0.0000	5	2.7×10^{-6}		
Toplam	0.0021	19			
Model (CC)	43.72	9	4.86	21.01	< 0.0001
X_1- Ekstraksiyon sıcaklığı	18.88	1	18.88	81.67	< 0.0001
X_2- Ekstraksiyon süresi	1.32	1	1.32	5.73	0.0377
X_3- Katı-Sıvı oranı	0.7952	1	0.7952	3.44	0.0933
X_1X_2	0.0595	1	0.0595	0.2574	0.6229
X_1X_3	0.0006	1	0.0006	0.0026	0.9600
X_2X_3	0.0045	1	0.0045	0.0195	0.8917
X_1^2	4.78	1	4.78	20.66	0.0011
X_2^2	0.9825	1	0.9825	4.25	0.0662
X_3^2	0.7659	1	0.7659	3.31	0.0987
Kalıntı	2.31	10	0.2312		
Doğrunun Uyumsuzluğu	2.31	5	0.4617	703.07	< 0.0001
Saf Hata	0.0033	5	0.0007		
Düzeltilmiş Toplam	46.03	19			

Tablo 16. NADES-2 için yapılan varyans analizi (ANOVA).

	Karelerin toplamı	**df**	**Ortalama kare**	**F değeri**	**p- değeri**
Model (TAC)	0.0020	9	0.0002	31.66	< 0.0001
X_1- Ekstraksiyon sıcaklığı	0.0010	1	0.0010	146.07	< 0.0001
X_2- Ekstraksiyon süresi	0.0001	1	0.0001	8.77	0.0142
X_3- Katı-Sıvı oranı	0.0001	1	0.0001	7.43	0.0214
X_1X_2	4.5×10^{-6}	1	4.5×10^{-6}	0.6318	0.4452
X_1X_3	5.0×10^{-7}	1	5.0×10^{-7}	0.0702	0.7964
X_2X_3	2.0×10^{-6}	1	2.0×10^{-6}	0.2808	0.6077
X_1^2	0.0002	1	0.0002	21.19	0.0010
X_2^2	0.0000	1	0.0000	5.90	0.0355
X_3^2	0.0000	1	0.0000	5.90	0.0355
Kalıntı	0.0001	10	7.123×10^{-6}		
Uyum eksikliği	0.0001	5	0.0000	4.28	0.0684
Saf Hata	0.0000	5	2.7×10^{-6}		
Toplam	0.0021	19			
Model (CC)	43.72	9	4.86	21.01	< 0.0001
X_1- Ekstraksiyon sıcaklığı	18.88	1	18.88	81.67	< 0.0001
X_2- Ekstraksiyon süresi	1.32	1	1.32	5.73	0.0377
X_3- Katı-Sıvı oranı	0.7952	1	0.7952	3.44	0.0933
X_1X_2	0.0595	1	0.0595	0.2574	0.6229
X_1X_3	0.0006	1	0.0006	0.0026	0.9600
X_2X_3	0.0045	1	0.0045	0.0195	0.8917
X_1^2	4.78	1	4.78	20.66	0.0011
X_2^2	0.9825	1	0.9825	4.25	0.0662
X_3^2	0.7659	1	0.7659	3.31	0.0987
Kalıntı	2.31	10	0.2312		
Doğrunun Uyumsuzluğu	2.31	5	0.4617	703.07	< 0.0001
Saf Hata	0.0033	5	0.0007		
Düzeltilmiş Toplam	46.03	19			

Tablo 17. NADES-3 için yapılan varyans analizi (ANOVA).

	Karelerin toplamı	**df**	**Ortalama kare**	**F değeri**	**p- değeri**
Model (TAC)	0.0069	9	0.0008	40.35	< 0.0001
X_1- Ekstraksiyon sıcaklığı	0.0027	1	0.0027	140.56	< 0.0001
X_2- Ekstraksiyon süresi	0.0003	1	0.0003	16.59	0.0022
X_3- Katı-Sıvı oranı	0.0002	1	0.0002	11.69	0.0066
X_1X_2	0.0000	1	0.0000	0.9522	0.3522
X_1X_3	8.0×10^{-6}	1	8.0×10^{-6}	0.4232	0.5300
X_2X_3	0.0000	1	0.0000	0.9522	0.3522
X_1^2	0.0003	1	0.0003	14.81	0.0032
X_2^2	0.0008	1	0.0008	40.05	< 0.0001
X_3^2	0.0000	1	0.0000	2.43	0.1497
Kalıntı	0.0002	10	7.123×10^{-6}		
Uyum eksikliği	0.0002	5	0.0000	16.45	0.0040
Saf Hata	0.0000	5	2.7×10^{-6}		
Toplam	0.0071	19			
Model (CC)	291.54	9	32.39	45.46	< 0.0001
X_1- Ekstraksiyon sıcaklığı	97.97	1	97.97	140.51	< 0.0001
X_2- Ekstraksiyon süresi	1.62	1	1.62	2.32	0.1589
X_3- Katı-Sıvı oranı	1.45	1	1.45	2.08	0.1796
X_1X_2	0.1830	1	0.1830	0.2625	0.6195
X_1X_3	0.0136	1	0.0136	0.0195	0.8917
X_2X_3	0.1275	1	0.1275	0.1829	0.6780
X_1^2	71.08	1	71.08	101.95	< 0.0001
X_2^2	1.61	1	1.61	2.30	0.1601
X_3^2	2.13	1	2.13	3.05	0.1114
Kalıntı	6.97	10	0.0756		
Doğrunun Uyumsuzluğu	2.10	5	0.1121	0.4303	0.8119
Saf Hata	4.87	5	0.0392		
Düzeltilmiş Toplam	298.51	19			

Tablo 18. NADES-4 için yapılan varyans analizi (ANOVA).

	Karelerin toplamı	**df**	**Ortalama kare**	**F değeri**	**p- değeri**
Model (TAC)	0.0063	9	0.0007	53.26	< 0.0001
X_1- Ekstraksiyon sıcaklığı	0.0030	1	0.0030	225.97	< 0.0001
X_2- Ekstraksiyon süresi	9.0×10^{-7}	1	9.0×10^{-7}	0.068	0.7996
X_3- Katı-Sıvı oranı	0.0001	1	0.0001	8.73	0.0144
X_1X_2	0.0002	1	0.0002	12.23	0.0058
X_1X_3	0.0000	1	0.0000	0.0000	1.00
X_2X_3	8.0×10^{-6}	1	8.0×10^{-6}	0.604	0.455
X_1^2	0.0008	1	0.0008	58.10	< 0.0001
X_2^2	1.455×10^{-6}	1	1.455×10^{-6}	0.1098	0.7472
X_3^2	0.0003	1	0.0003	21.72	0.0009
Kalıntı	0.0001	10	0.0000		
Uyum eksikliği	0.0001	5	0.0000	10.52	0.011
Saf Hata	0.0000	5	2.3×10^{-6}		
Toplam	0.0065	19			
Model (CC)	488.33	9	54.26	41.86	< 0.0001
X_1- Ekstraksiyon sıcaklığı	186.54	1	186.54	143.90	< 0.0001
X_2- Ekstraksiyon süresi	0.6503	1	0.6503	0.5016	0.4950
X_3- Katı-Sıvı oranı	0.0062	1	0.0062	0.0048	0.9460
X_1X_2	0.3872	1	0.3872	0.2987	0.5967
X_1X_3	1.81	1	1.81	1.39	0.2653
X_2X_3	0.1568	1	0.1568	0.121	0.7352
X_1^2	45.33	1	45.33	34.97	0.0001
X_2^2	10.56	1	10.56	8.15	0.0171
X_3^2	23.77	1	23.77	18.34	0.0016
Kalıntı	12.96	10	1.30		
Doğrunun Uyumsuzluğu	12.04	5	2.41	13.00	0.0068
Saf Hata	0.9257	5	0.1851		
Düzeltilmiş Toplam	501.29	19			

Tablo 19. NADES-5 için yapılan varyans analizi (ANOVA).

	Karelerin toplamı	**df**	**Ortalama kare**	**F değeri**	**p- değeri**
Model (TAC)	0.0230	9	0.0026	90.94	< 0.0001
X_1- Ekstraksiyon sıcaklığı	0.0094	1	0.0094	332.50	< 0.0001
X_2- Ekstraksiyon süresi	0.0001	1	0.0001	3.41	0.0945
X_3- Katı-Sıvı oranı	0.0000	1	0.0000	0.6960	0.4236
X_1X_2	0.0001	1	0.0001	1.96	0.1920
X_1X_3	1.25×10^{-7}	1	1.25×10^{-7}	0.0044	0.9482
X_2X_3	0.0001	1	0.0001	3.24	0.1022
X_1^2	0.0052	1	0.0052	185.09	< 0.0001
X_2^2	0.0002	1	0.0002	7.97	0.0180
X_3^2	0.0000	1	0.0000	1.22	0.2950
Kalıntı	0.0003	10	0.0000		
Uyum eksikliği	0.0003	5	0.0001	18.51	0.0031
Saf Hata	0.0000	5	2.887×10^{-6}		
Toplam	0.0233	19			
Model (CC)	76.14	9	8.46	33.91	< 0.0001
X_1- Ekstraksiyon sıcaklığı	51.12	1	51.12	204.93	< 0.0001
X_2- Ekstraksiyon süresi	3.01	1	3.01	12.08	0.0060
X_3- Katı-Sıvı oranı	1.28	1	1.28	5.14	0.0468
X_1X_2	0.0703	1	0.0703	0.2819	0.6071
X_1X_3	0.01431	1	0.01431	0.5737	0.4663
X_2X_3	0.2211	1	0.2211	0.8864	0.3686
X_1^2	1.20	1	1.20	4.80	0.0532
X_2^2	3.27	1	3.27	13.10	0.0047
X_3^2	0.9411	1	0.9411	3.77	0.0808
Kalıntı	2.49	10	0.2495		
Doğrunun Uyumsuzluğu	1.82	5	0.3645	2.71	0.1489
Saf Hata	0.6723	5	0.1345		
Düzeltilmiş Toplam	78.63	19			

