

Nar Kabuğu Atıklarından Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon ile Antioksidan Kapasite Tayini: Optimizasyon ve GC-MS ile Profil Analizi

Determination of Antioxidant Capacity by Microwave Assisted Extraction from Pomegranate Peel Wastes: Optimization and GC-MS Based Profile Analysis

Zehra Akıncı* ¹ , Veyis Selen ¹ , M. Şaban Tanyıldızı ¹ 

¹Fırat Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Elazığ, Türkiye

Öz

Nar kabuğu atıkları mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemi ile deneysel tasarım kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Ekstraktların biyoaktif özelliklerinin değerlendirilmesinde antioksidan kapasite (ABTS, DPPH, FRAP), toplam fenolik madde (TFM) ve toplam flavonoid madde (TFVM) miktarı sonuç değişkeni olarak takip edilmiştir. Her bir sonuç değişkeni için ayrı ayrı elde edilen model denklemlerin doğrulama ve optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Ekstraksiyon şartlarının bileşen değişimine etkisi ve bileşenlerin sonuç değişkenleri ile ilişkisini ortaya koymak için optimum noktalarda elde edilen ekstraktların içerik analizi gaz kromatografisi-kütle spektrofotometresi (GC-MS) ile kalitatif olarak incelenmiştir. Benzer bileşenlerin en yoğun gözlemlendiği yöntemler FRAP ve DPPH analizinden elde edilen ekstraktlar olup, ABTS analizi için optimize edilen şartlarda elde edilen bileşenlerin diğer yöntemlere göre elde edilenlerden anlamlı ölçüde farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Bu durum bitkilerden elde edilen biyoaktif bileşenlerin tayininde takip edilen yaygın yöntemlerin ölçüm mekanizması ile yakından ilişkili olduğunu, yöntemlerin analitik duyarlılığının farklı sonuçlar verebileceğini ortaya koymaktadır. Ayrıca takip edilen bileşen değişimi endüstriyel açıdan değerli farklı bileşenlerin elde edilebileceğini göstermiştir.

Abstract

Pomegranate peel wastes were extracted using microwave-assisted extraction method using experimental design. Antioxidant capacity (ABTS, DPPH, FRAP), total phenolic matter (TFM) and total flavonoid matter (TFVM) were followed as outcome variables in the evaluation of bioactive properties of the extracts. Validation and optimization studies were carried out for the model equations obtained separately for each result variable. The content analysis of the extracts obtained at optimum points was qualitatively analyzed by gas chromatography-mass spectrophotometry (GC-MS) to reveal the effect of extraction conditions on component changes and the relationship between components and result variables. The most similar components were observed in the extracts obtained from FRAP and DPPH analysis, whereas the components obtained under conditions optimized for ABTS analysis differed significantly from those obtained by other methods. This reveals that the common methods followed in the determination of bioactive components from plants are closely related to the measurement mechanism, and the analytical sensitivity of the methods may give different results. In addition, the component variation followed showed that different industrially valuable components can be obtained.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan kapasite analiz yöntemleri, optimizasyon, GC-MS, nar kabuğu

Keywords: Antioxidant capacity analysis methods, optimization, GC-MS, pomegranate peel