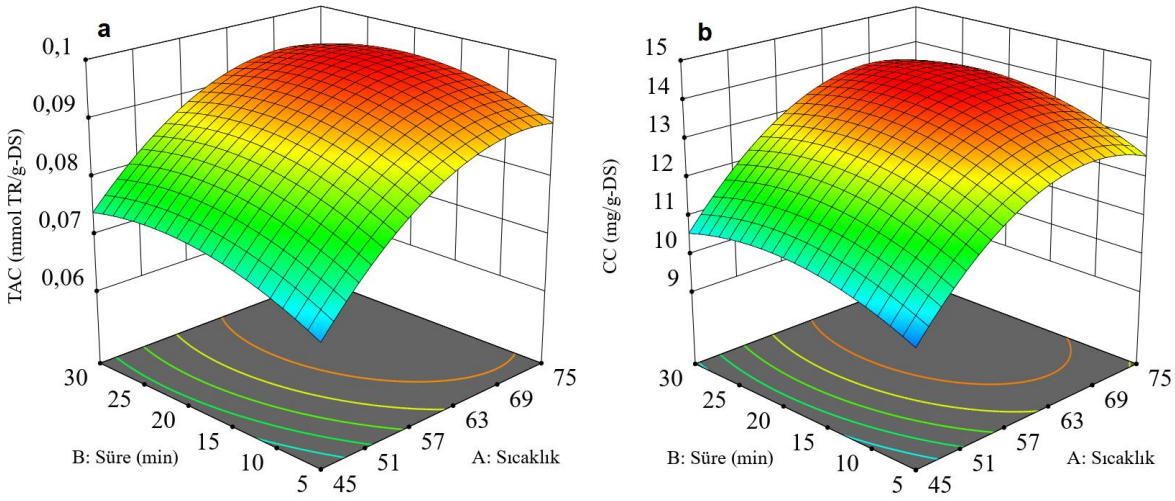
Kullanılan NADES'ler ile önerilen modeller için her yanıtın tahmini R^2, düzeltilmiş R^2 ve yeterli hassasiyet değerleri Tablo 16'da özetlenmiştir.

Tablo 20. Önerilen modeller için her yanıtın tahmini R^2, düzeltilmiş R^2 ve yeterli hassasiyet değerleri.

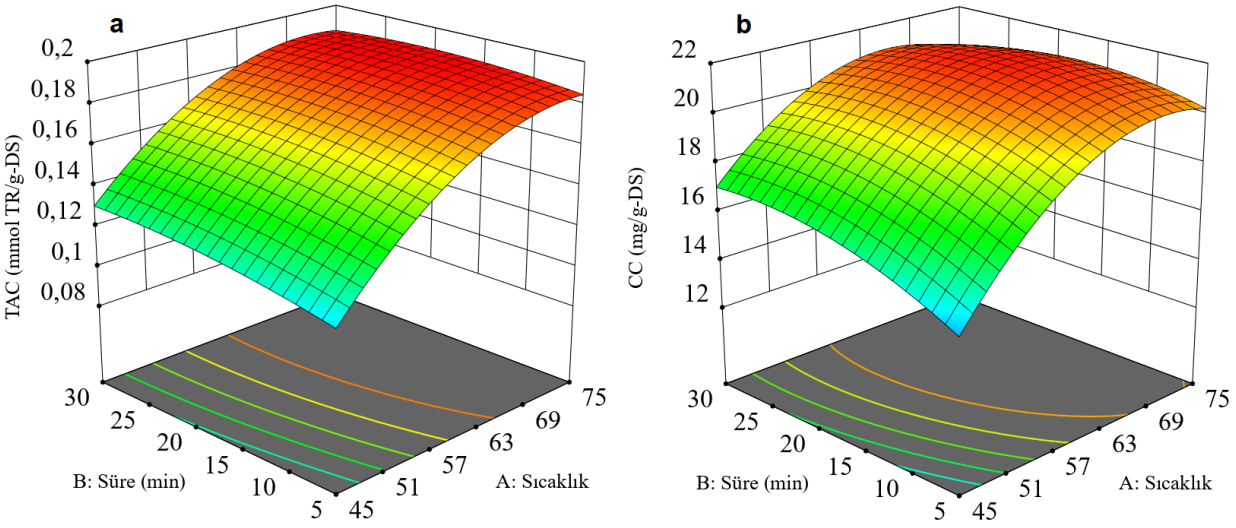
Yanıt		**Tahmini R²**	**Düzeltilmiş R^2_a**	**Yeterli hassasiyet**
NADES-1	**TAC**	0.8174	0.9356	18.026
	CC	0.7279	0.9046	13.135
NADES-2	**TAC**	0.8449	0.9421	19.453
	CC	0.7598	0.9454	19.998
NADES-3	**TAC**	0.8574	0.9491	21.007
	CC	0.9242	0.9556	17.481
NADES-4	**TAC**	0.8423	0.9612	20.500
	CC	0.8504	0.9509	17.592
NADES-5	**TAC**	0.8813	0.9771	24.540
	CC	0.7558	0.9397	21.230

4.5. EKSTRAKSİYON KOŞULLARININ MDE ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

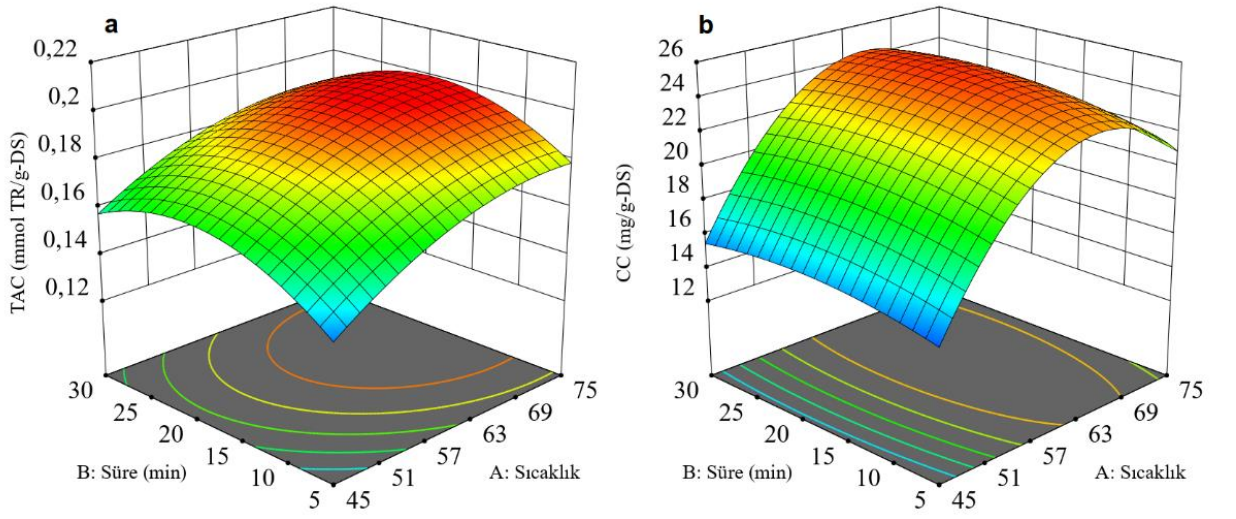
Şekil 22-26, ekstraksiyon sıcaklığı ve süresinin zerdeçaldan antioksidanların (TAC) ve kurkuminin (CC) ekstraksiyonuna etkisinin üç boyutlu grafiklerini göstermektedir.



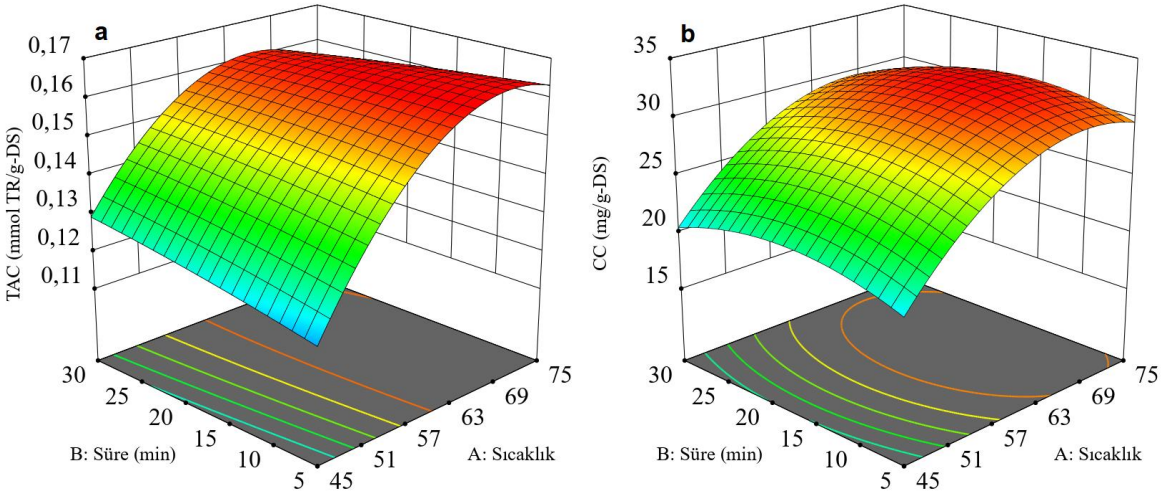
Şekil 22. NADES-1 ile zerdeçaldan antioksidanların ve kurkuminin ekstraksiyonuna ekstraksiyon sıcaklığı ve süresinin etkilerini gösteren 3D grafik.



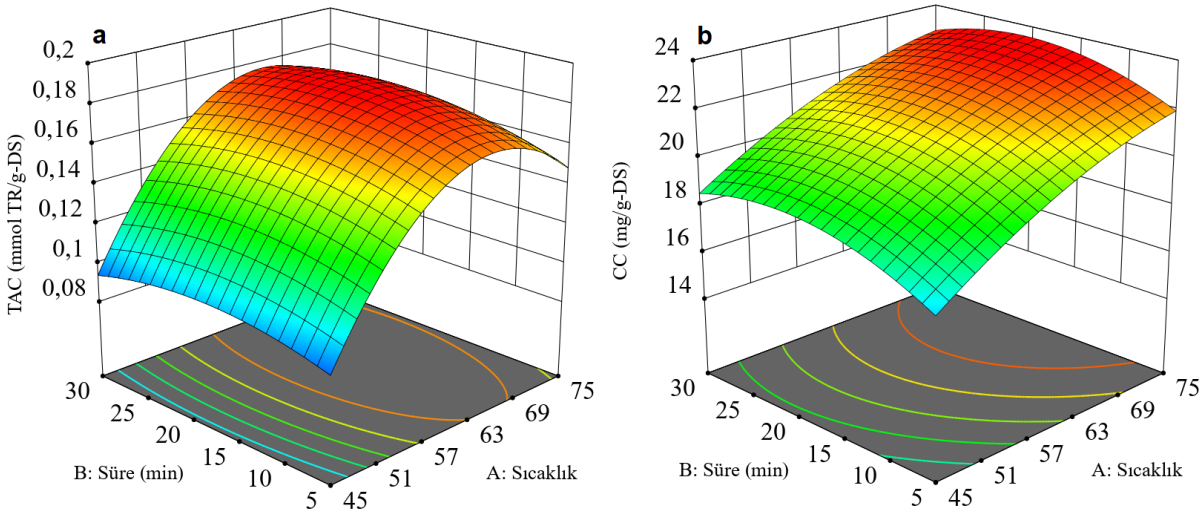
Şekil 23. NADES-2 ile zerdeçaldan antioksidanların ve kurkuminin ekstraksiyonuna ekstraksiyon sıcaklığı ve süresinin etkilerini gösteren 3D grafik.



Şekil 24. NADES-3 ile zerdeçaldan antioksidanların ve kurkuminin ekstraksiyonuna ekstraksiyon sıcaklığı ve süresinin etkilerini gösteren 3D grafik.

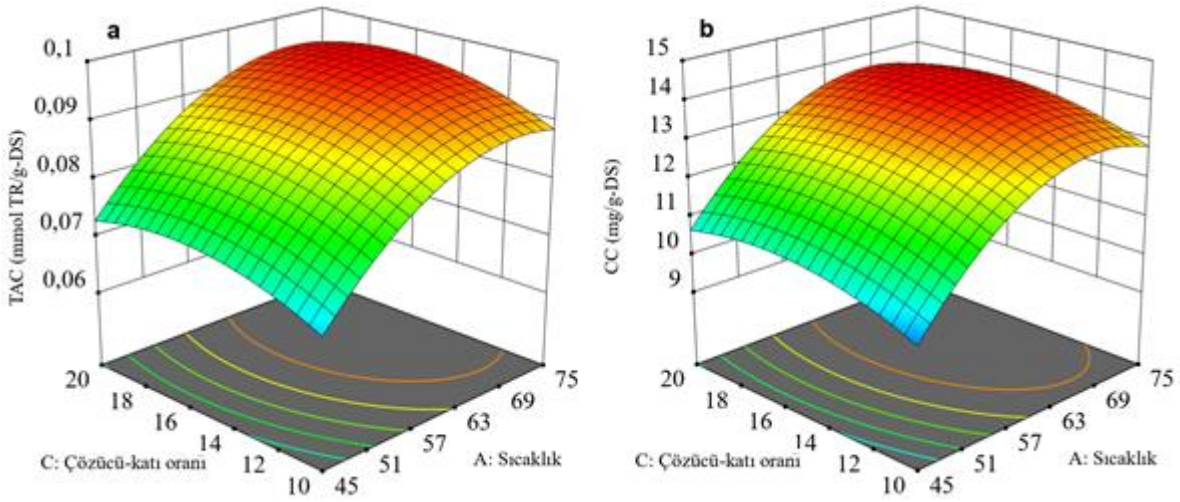


Şekil 25. NADES-4 ile zerdeçaldan antioksidanların ve kurkuminin ekstraksiyonuna ekstraksiyon sıcaklığı ve süresinin etkilerini gösteren 3D grafik.

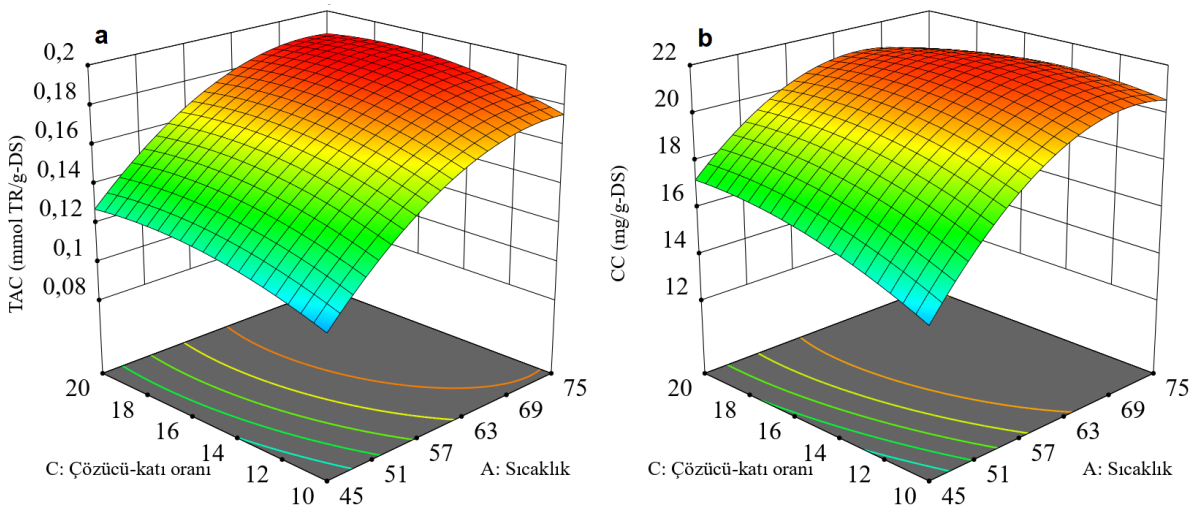


Şekil 26. NADES-5 ile zerdeçaldan antioksidanların ve kurkuminin ekstraksiyonuna ekstraksiyon sıcaklığı ve süresinin etkilerini gösteren 3D grafik.

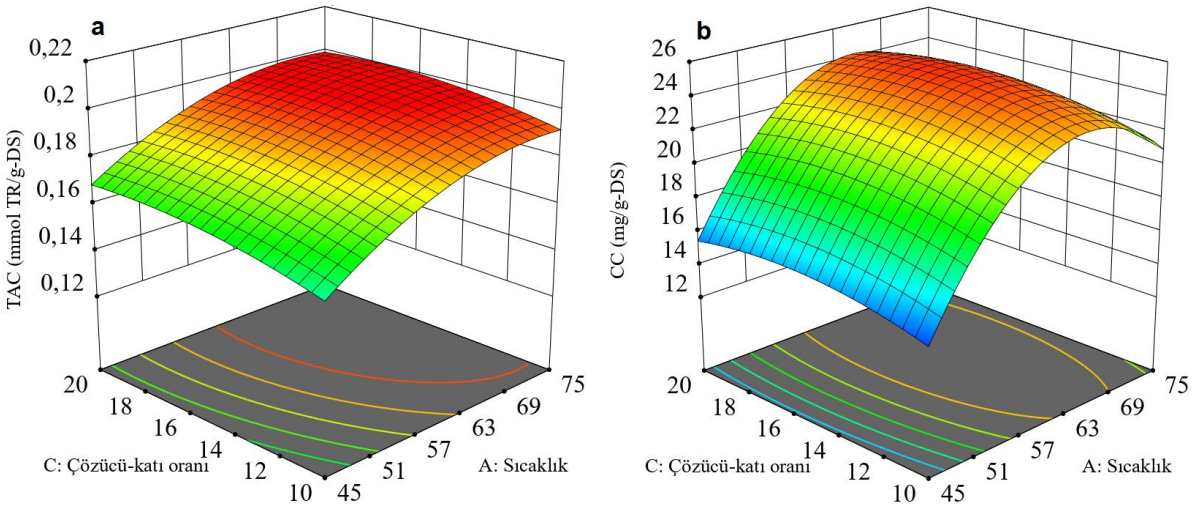
Şekil 27-31, ekstraksiyon sıcaklığı ve çözücü-katı oranının zerdeçaldan antioksidanların (TAC) ve kurkuminin (CC) ekstraksiyonuna etkisinin üç boyutlu grafiklerini göstermektedir.