* Corresponding e-mail (Sorumlu yazar e-posta): akinci.zehra@gmail.com

Received (Geliş Tarihi): 16.05.2025, Accepted (Kabul Tarihi): 18.07.2025

1. Giriş

Son yıllarda artan sağlık endişeleri nedeniyle sentetik kimyasalların yerine doğal bileşenlerin kullanımına ciddi bir eğilim söz konusudur. Gıda, kozmetik, ilaç gibi çeşitli sektörlerde geniş kullanım alanı bulan bu bileşenler sağlık üzerindeki olumlu etkileri ile de oldukça dikkat çekmektedir. Bitkilerden elde edilen bileşenler kanser, kardiyovasküler rahatsızlıklar, diyabet ve nörodejeneratif bozukluklar gibi kronik rahatsızlıkların riskini azaltmaya yardımcı olabilecek antioksidan, antienflamatuar ve antikanser özelliğe sahiptir. Yapılan araştırmalar, yıllık 100 milyar doları aşan bir pazar değerine sahip bitki bazlı ilaçların sentezlenmesine yol açmıştır. Yeni ilaçların geliştirilmesi için öncü madde olarak yine bu bileşenlerden yararlanılır [1, 2]. Gıda ürünlerinde koruyucu, aroma artırıcı ve antimikrobiyal ajan olarak kullanılırken [3], kozmetik ürünlerinde yaşlanma karşıtı, antioksidan, cilt koruyucu potansiyeli ile öne çıkmaktadır [4]. Bitkilerin kök, gövde, kabuk gibi farklı kısımlarında bulunan bu çeşitli bileşenler genelde yenmeyen, atık olarak değerlendirilen kısımlarında daha yoğun bulunmaktadır. Örneğin nar üzerine yapılan bir çalışmada en yüksek flavonoid, fenolik ve potasyum miktarının kabukta, karbonhidrat miktarının çiçek ve yapraklarda olduğu tespit edilmiştir [5].

Tarımsal gıda işletmeleri yılda 190 milyon tondan fazla kabuk, yaprak, kök, tohum gibi çeşitli yan ürünler üretmektedir. Bu yan ürünlerin geri dönüşümü veya bertarafı hayati öneme sahip olup bunları bir üretim prosesinin hammaddesine dönüştürmek üretim maliyetlerini düşürüp çevrenin kirlenmesini de önler. Bitkisel atıklar lipitler, karbonhidratlar, proteinler, lifler, vitaminler ve fenolikler bakımından oldukça zengindir. Bu atıklardan hedeflenen bir bileşenin doğru bir şekilde elde edilmesi dünya çapında gıda ekonomisine, çevreye ve sürdürülebilirliğe katkı sağlar [6, 7].

Nar kabuğu fenolik asitler (hidroksisinnamik ve hidroksibenzoik asitler), hidrolize edilebilir tanenler (ellagitanninler, gallotaninler ve gallagil esterleri), flavonoidler, sükroz, nişasta ve şeker gibi çeşitli farklı kullanım alanına sahip bileşenler açısından zengin bir kaynaktır [8, 9]. Literatür çalışmalarında nar kabuğu biyoaktif bileşenlerinin güçlü antimikrobiyal, antioksidan, antienflamatuar, kardiyoprotektif gibi çeşitli özelliklere sahip olduğu kanıtlanmıştır [10-12]. Ayrıca gıda kaplama ürünlerine koruyucu ve antimikrobiyal ajan olarak eklenip gıdanın duyuusal ve fizikokimyasal özelliklerine katkı sağlama [13, 14], aktif karbona dönüştürüldüğünde iyi bir pestisit adsorpsiyonu sağlama [15], tekstilde doğal boyar madde ajanı [16] olma gibi çeşitli kullanım alanlarına sahiptir. Nar kabuğunun dikkat çekici biyoaktif bileşen profiline rağmen, bu temel biyoaktiflerin çıkarılmasında karşılaşılan zorluklar, onun işlevsel bir ajan olarak kullanımını sınırlamaktadır.

Biyoaktif bileşenlerin ekstraksiyonunda kullanılan çeşitli geleneksel (maserasyon, Soxhlet ekstraksiyonu) ve yeşil (ultrason ve mikrodalga destekli ekstraksiyon, basınçlı sıcak su ekstraksiyonu vb.) ekstraksiyon yöntemleri mevcuttur. Mikrodalga destekli ekstraksiyon (MDE) özellikle daha kısa ekstraksiyon süresi ve daha az çözücü tüketimi ile geleneksel yöntemlere alternatif yeşil yöntemlerden biridir. Kaderides vd. (2019) nar kabuğundan fenolik bileşenlerin ekstraksiyonunda MDE ile ultrason destekli ekstraksiyonunu karşılaştırmış MDE'nin daha etkin olduğunu bulmuştur. Bu durumun MDE'de ısı ve kütle transferi aynı yönde ilerleyerek sinerjik etki göstermesi dolayısıyla daha kısa sürede daha yüksek ekstraksiyon verimi sağlaması ile açıklamıştır [17].