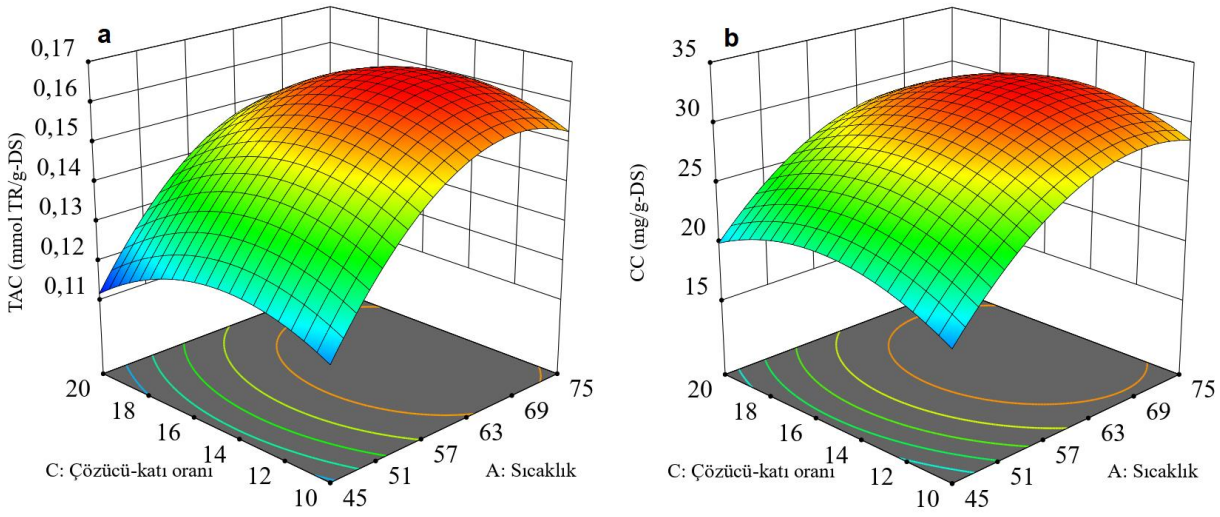
Şekil 27. NADES-1 ile zerdeçaldan antioksidanların ve kurkuminin ekstraksiyonuna ekstraksiyon sıcaklığı ve çözücü-katı oranının etkilerini gösteren 3D grafik.



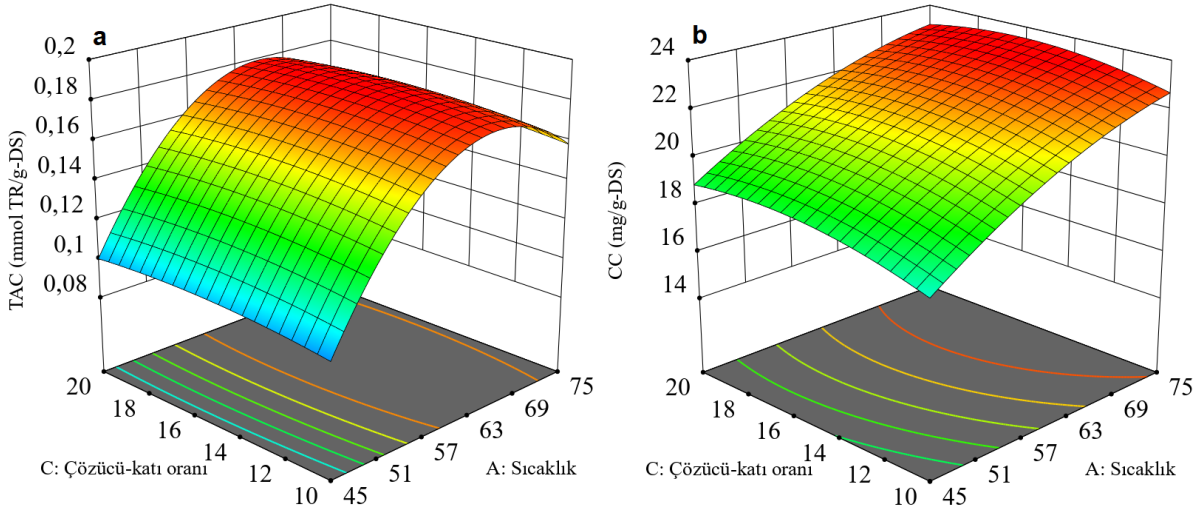
Şekil 28. NADES-2 ile zerdeçaldan antioksidanların ve kurkuminin ekstraksiyonuna ekstraksiyon sıcaklığı ve çözücü-katı oranının etkilerini gösteren 3D grafik.



Şekil 29. NADES-3 ile zerdeçaldan antioksidanların ve kurkuminin ekstraksiyonuna ekstraksiyon sıcaklığı ve çözücü-katı oranının etkilerini gösteren 3D grafik.



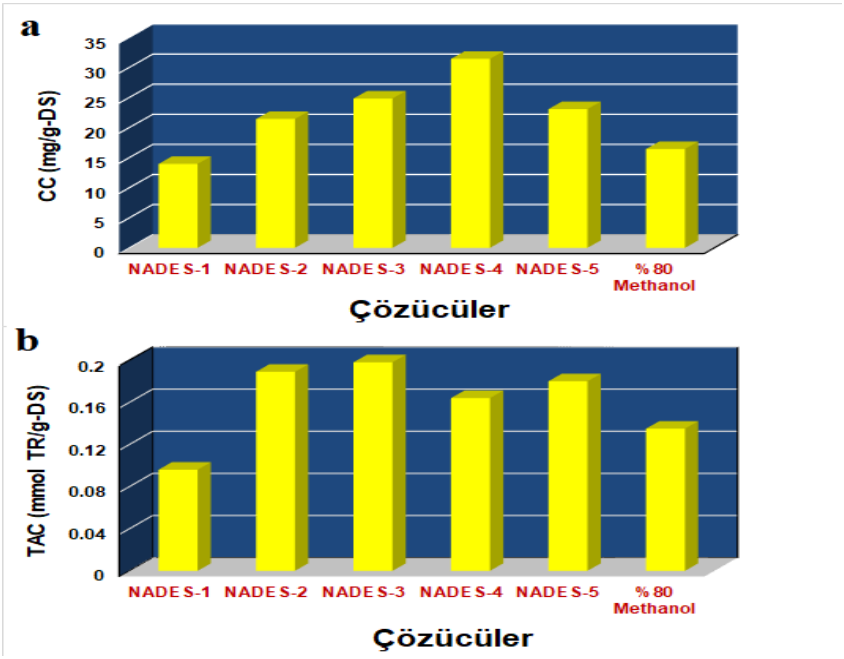
Şekil 30. NADES-4 ile zerdeçaldan antioksidanların ve kurkuminin ekstraksiyonuna ekstraksiyon sıcaklığı ve çözücü-katı oranının etkilerini gösteren 3D grafik.



Şekil 31. NADES-5 ile zerdeçaldan antioksidanların ve kurkuminin ekstraksiyonuna ekstraksiyon sıcaklığı ve çözücü-katı oranının etkilerini gösteren 3D grafik.

4.6. NADES'LER İLE MDE İŞEMİNDE ANTİOKSİDAN VE KURKUMİNİN EKSTRAKSİYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ

Şekil 31'de kullanılan NADES'ler ve %80 metanol:su karışımı ile yapılan MDE işlemi sonucunda zerdeçaldan ekstrakte edilen antioksidanların ve kurkuminin miktarı görülmektedir.



Şekil 32. Çözücü tipinin (a) CC ve (b) TAC üzerindeki etkisi.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez çalışmasında, beş farklı NADES kullanılarak zerdeçaldan kurkumin ve antioksidanların mikrodalga destekli ekstraksiyonu, yüz merkezli bir kompozit tasarım modelleme ile incelenmiş ve optimize edilmiştir. NADES'ler, polifenolik bileşikler için uygun çözücü ortam oluşturabilen NADES bileşenleri olan kolin klorür, laktik asit, fruktoz ve sukrozun ikili kombinasyonları ile hazırlandı ve hazırlanan NADES'lerin, FTIR spektrumları kullanılarak yapıları aydınlatıldı, ayrıca yoğunluk ve viskozite değerleri belirlendi.

Şekil 19'da, hazırlanan NADES'lerin ve saf bileşenlerin FTIR spektrumlarını gösterilmiştir. Bazı fonksiyonel grupların karakteristik absorbans pikleri açıkça görülmektedir: 3650-3100 cm^{-1} aralığında O-H gerilmesi, 3026-2900 cm^{-1} arasında C-H gerilmesi, 1720 cm^{-1}'de karboksilik asit gruplarının C=O gerilmesi, 1638 cm^{-1}'de N-H bükülmesi, 1478 cm^{-1}'de C-H bükülmesi, 1300-1000 cm^{-1} aralığında C–C ve C-O gerilmesi ve 952 cm^{-1} aralığında C-N gerilmesini gösteren bantlar bulunmaktadır (Gabriele ve diğ., 2019; Delgado-Mellado ve diğ., 2018). Şekil 19a ve b'de, NADES-1 ve NADES-2'nin FTIR spektrumları gösterilmiştir. Burada 3343 cm^{-1}'de geniş bir O-H gerdirme bandı gözlemlenirken, bu bant NADES-1 ve NADES-2 spektrumlarında daha düşük frekanslara geçer ve sırasıyla 3308 ve 3306 cm^{-1}'de gözlenir. Bu sonuç, klorür anyonu ve hidroksil grupları arasında güçlü H-bağlarının oluşumuna bağlıdır (Gabriele ve diğ., 2019). Buna ek olarak, 2959 cm^{-1}'de C-H gerdirme bandı ve 1638 cm^{-1}'de N-H bükme bandı, sırasıyla 2926 cm^{-1} ve 1642 cm^{-1}'e kaymıştır. Bu varyasyonlar ayrıca derin ötektik çözücülerin hazırlanması sırasında kolin klorür ve şekerler (fruktoz ve sukroz) arasında H-bağlarının oluşumunu da gösterir (Delgado-Mellado ve diğ., 2018). Şekil 19c ve d'de, NADES-3 ve NADES-4'ün FTIR spektrumları verilmiştir. Burada, ötektik karışımların spektrumları ve bileşenleri arasında önemli bir değişiklik gözlenmez, ancak laktik asit'in O–H germe bandı sırasıyla NADES-3 ve NADES-4 için 3423 cm^{-1}'den 3404 cm^{-1}'e ve 3377 cm^{-1}'e kayar. Bu sonuç, laktik asit ve şekerler arasında güçlü H bağları oluşturmak olarak yorumlanabilir (Florindo ve diğ., 2017). Şekil 19e'de, NADES-5'in FTIR spektrumu gösterilmiştir, burada C–H bandının 3032 cm^{-1}'e, C=O bandının 1720 cm^{-1}'den 1733 cm^{-1}'e ve C-O bandının 1122 cm^{-1}'den 1128 cm^{-1}'e kadar kayması, kolin klorür ve laktik asit arasında daha fazla H-bağının oluştuğunu göstermektedir (Chen ve Wan, 2018).

Hazırlanan NADES'lerin ölçülen yoğunluğu birbirine yakın olmasına rağmen, hepsinin sudan daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Tablo 6).

Ekstraksiyon işlemlerinde kullanılan çözücülerin seçiminde reolojik özelliklerin uygun olması büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle NADES'lerin özellikle viskozite değerleri incelenmelidir. Şekil 20a ve b'de sırasıyla çalışmada kullanılan NADES'lerin viskoziteleri ve gerilme-gevşeme eğrileri gösterilmiştir. NADES'lerin hazırlanması sırasında yapıya su eklenmesine rağmen, ekstraksiyon işlemi için NADES-1 ve NADES-2 çözücülerinin viskozitelerinin yüksek olduğu belirlenmiştir. Literatürde, şeker gruplarına (fruktoz, sükroz, glikoz vb.) sahip NADES'lerin yüksek viskoziteye sahip olduğu rapor edilmiştir. Bu nedenle, bu iki çözücü, ekstraksiyondan önce belirtilen oranlarda su ile seyreltilmiştir. Viskozite değerleri karşılaştırıldığında, NADES-1 ve NADES-2'nin seyreltmeden sonra en düşük viskozite değerlerine ulaştığı ve diğer üç çözücüye kıyasla sıcaklık artışından daha fazla etkilendiği görülmektedir (Savi, L.D., ve diğ., 2019). Kayma Hızı ile viskozitenin değişimini gösteren Şekil 20b yorumlandığında, tüm NADES'lerin newtonian karakterine sahip olduğu görülmektedir. Ayrıca, tüm çözücülerin 10 s^{-1} kayma hızı değerinden sonra sabit akışa ulaştığı da görülmektedir.

MDE sürecinde, ekstraksiyon sıcaklığı (X_1), ekstraksiyon süresi (X_2) ve çözücü-katı oranı (X_3) olmak üzere üç önemli operasyonel parametrenin kurkumin ve antioksidanların ekstraksiyonu üzerindeki etkileri incelenmiş ve parametreler her NADES için yüz merkezli kompozit tasarım (FCDD) yöntemi ile optimize edilmiştir. Faktörler ve yanıtlar arasındaki ilişki, Design-Expert programında varyans analizi (ANOVA) testi kullanılarak kurulmuştur. Tablo 10-14'te NADES'ler için MDE işleminde FCCD bağımsız faktörleri (X_1, X_2 ve X_3), ayrıca TAC (mmol TR/g-DS) ve CC (mg/g-DS) yanıtları için elde edilen deneysel sonuçlar gösterilmiştir.

Tüm NADES çözücüleri için TAC ve CC yanıtlarına karşılık gelen tüm modeller dikkat çekicidir ($p < 0.0001$) ve yanıtlar ile bağımsız faktörler arasında anlamlı bir ilişki vardır. Ekstraksiyon sıcaklığının tüm tepkiler arasında en önemli operasyonel faktör olduğu bulunmuştur. Tablo 15-19'da olduğu gibi, F-testi ve p değeri kullanılarak, her katsayının önemi belirlenmiştir. Mutlak F değeri arttıkça ve p değeri azaldıkça, ilgili değişkenler daha anlamlı hale gelmektedir. Buradan modelin %95 güven seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı olduğu anlaşılmaktadır.

ANOVA'nın sonuçlarına göre, tüm yanıtları tahmin etmek için ikinci derece modellerin kullanımı uygun bulunmuştur. TAC ve CC'nin tahmini tayininde NADES-1, NADES-2,

NADES-3, NADES-4 ve NADES-5 için kodlanmış bağımsız faktörler kullanılarak elde edilen ikinci dereceden modeller sırasıyla denklem 2-3, 4-5, 6-7, 8-9 ve 10-11'de özetlenmiştir.

$$TAC = + 0.0923 + 0.0102\ X_1 + 0.0025\ X_2 + 0.0023\ X_3 - 0.0008\ X_1X_2 + 0.0003\ X_1X_3 - 0.0005\ X_2X_3 - 0.0074\ X_1^2 - 0.0039\ X_2^2 - 0.0039\ X_3^2 \quad (2)$$

$$CC = + 13.58 + 1.37\ X_1 + 0.364\ X_2 + 0.282\ X_3 + 0.0862\ X_1X_2 - 0.0088X_1X_3 - 0.0238\ X_2X_3 - 1.32\ X_1^2 - 0.5977\ X_2^2 - 0.5277\ X_3^2 \quad (3)$$

$$TAC = + 0.1763 + 0.031\ X_1 + 0.004\ X_2 + 0.007\ X_3 - 0.0029\ X_1X_2 - 0.0011\ X_1X_3 - 0.0026\ X_2X_3 - 0.0184\ X_1^2 - 0.0034\ X_2^2 - 0.0074\ X_3^2 \quad (4)$$

$$CC = + 20.86 + 2.12\ X_1 + 0.528\ X_2 + 0.446\ X_3 - 0.585\ X_1X_2 - 0.71\ X_1X_3 + 0.105\ X_2X_3 - 2.06\ X_1^2 - 0.76\ X_2^2 - 0.61\ X_3^2 \quad (5)$$

$$TAC = + 0.1933 + 0.0163\ X_1 + 0.0056\ X_2 + 0.0047\ X_3 - 0.0015\ X_1X_2 - 0.0010\ X_1X_3 + 0.0015\ X_2X_3 - 0.0101\ X_1^2 - 0.0166\ X_2^2 - 0.0041\ X_3^2 \quad (6)$$

$$CC = + 24.2 + 3.13\ X_1 + 0.402\ X_2 + 0.381\ X_3 + 0.1512\ X_1X_2 + 0.0412\ X_1X_3 + 0.1262\ X_2X_3 - 5.08\ X_1^2 - 0.7641\ X_2^2 - 0.8791\ X_3^2 \quad (7)$$

$$TAC = + 0.1592 + 0.0173\ X_1 + 0.0003\ X_2 - 0.0034\ X_3 - 0.0045\ X_1X_2 + 0.0000\ X_1X_3 - 0.001\ X_2X_3 - 0.0167\ X_1^2 - 0.0007\ X_2^2 - 0.0102\ X_3^2 \quad (8)$$

$$CC = + 30.84 + 4.32\ X_1 - 0.255\ X_2 - 0.025\ X_3 - 0.22\ X_1X_2 - 0.475\ X_1X_3 + 0.14\ X_2X_3 - 4.06\ X_1^2 - 1.96\ X_2^2 - 2.94\ X_3^2 \quad (9)$$

$$TAC = + 0.1764 + 0.0306\ X_1 + 0.0031\ X_2 + 0.0014\ X_3 + 0.0026\ X_1X_2 - 0.0001\ X_1X_3 - 0.0034\ X_2X_3 - 0.0435\ X_1^2 - 0.009\ X_2^2 - 0.0035\ X_3^2 \quad (10)$$

$$CC = + 21.89 + 2.26\ X_1 + 0.549\ X_2 + 0.358\ X_3 - 0.0938\ X_1X_2 - 0.1338\ X_1X_3 - 0.1663\ X_2X_3 - 0.66\ X_1^2 - 1.09\ X_2^2 - 0.585\ X_3^2 \quad (11)$$

Tüm NADES'lerde TAC ve CC değerleri için tahmini R^2 değerleri, düzeltilmiş R^2_a değerleriyle makul bir şekilde tutarlıdır, çünkü buradaki koşul aralarındaki farkın 0.2'den küçük olmasıdır (Tablo 16). Yeterli hassasiyet değeri ise sinyalin gürültüye oranını ölçer ve bu değerin 4'ten büyük olması istenir. Tüm NADES'ler deki TAC ve CC için sinyal-gürültü oranları 4'ten büyük bulunmuştur ve önerilen modellerin tasarımında kullanılabilir olduğu görülmüştür (Tablo 19).