Tüm endüstriyel alanlarda en verimli çalışma koşullarını belirlemek, daha iyi sonuçlar elde etmek, zaman ve maliyetten tasarruf etmek için proses sürecinin optimizasyonu önemlidir. Günümüzde proses optimizasyonunda çeşitli deneysel tasarım metotları kullanılmaktadır. Deneysel tasarım ile klasik optimizasyondan farklı olarak çok sayıda faktörün birbiri ve sonuç değişkeni üzerinde etkisi incelenebilir ve minimum yatırım ile maksimum kazanç sağlanabilir [18, 19].

Bu çalışmada, sürdürülebilir tarım yan ürünlerinin değerlendirilmesi kapsamında nar kabuğu atıkları, biyoaktif bileşenlerin geri kazanımı amacıyla ele alındı. Biyoaktiflerin endüstriyel ölçekte çıkarılmasına yönelik yaklaşımlar, hem fonksiyonel gıdaların ve nutrasötiklerin geliştirilmesine katkı sağlamakta hem

de doğal koruyucular olarak kullanım potansiyelleriyle gıda raf ömrünün uzatılmasına, israfın azaltılmasına ve sağlıklı beslenme tercihlerinin teşvikine olanak tanımaktadır. Bu bağlamda, nar kabuğunun işlenmesi sırasında ortaya çıkan atıklar, çevresel ve ekonomik açıdan değerli bir kaynak olarak değerlendirildi. Çalışmada, nar kabuğu atıkları yanıt yüzey yöntemi (YYY) baz alınarak MDE ile işlendi. Elde edilen ekstraktlar TFM ve TFVM miktarı, FRAP kapasitesi, DPPH ve ABTS aktivitesini maksimize edecek şekilde optimize edildi ve daha sonra ekstraktların bileşen değişimini incelemek amacıyla GC-MS ile kalitatif analizleri yapıldı. Bu çalışmada literatürden farklı olarak her sonuç değişkeni için ayrı ayrı bileşen değişimi incelendi. Böylece ekstraksiyon koşullarının ve analiz yönteminin bileşen değişimine etkisi ortaya kondu. Böylece ekstraksiyon koşullarının ve analiz yönteminin bileşen değişimine etkisi ortaya kondu.

2. Materyal ve Metod

2.1. Materyal

2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) reaktifi, 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit (Trolox), Folin-Ciocalteu reaktifi, ABTS(2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit), gallik asit ve 2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazin (TPTZ) Sigma Aldrich'den alındı. Na_2CO_3 , AlCl_3 , NaOH , NaNO_2 , $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, metanol, heksametildisilazan, trifloroasetik asit Merck'ten (Darmstadt, Almanya) temin edildi.

2.2. Bitki Materyali ve Örneklerin Hazırlanması

Türkiye'nin Elazığ ilindeki yerel satıcılardan temin edilen nar, tanelerinden ayrılarak distile su ile yıkandı ve yaklaşık 5X5 cm ebatlarında kesilerek gölgede 72 saat kurutuldu. Laboratuvar tipi öğütücü (Waring Commercial) ile öğütülerek tanecik boyutu 50 mesh altına indirildi. Kullanılncaya dek buzdolabında +4 °C'de plastik kapta saklandı.

2.3. Nar Kabuğunun MDE İşlemleri

Ekstraksiyon işlemleri ev tipi Samsung (MW 4000D, Kore) marka mikrodalga fırınında gerçekleştirildi. Kullanılan çözücünün buharlaşmasını önlemek için özel olarak tasarlanan politetrafloroetilen (PTFE) kap (Şekil 1) kullanıldı. Her bir numune modelde belirtilen miktarda nar kabuğu tartılarak PTFE kaba kondu ve üzerine 20 mL su eklendi. Karışım homojenize edilerek cihaza kondu ve tasarımda belirtilen süre ve güçte çalıştırılarak ekstraksiyon işlemi gerçekleştirildi.



Şekil 1. MDE için Kullanılan Mikrodalga Fırın ve PTFE Kap

2.4. Metod

2.4.1. Toplam Fenolik Madde (TFM) Tayini

Ekstraktların toplam fenolik madde tayini Karabulut ve ark. [20] tarafından belirlenen yöntem modifiye edilerek yapıldı. 100 µL seyreltilmiş örneğe 1000 µL seyreltilmiş (1:40) Folin-Ciocalteu reaktifi eklendi. 4 dk sonra 1000 µL %10'luk Na₂CO₃ çözeltisi eklenip oda sıcaklığında 90 dk inkübasyona bırakıldı. Kör olarak saf su kullanılarak 725 nm'de absorbands değerleri ölçüldü. Sonuçlar birim katı maddeye (KM) karşılık gallik asit eşdeğeri (µg GA/ g KM) olarak ifade edildi [20].