NADES-1 için, en yüksek TAC (0.096 mmol TR/g-DS) ve CC (13.95 mg/g-DS) değerleri; X_1 = 71.8℃, X_2 = 21.6 dakika ve X_3 = 16.5 mL/0.2 g koşullarında elde edilmiştir.

Nades-2 için, en yüksek TAC (0.189 mmol TR/g-DS) ve CC (21.41 mg/g-DS) değerleri; X_1 = 68.3℃, X_2 = 19.57 dakika ve X_3 = 15.8 mL/0.2 g koşullarında elde edilmiştir.

Nades-3 için, en yüksek TAC (0.198 mmol TR/g-DS) ve CC (24.81 mg/g-DS) değerleri; X_1 = 64.7℃, X_2 = 21.5 dakika ve X_3 = 16.2 mL/0.2 g koşullarında elde edilmiştir.

Nades-4 için, en yüksek TAC (0.164 mmol TR/g-DS) ve CC (32.00 mg/g-DS) değerleri; X_1 = 68.2℃, X_2 = 15.4 dakika ve X_3 = 14.5 mL/0.2 g koşullarında elde edilmiştir.

NADES-5 için, en yüksek TAC (0.180 mmol TR/g-DS) ve CC (23.06 mg/g-DS) değerleri; X_1 = 68.7℃, X_2 = 20.2 dakika ve X_3 = 15.9 ml/0.2 g koşullarında elde edildi.

Şekil 22-32'de, operasyonel parametrelerin (ekstraksiyon sıcaklığı, ekstraksiyon süresi ve çözücü-katı oranı) iki yanıt (TAC ve CC) üzerindeki etkileri arasındaki doğrudan ilişkiyi göstermektedir. Ekstrakte edilecek bileşikler, Van der Waals kuvvetleri, hidrojen bağı, dipol momenti ve elektrostatik etkileşimler gibi fiziksel adsorpsiyon ve kimyasal etkileşimler yoluyla katı matrikse bağlı bulunmaktadır. Çözücüler kullanarak bileşiklerin desorpsiyonu ve çözünmesi için bu etkileşimleri azaltmanın en etkili yöntemi sıcaklıktaki artıştır (Bi ve diğ., 2013). Optimum ekstraksiyon sıcaklığının belirlenmesi oldukça önemlidir, çünkü MDE ekstraksiyon verimliliğine katkıda bulunan ana faktörlerden biridir. Artan sıcaklık, bileşiklerin çözücülerdeki çözünürlüğünü artırabilmektedir. Şekil 22-26'da, ekstraktların TAC ve CC'nin MDE sıcaklığı ile yaklaşık 70 ℃'ye kadar yükseldiğini göstermektedir. Kapalı kap MDE sistemi, ekstraksiyon çözücüsünün kaynama noktasının çok ötesinde sıcaklıklarda çalışmasına izin verir. Ekstraksiyon verimliliği, sıcaklık arttıkça artar, çünkü matriksin aktif bölgelerindeki analitlerin çözünürlüğü de artmaktadır. Buna ek olarak, yüzey gerilimi ve çözücü viskozitesi sıcaklık ile azalır ve NADES gibi önemli olan çözücüler numunenin ıslanmasını ve matriksin penetrasyonunu iyileştiren daha yüksek sıcaklıklarda analitleri çözme yeteneğine sahiptir (Chen ve diğ., 2007; Bı ve diğ., 2013). Çalışma sıcaklığındaki artış, ekstraksiyonun verimliliğinde karşılık gelen bir artışa neden olur, ancak yüksek sıcaklıklarda antioksidan özelliklere sahip fenoliklerde yapısal ayrışma meydana gelir (Bener, M., ve diğ., 2013). Ek olarak, 75 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda kullanılan NADES'lerde bozulmaya bağlı olduğu düşünülen sararma gözlenmiştir. Bu nedenle, MDE işleminde daha yüksek sıcaklıklar kullanılmamıştır. Sonuç

olarak, antioksidan bileşiklerin ve NADES çözücülerinin olası bozulmasının yanı sıra ekonomik ve güvenlik bakış açılarını dikkate alarak çok yüksek sıcaklıklar tercih edilmemelidir.

Ekstraksiyon süresinin, ekstrakte edilen ürünün verimi üzerinde genel olarak olumlu bir etkisi olduğu bilinmektedir (Lucchesi ve diğ., 2007). Bunun olası nedeni, katı numunenin çözücü ile ıslanması, çözücünün çözülebilir bileşenleri çözmesi ve çözülen bileşenlerle numuneden çözücünün salınması aşamaları için gereken süre olarak değerlendirilmektedir (Fan ve diğ., 2008; Gan ve Latiff, 2011; Lee ve diğ., 2006). Bildirilen çalışmaların çoğunda ekstraksiyon veriminin artan ekstraksiyon süresi ile artan davranış gösterdiği ancak bu artışın belirli bir süre sonra artan zamanla azaldığı gözlemlenmiştir (Wang ve diğ., 2008). Aslında, bazı biyoaktif bileşenlerin uzun ekstraksiyon süreleri sırasında termal maruziyet nedeniyle bozunduğu bilinmektedir. Soxhlet, ultrasonik ve süper kritik karbondioksit destekli ekstraksiyon gibi diğer ekstraksiyon teknikleriyle karşılaştırıldığında MDE kısa ekstraksiyon sürelerinde yüksek verimli ürün ekstraksiyonu kolaylığı sunar (Wakte ve diğ., 2011). Çalışmada MDE kullanarak minimum ekstraksiyon süresinde zerdeçaldan kurkumin için yüksek ekstraksiyon geri kazanımı elde etmiştir. Tez çalışmada optimum ekstraksiyon süresi NADES'e bağlı olarak 15-20 dakika aralığında değişmektedir.

MDE işleminde incelenen bir başka bağımsız parametre çözücü-katı oranıdır bunlar Şekil 27-31'de gösterilmiştir. Çözücü-katı oranı arttıkça, ekstraktın TAC ve CC değerleri her NADES için artmıştır. Elde edilen veriler kütle transfer prensipleri ile tutarlıdır. Kütle transferi sırasındaki itici güç, katı ve sıvı kütle arasındaki konsantrasyon gradyanıdır ve daha yüksek bir çözücü-katı oranı kullanıldığında gradyan daha büyüktür (Cacace ve Mazza, 2003; Pinelo ve diğ., 2005). Katı ile karşılaştırıldığında çözücü miktarı yeterli transfer elde etmek için yeterli olmadığında, çeşitli dengeler meydana gelebilir ve bu da kütle transferine karşı inkar edilemez bir dirençle sonuçlanabilir (Katsampa ve diğ., 2015). İki yanıt için elde edilen optimum çözücü-katı oranları, NADES tipine bağlı olarak 14.5-16.5 mL/g-DS aralığındadır. Daha yüksek bir çözücü hacminin kullanılması genellikle ekstraksiyon verimliliği üzerinde sadece küçük bir etkiye sahip olsa da, hem maliyet hem de çevresel faktörler açısından dezavantajlıdır.

Şekil 31'deki sonuçlar, MDE yöntemi kullanılarak en yüksek miktarda kurkuminin NADES-4 ile ardından NADES-3, NADES-5, NADES-2 ve NADES-1 ile ekstrakte edildiğini göstermektedir. Ayrıca, en yüksek antioksidan ekstraksiyonun NADES-3, ardından NADES-2,

NADES-5, NADES-4 ve NADES-1 ile gerçekleştiği de görülmektedir. Hem kurkuminin hem de antioksidanların ekstraksiyonundaki farklılıklar beklenmedik değildir, çünkü NADES'in yapısının fiziko-kimyasal özelliklerini belirlediği iyi bilinmektedir.

Kurkuminin ve antioksidanların ekstraksiyonu için NADES verimlerindeki fark olası bir durumdur. Toplam antioksidan kapasite tüm antioksidanların bütünleşik ve muhtemelen sinerjik/antagonist etkileri de dahil olmak üzere karmaşık bir örnek matriksinin açık bir göstergesidir ve ayrı ayrı antioksidan konsantrasyonu belirlemek yerine araştırmacılar tarafından antioksidan savunma sistemlerini değerlendirmek için daha yararlı bir parametre olarak kabul edilmektedir (Apak ve diğ., 2016). Birden fazla antioksidanın bir arada bulunması genellikle toplamsal etkiye neden olurken, aşırı durumlarda sinerjik veya antagonistik etkileşimler ortaya çıkabilir. Bu nedenlerden dolayı, bu çalışmada TAC ve kurkuminoid içeriği açısından tercih edilen NADES sırasının aynı olmaması olası bir sonuçtur.