2.4.2. Toplam Flavonoid Madde (TFVM) Tayini

Flavonoid tayini için 1000 µL ekstrakta 300 µL %5'lik NaNO₂ çözeltisi eklendi. 5 dk sonra 600 µL %10'luk AlCl₃ çözeltisi, 6 dk sonra 2 mL 1 M NaOH çözeltisi, ardından da hızlıca 2.4 mL saf su eklendi ve vortekslendi. Kör olarak ekstrakt içermeyen reaktif karışımına karşı 510 nm'de absorbandsı ölçüldü. Sonuçlar kuersetin eşdeğeri (mg Qe/ g KM) olarak ifade edildi [21].

2.4.3. DPPH Radikali Süpürme Aktivitesi

Bu çalışmada Villano ve ark [22] tarafından önerilen yöntemle çalışıldı. %70 metanol ile hazırlanan 0,1 mM DPPH reaktifinin absorbandsı 0.8 ± 0.005 'e ayarlandı. 100 µL ekstrakta 1900 µL eklenerek karanlık bir ortamda, oda sıcaklığında 2 saat inkübasyona bırakıldı. Ardından kör olarak %70 metanol kullanılarak 517 nm'de ölçüm yapıldı. Sonuçlar trolox (µg Tx/ g dw) eşdeğeri olarak ifade edildi [22].

2.4.4. ABTS Radikali Süpürme Aktivitesi

7 mM ABTS ve 2.45 mM potasyum persülfat çözeltisi hacimce 2:1 oranında birleştirilerek 16 saat boyunca karıştırıldı. Elde edilen ABTS çözeltisi etanol ile seyreltilerek absorbandsı 0.8 ± 0.005 'e ayarlandı. 100 µL ekstrakt üzerine 1900 µL ABTS radikali çözeltisinden eklenip vortekslenerek 6 dk inkübe edildi. Kör olarak etanol kullanılarak 734 nm'de ölçüm yapıldı. Sonuçlar trolox (mg Tx/ g KM) eşdeğeri olarak ifade edildi [23].

2.4.5. Demir İndirgeme Kapasitesi (FRAP)

300 mM sodyum asetat trihidrat (C₂H₃NaO₂.3H₂O) çözeltisi, 20 mM demir klorür heksahidrat (FeCl₃.6H₂O) çözeltisi ve 10 mM 2,4,6-tripiryidyl-s-triazine (TPTZ) çözeltisi hazırlandı. 0.2702 g FeCl₃.6H₂O 49 mL distile suda çözündürülerek üzerine 1 mL 1 M HCl eklendi. TPTZ % 99'luk etanolde çözündürüldü. Sırayla hacimce 10/1/1 oranında karıştırılarak FRAP reaktifi elde edildi. 100 µL ekstrakta hazırlanan FRAP reaktifinden 900 µL eklenerek vortekslendi. 4 dakika sonra 593 nm'de kör olarak ekstrakt içermeyen reaktif karışımı kullanılarak ölçüm yapıldı. Sonuçlar trolox (mg Tx/ g KM) eşdeğer olarak ifade edildi [21].

2.4.6. GC-MS Analizi

GC-MS analizi Yıldırım ve ark. tarafından [24] uygulanan yöntem revize edilerek analiz edildi. Örnekler, GC/MS sistemi (GC/MS QP 2020, Shimadzu, Kyoto, Japan) ve Restek Rxi/5 ms kolonu (30 metre, 0.25 mm ID, 0.25 µm df) kullanılarak analiz edildi. Analiz, taşıyıcı gazın helyum olduğu ve akış hızının 102 mL/dakika olduğu GC kolonuna 49:1 oranında 1 µL örnek enjekte edilerek gerçekleştirildi. Analizde kullanılan GC/MS koşulları Çizelge 1'de verilmiştir. TIC (toplam iyon akımı) modunda 2000 Da/s tarama hızıyla m/z 55'ten 550'ye kadar kütle spektrumları tarandı ve kromatografik pikler cihaz kütüphanesi verilerine göre belirlendi. Bileşenler, cihazla birlikte verilen spektrum kütüphanelerindeki (Wiley ve NIST) kütle spektrumlarının karşılaştırılmasıyla tanımlandı ve tutulma endekslerinin karşılaştırılmasıyla doğrulandı. Bileşenler % 70 ve üzeri benzerlik oranları kullanılarak tarandı.