Bener ve arkadaşları 2016'da yaptığı çalışma sonucunda, kurkumin ve antioksidanların MDE yöntemi ile %80 metanol:su karışımı ile en iyi ekstraksiyon verimliliğini verdiğini bildirmişlerdir (Bener ve diğ.i 2016). Hem kurkuminin hem de antioksidanların ekstraksiyonu göz önüne alındığında, NADES-1 dışındaki tüm NADES'ler , %80 metanol:su karışımından daha yüksek bir verim göstermişlerdir (Şekil 23). Yüksek ekstraksiyon verimliliğine ek olarak, NADESler metanol gibi çözücülere kıyasla çevre dostu ve sarf edilebilir bir çözücü sınıfıdır ve buda tercih önceliği olarak göze çarpmaktadır.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında, beş farklı NADES kullanılarak zerdeçaldan kurkumin ve antioksidanların mikrodalga destekli ekstraksiyonu, yüz merkezli bir kompozit tasarım modelleme ile incelenmiş ve optimize edilmiştir. Hazırlanan NADES'ler yapısal, fizksel ve reolojik özellikleri açısından karakterize edilmiştir. MDE sürecinde, sıcaklık, zaman ve çözücü-katı oranı olmak üzere üç önemli operasyonel parametrenin kurkumin ve antioksidanların ekstraksiyonu üzerindeki etkileri incelenmiş ve parametreler her NADES için optimize edilmiştir. Tüm yanıtları tahmin etmek için ikinci derece modeller önerilmiştir. Ekstraksiyon sıcaklığının, tüm NADES'ler için kurkumin ve antioksidanların ekstraksiyonunda en önemli operasyonel faktör olduğu bulunmuştur. En yüksek CC ve TAC verimini elde etmek için, NADES tipi ile ilgili bağımsız değişkenler olan ekstraksiyon sıcaklığı, ekstraksiyon süresi ve çözücü-katı oranı sırasıyla 64.7-71.8 °C, 15.4-21.6 dakika ve 14.5-16.5 mL/0.2 g aralıklarında belirlenmiştir. Antioksidan testinde, NADES-1 hariç tüm NADES özleri, %80 metanolden daha

yüksek antioksidan kapasitesi ve kurkumin içeriği sergilemiştir. Çalışmada, zerdeçaldan antioksidanların ve kurkuminin ekstraksiyonu için yeşil, kolay erişilebilir ve etkili NADES'ler önerildi. Ek olarak, MDE yöntemi, diğer ekstraksiyon tekniklerine kıyasla daha kısa ekstraksiyon süresi, otomasyon kolaylığı, çoklu numune işleme ve düşük çözücü gereksinimi gibi avantajlar sağlamaktadır. Tez çalışması sonucu, önerilen NADES'ler kullanılarak modellenen MDE yöntemi, zerdeçaldan antioksidanlar ve kurkumin ekstraksiyonu için farmasötik, doğal boya ve gıda endüstrilerinde etkili ve sürdürülebilir bir prosedür olma potansiyeline sahiptir.

KAYNAKLAR

Abbott, A. 2010, Deep Eutectic Solvents, in Leuven Summer School on Ionic Liquids.

Al Omar, M.K., Hayyan, M., Alsaadi, M. A., Akib, S., Hayyan, A., Hashim, M. A. 2016, Glycerol-based deep eutectic solvents: physical properties. Journal of Molecular Liquids, 215, 98-103.

Altern Med Rev. 2001, Curcuma longa (zerdeçal). Monograph; Suppl: S62-S66.

Akkuş, 1995; Karagül ve ark., 2000, Altıner ve ark., 2017, Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Mimoza Yayınları, Konya. s.1-73.

Akpolat M., Topçu Tarladaçalışır Y., Uz YH., Sapmaz Metin M., Kızılay, G., 2010, Kanser Tedavisinde Curcuminin Yeri. Yeni Tıp Dergisi; 27: 142-147.

Apak, R., Gorinstein, S., Böhm, V., Schaich, K.M., Özyürek, M., Güçlü, K., 2013, Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity, Pure and Applied Chemistry, 85(5), 957-998.

Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S.E., 2004, Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and E, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Method, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52, 7970-7981

Aroso, I. M., Paiva, A., Reis, R. L., Duarte, A. R. C. 2017, Natural deep eutectic solvents from choline chloride and betaine–Physicochemical properties. Journal of Molecular Liquids, 241, 654-661.

Aslan, R., 2018, Vitaminler oksidan ve antioksidan dengeyi nasıl etkiliyor. Ayrıntı Dergisi, 6, 68, 1-5.

Bacanlı, M., Başaran, N., Başaran, A.A. 2017, Lycopene: Is it beneficial to human health as an antioxidant? Turkish Journal of Pharmacological Science, 14(3), 311-318.

Bener, M., Özyürek, M., Güçlü, K., Apak, M., 2016, Optimization of Microwave-Assisted Extraction of Curcumin from Curcuma longa L. (Turmeric) and Evaluation of Antioxidant Activity in Multi-Test Systems, Rec. Nat. Prod. 10:5, 542-55.

Bi, W., Tian, M., Row, K. H. 2013, Evaluation of alcohol-based deep eutectic solvent in extraction and determination of flavonoids with response surface methodology optimization. Journal of Chromatography A, 1285, 22-30.

Cacace, J. E., ve Mazza, G. 2003, Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. Journal of Food Engineering, 59(4), 379-389.

Cellat, K., 2011. Bazı Endemik Bitkilerin Uçucu Yağ Bileşenlerinin Ekstrakte Edilmesi ve İçeriklerinin Araştırılması. (Yüksek Lisans Tezi), Kimya Anabilim Dalı, Çukurova Üniversitesi Adana.

Chan, C.-H., Yusoff, R., Ngoh, G.-C., ve Kung, F. W.-L., 2011, "Microwave assisted extractions of active ingredients from plants", Journal of Chromatography A, 1218 (37), 6213-6225.

Choi, Y. H., Van Spronsen, J., Dai, Y., Verberne, M., Hollmann, F., Arends, I. W., ve diğ., 2011, Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology? Plant Physiology, 156, 1701–1705.

Chen, Z., Wan, C. 2018, Ultrafast fractionation of lignocellulosic biomass by microwave-assisted deep eutectic solvent pretreatment. Bioresource technology, 250, 532-537.

Çoban, E., Patır, B., 2010, Antioksidan Etkili Bazı Bitki ve Baharatların Gıdalarda Kullanımı. Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi ,Cilt: 5, No: 2, (7-19).

Dai, Y., Witkamp, G. J., Verpoorte, R., Choi, Y. H. 2013, Natural deep eutectic solvents as new extraction media for phenolic metabolites in safflower. Analytical Chemistry, 85, 6272–6278.

Deepak, V., Dandekar., Gaikar, V.G., 2002, Microwave assisted extraction of curcuminoids from curcuma longa, Separation science and technology, 37 (11), 2669–2690.

Değirmecioğlu, A. ve Yazgı, A. 2006, Tepki Yüzeyleri Metodolojisi "Optimizasyon Esaslı Çalışmalara İlişkin Teorik Esaslar ve Tarımsal Mekanizasyon Uygulamaları". Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Tarım Makineleri Bölümü. Tarım Makineleri Bilimi Dergisi, 2 (2), 111-115.

Delgado-Mellado, N., Larriba, M., Navarro, P., Rigual, V., Ayuso, M., García, J., Rodríguez, F. 2018, Thermal stability of choline chloride deep eutectic solvents by TGA/FTIR-ATR analysis, Journal of Molecular Liquids, 260, 37-43.

Dubey, R.K., Upadhyay, G., Singh, V., Pandey, S., 2020, Antioxidant potential and free radical scavenging activity of Parkia roxburghii, G. Don, a lesser known leguminous tree from North East India, South African Journal of Botany, 131 ,454-461.

Durand, E., Lecomte, J. and Villeneuve, P., 2013b, Deep eutectic solvents: Synthesis, application, and focus on lipase-catalyzed reactions, European Journal of Lipid Science and Technology, 115(4), 379-385.

Fan, G., Han, Y., Gu, Z., Chen, D. 2008, Optimizing conditions for anthocyanins extraction from purple sweet potato using response surface methodology (RSM). LWT-Food Science and Technology, 41(1), 155-160.

Flora, S.J.S., Shrivastava, R., Mittal, M., 2013, Chemistry and pharmacological properties of some natural and synthetic antioxidants for heavy metal toxicity, Current Medicinal Chemistry, 20 (36), 4540-4574.

Florindo, C., Oliveira, M. M., Branco, L. C., Marrucho, I. M. 2017 , Carbohydrates-based deep eutectic solvents: thermophysical properties and rice straw dissolution, Journal of Molecular Liquids, 247, 441-447.

Fang, Y.Z., Yang, S., Wu, G., 2002, Free radicals, antioxidants, and nutrition, Nutrition, 18(10), 872–879.

Frel, B., 1994. Natural Antioxidants in Human Health and Disease, Academic Press.

Gabriele, F., Chiarini, M., Germani, R., Tiecco, M., Spreti, N. 2019, Effect of water addition on choline chloride/glycol deep eutectic solvents: characterization of their structural and physicochemical properties, Journal of Molecular Liquids, 291, 111301.

Gan, C. Y., & Latiff, A. A. 2011, Optimisation of the solvent extraction of bioactive compounds from Parkia speciosa pod using response surface methodology, Food chemistry, 124(3), 1277-1283.

Gökpınar, Ş., Koray, T., Akçiçek, E., Göksan, T., Durmaz, Y., 2006, Algal antioksidanlar, EÜ Su Ürünleri Dergisi 23 - Ek (1/1), 85-89.