Çizelge 1. GC-MS Analiz Şartları

GC		MS	
Kolon Fırın Sıcaklığı	60 °C	İyon Kaynağı Sıcaklığı	200 °C
Enjeksiyon Sıcaklığı	300 °C	Arayüz Sıcaklığı	235 °C
Enjeksiyon Modu	Split	İyonizasyon Enerjisi	70 eV
Akış Kontrol Modu	Basınç	Dedeksiyon Voltajı	0 kV
Basınç	120 kPa	Analitik Mod	SIM
Toplam Akış	102.1 mL/dk He	Analiz Süresi	75 dk
Kolon Akış	1.94 mL/dk He		
Purge	3 mL/dk		
Split Oranı	50		

2.4.7. Örneklerin GC-MS için Türevlendirilmesi

Analizi yapılacak örnek vakumlu evaporatörde 2.5 psi, 30 °C’de çözücüsü tamamen uçuncaya kadar kurutuldu. Elde edilen kuru numuneye 0.5 mL piridin çözeltisi eklenerek 75 °C’de 30 dk bekletildi. Soğutulan örnekler sırayla 0.9 mL heksametildisilazan ve 0.1 mL trifloroasetik asit eklenerek 100 °C’de 60 dk bekletildi [25].

2.4.8. Antimikrobiyal Aktivite

Antimikrobiyal analizleri uygulamak için optimum şartlarda elde edilen ekstraktlar kullanıldı. Uygulamadan önce her örnekten 5 mL alınarak vakumlu etüvde kurutuldu. Kurutulan ekstraktlar daha sonra 1 mL saf suda çözüldü. Elde edilen ekstraktlar *S. aureus*, *E. coli* ve *P. digitatum*’a karşı agar kuyucuk yöntemi kullanılarak karşılaştırıldı. Suşlar 0.5 Mc Farland standardına göre ayarlanıp 1/100 oranında seyreltildi. Bakteriler Mueller-Hinton Agar ve küf ise Potato Dextrose Agar besiyerine 50 µL eklenerek drigalski çubuğu ile yayıldı. 20 mm çapında zon açılarak 50 µL ekstrakt eklenip inkübasyona bırakıldı. Bakterilerde 24 saat, küfde ise 72 saat inkübasyonun ardından oluşan zonların çapı cetvel ile mm olarak ölçüldü.

2.5. Deneysel Tasarım ve YYY ile Ekstraksiyon Koşullarının Optimizasyonu

Bağımsız değişkenler ve değer aralıkları (Çizelge 2) literatür taraması yapılarak belirlendi.

Çizelge 2. MDE için İncelenen Bağımsız Değişkenler ve Çalışma Aralıkları

Faktör	Bağımsız Değişkenler	Birim	-1	0	1
A	İrridasyon süresi	s	30	165	300
B	Mikrodalga gücü	W	100	200	300
C	Katı Oranı	%	5	12.5	20

Nar kabuğu biyoaktif bileşenlerinin MDE optimizasyonu bağımsız parametrelere uygulanan YYY ile gerçekleştirildi. İncelenen sonuç değişkenlerine yönelik optimum koşullar için önerilen model Eşitlik 1’de verilmiştir. Burada Y bağımlı değişkenleri, β_0 sabit, β_1, β_2 ve β_3 lineer terimleri, $\beta_{12}, \beta_{13}, \beta_{23}$ kuadratik terimleri ve A, B, C bağımsız değişkenleri ifade eder. Deneysel tasarım için Design Expert 10.0.4.0 (Minneapolis, MN, 2021) yazılımı Box-Behnken Tasarımı (BBT) kullanıldı. 17 deneysel çalışmadan oluşan tasarımda her deneysel çalışma için tasarımda belirtilen miktardaki örnek miktarı tartılarak ekstraksiyon kabına kondu ve üzerine çözücü olarak distile su eklendi. Cihaz her bir deneysel çalışma için belirtilen süre ve mikrodalga gücünde çalıştırılarak ekstraksiyon işlemi gerçekleştirildi. Elde edilen ekstrakt Whatman No.4 filtre kâğıdı ile süzülerek kullanılıncaya dek -20 °C’de saklandı.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 A + \beta_2 B + \beta_3 C + \beta_{11} A^2 + \beta_{22} B^2 + \beta_{33} C^2 + \beta_{12} AB + \beta_{13} AC + \beta_{23} BC \quad (1)$$