Güçlü, K., Sözgen, K., Tütem, E., Özyürek, M., Apak, R., 2005, Spectrophotometric determination of ascorbic acid using copper(II)-neocuproine reagent in beverages and pharmaceutical, Talanta, 65 (5), 1226-1232.

Güner, U., 2014, Toksikoloji Notları, Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi.

Ghaedi, H., Ayoub, M., Sufian, S., Shariff, A. M., Lal, B. 2017, The study on temperature dependence of viscosity and surface tension of several Phosphonium-based deep eutectic solvents, Journal of Molecular Liquids, 241, 500-510.

Hayyan, A., Mjalli, F. S., AlNashef, I. M., Al-Wahaibi, T., Al-Wahaibi, Y. M., Hashim, M. A. 2012, Fruit sugar-based deep eutectic solvents and their physical properties, Thermochimica Acta, 541, 70-75.

Hilmi, Ş., 1994, Oksidanlar ve antioksidanlar. THTDrg, 48:1-2,44-49.

İriş, C., Çınar, M., 2019, Antioksidan vitaminler ve ağır Metal Toksitesi üzerinde etkisi, Bulletin of Veterinary Pharmacology and Toxicology Association, 10 (3): 135-151, 2019.

Ivanisova, E., Tokar, M., Mocko, K., Bojnanska, T., Marecek, J., Mendelova, A., 2013, Antioxıdant activity of selected plant products, Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences, 2 (Special issue 1) 1692-1703.

Jayaprakasha, G.K., Jaganmohan Rao, L., Sakariah, K.K., 2006, Antioxidant activities of curcumin, desmethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin, Food Chemistry ,98 ,720–724.

Karaman, B,E., Köseler, E.,2017, Zerdeçalın Kronik Hastalıklarla İlişkisi, Başkent Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi dergisi, 2(2), 96-112.

Katsampa, P., Valsamedou, E., Grigorakis, S., & Makris, D. P. 2015, A green ultrasound-assisted extraction process for the recovery of antioxidant polyphenols and pigments from onion solid wastes using Box–Behnken experimental design and kinetics. Industrial Crops and Products, 77, 535-543.

Kazanç M.B, 1997, Antioksidan Vitaminler. Sendrom, Temmuz; 14-22.

Koç, B., Ertekin, F.K., 2010, Yanıt Yüzey Yöntemi ve Gıda İşleme Uygulamaları, Gıda, 35, 63-70.

Krinsky, N.I., Johnson, E.J., 2005, Carotenoid actions and their relation to health and disease, Molecular Aspects of Medicine, 26 (6), 459-516.

Lee, W. C., Yusof, S., Hamid, N. S. A., & Baharin, B. S. 2006, Optimizing conditions for hot water extraction of banana juice using response surface methodology (RSM), Journal of Food Engineering, 75(4), 473-479.

Lucchesi, M. E., Smadja, J., Bradshaw, S., Louw, W., & Chemat, F. 2007, Solvent free microwave extraction of Elletaria cardamomum L.: A multivariate study of a new technique for the extraction of essential oil. Journal of Food Engineering, 79(3), 1079-1086.

Mahesar, S. A., Sherazi, S. T. H., Abro, K., Kandhro, A., Bhanger, M. I., Van de Voort, F. R. ve Sedman, J. 2008, Application of microwave heating for the fast extraction of fat content from the poultry feeds. Talanta, 75, 1240–1244.

McDowell, L.R., 2000, Vitamins in animal and human nutrition. Second edition. Lowa State University Press/Ames.

Myers, R. H., Montgomery, D. C., Anderson-Cook, C. M., 2009, Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments, Wiley, New York.

Pehlivan, F.E., 2017. Vitamin C: An Antioxidant Agent. Open access peer-reviewed chapter, Open Access peer-reviewed chapter, https://www.intechopen.com/books/vitamin-c/vitamin-c-an-antioxidant-agent .

Pinelo, M., Rubilar, M., Jerez, M., Sineiro, J., Núñez, M. J. 2005, Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. Journal of agricultural and food chemistry, 53(6), 2111-2117.

Pradedova, E.V., Isheeva, O.D., Salyaev, R.K., 2010, Classification of the antioxidant defense system as the ground for reasonable organization of experimental studies of the oxidative stress in plants, Russian Journal of Plant Physiology, 58 (2), 210-217.

Rezaei, S., Najafpour, G.D., Mohammadi, M., Moghadamniab, A.A., Kazemi, S., 2016, Formic Acid and Microwave Assisted Extraction of Curcumin from Turmeric (Curcuma longa L.), International Journal of Engineering, Vol. 29, No. 2, 145-151.

Savi, L.K., Dias, M. C. G. C., Carpine, D., Waszczynskyj, N., Ribani, R. H., Haminiuk, C. W. I. 2019, Natural deep eutectic solvents (NADES) based on citric acid and sucrose as a potential green technology: a comprehensive study of water inclusion and its effect on thermal, physical and rheological properties, International Journal of Food Science & Technology, 54(3), 898-907.

Sahne, F., Mohammadi, M., Najafpour,G.D., Moghadamnia, A.K., 2016, Extraction of bioactive compound curcumin from turmeric (Curcuma longa.l) via diffrent routes: a comparative study , Pak. J. Biotechnol. Vol. 13 (3) 173 – 180.

Sharma, R.A., Gescher, A.J., Steward, W.P., 2005, Curcumin: The story so far. European Journal of Cancer ,41.1955–1968.

Stahl, W., Sies, H., 2003, Antioxidant activity of carotenoids. Molecular Aspects of Medicine, 24, 345–351.

Sujata, S.P., Rathod, V. K., 2020, Synergistic Effect of Ultrasound and Three Phase Partitioning for the Extraction of Curcuminoids from Curcuma longa and its Bioactivity Profile, Process Biochemistry ,93, 85-93.

Surai, P.F., 2012, The antioxidant properties of canthaxanthin and its potential effects in the poultry eggs and on embryonic development of the chick, Part 1. World's Poultry Science Association, 68, 465-475.

M. Deniz Turan., H.Soner Altundoğan., 2011, Use of Response Surface Methods in Hydrometallurgical Researches, Madencilik, Cilt 50, Sayı 3, Sayfa 11-23.

Tuğba Türk., 2016, Merkezi Kompozit Tasarımı Kullanılarak Bakır Cürufundan Arsenik Liçinin İncelenmesi, Yerbilimleri, 2016, 37 (3), 193-202.

Yalçın, A.S., Yilmaz, A.M., Altundağ, E.M., Koçtürk, S.,2017, Kurkumin, Kuersetin ve Çay Kateşinlerinin Anti-Kanser Etkileri, Marmara Pharmaceutical Journal. 21(1).

Yang, Z., Pan, W., 2005, Ionic liquids:Green solvents for nonaqueous biocatalysis, Enzyme and Microbial Technology, 37, 19-28.

Yang, L., Friesen, J.B ., James, B., Mc Alpine, Lankin, C.D., Chen, Shao-Nong., Guido F. P., 2018, Natural Deep Eutectic Solvents: Properties, Applications, and Perspectives, Journal of Natural Products, 81, 679−690.

Vanda, H., Dai,Y., Wilson, E,G., Verpoorte, R., Choi, H,Y., 2018, Green solvents from ionic liquids and deep eutectic solvents to natural deep eutectic solvents, Comptes Rendus Chimie 21, Pages 628-638.

Zhang, Q., Vigier, K. D. O., Royer, S., & Francois, J. 2012, Deep eutectic solvents: Syntheses, properties and applications. Chemical Society Reviews, 41, 7108–7146.

Wakte, P.S., Sachin, B.S., . Patil, A.A., Mohato, D.M., Band, T.H., Shinde, D.B., 2011, Optimization of microwave, ultra-sonic and supercritical carbon dioxide assisted extraction techniques for curcumin from Curcuma longa, Separation and Purification Technology, 79 , 50–55.

Wang, H., Hao, L., Wang, P., Chen, M., Jiang, S., & Jiang, S. 2017, Release kinetics and antibacterial activity of curcumin loaded zein fibers. Food Hydrocolloids, 63, 437-446.

Wichitnithad, W., Jongaroonngamsang, N., Pummangura, S., Rojsitthisak, P. 2009, A simple isocratic HPLC method for the simultaneous determination of curcuminoids in commercial turmeric extracts. Phytochemical Analysis, 20(4), 314-319.

https://ru.wikipedia.org/wiki/молочная кислота [Ziyaret tarihi: 2 Ekim 2020].

https://ru.wikipedia.org/wiki/Сахароза [Ziyaret tarihi: 2 Ekim 2020].

https://ru.wikipedia.org/wiki/Фруктоза [Ziyaret tarihi: 2 Ekim 2020].

EKLER

ÖZGEÇMİŞ



Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Khadija Doldolova
Doğum Yeri	Azerbaycan
Doğum Tarihi	04.11.1996
Uyruğu	❒ T.C. ☑ Diğer: Azerbaycan Türkü
Telefon	05464633440/+994513967733
E-Posta Adresi	xedice.doldolova@gmail.com
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri Lisans	
Üniversite	M.V.Lomonosov Moskova Devlet Üniversitesi Bakü şübesi
Fakülte	Kimya
Bölümü	Kimya
Mezuniyet Yılı	2018

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Enstitü Adı	Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Anabilim Dalı	Kimya Anabilim Dalı
Programı	Kimya Programı

Makale ve Bildiriler