3. Bulgular ve Tartışma

Nar kabuğu biyoaktif bileşenlerinin MDE ile elde edilen deneysel sonuçları Çizelge 3’de verildi. Tüm deneyler 3 tekerrürlü çalışılıp, sonuçlar ortalama olarak hesaplandı.

Çizelge 3. Nar Kabuğu MDE Deneysel Sonuçları

Deney No	Süre (s)	Mikrodalga Gücü (W)	Katı miktarı (%)	TFVM (mg Qe/g KM)	TFM (µg GA/g KM)	DPPH (µg Tx/g KM)	ABTS (mg Tx/g KM)	FRAP (mg Tx/g KM)
1	30	100	12.5	101.84	2788.7	8147.1	65.54	190.79
2	300	100	12.5	127.87	3004.9	12035.2	71.26	277.96
3	30	300	12.5	115.36	3093.7	14516.4	65.23	294.96
4	300	300	12.5	186.9	3378.6	14669.9	78.12	350.31
5	30	200	5	73.94	3810.1	8345.3	74.82	233.2
6	300	200	5	152.82	5092.9	14036.8	72.92	389.25
7	30	200	20	109	2197.5	11566.8	48.3	245.46
8	300	200	20	90.46	1891.9	7585.9	57.5	180.78
9	165	100	5	105.93	4269.7	9496.4	74.82	320.91
10	165	300	5	199.35	5931.3	14036.8	108.94	423.25
11	165	100	20	128.17	2299.8	13421.3	58.98	279.71
12	165	300	20	166.61	2417.2	16027.2	68.65	346.95
13	165	200	12.5	137.03	3534.1	16025.6	80.94	362.27
14	165	200	12.5	148.51	3324.0	15718.6	80.41	338.47
15	165	200	12.5	148.66	3534.1	16025.6	80.94	362.27
16	165	200	12.5	137.03	3534.1	15718.6	80.41	338.47
17	165	200	12.5	148.51	3324.0	16025.6	80.94	362.27

Elde edilen deneysel sonuçlar Design Expert 10.0.4.0 yazılımı yardımıyla analiz edildi ve en uygun denklem formu kuadratik denklem formu olarak önerildi (sonuçlar verilmemiştir). Aşağıda verilen denklem formunun ANOVA analizi yine program yardımıyla yapıldı ve önem değeri ($p > 0.1$) düşük olan terimler çıkarılarak indirgenmiş denklem formu aşağıda her bir sonuç değişkeni için ayrı ayrı yazıldı.

$$Y_{TFVM} = 143.95 + 19.7*A + 25.55*B - 4.72*C + 11.38*AB - 24.35*AC - 13.74*BC - 27.21*A^2 + 16.25*B^2 - 10.19*C^2 \quad (2)$$

$$Y_{TFM} = 3470.7 + 184.78*A + 307.2*B - 1287.2*C - 397.1*AC - 386.05*BC - 429.9*A^2 + 233.08*C^2 \quad (3)$$

$$Y_{DPPH} = 15755.65 + 719.02*A + 2018.78*B + 335.73*C - 2418.06*AC - 3229.58*A^2 - 2326.31*C^2 \quad (4)$$

$$Y_{ABTS} = 81.2 + 3.24*A + 6.29*B - 12.26*C + 2.78*AC - 6.11*BC - 12.48*A^2 - 4.67*C^2 \quad (5)$$

$$Y_{FRAP} = 354.07 + 29.24*A + 43.26*B - 39.21*C - 55.18*AC - 8.77*BC - 77.23*A^2 - 13.02*C^2 \quad (6)$$

Denklemde pozitif katsayılar sonuç değişkeni için artışı, negatif katsayılar ise sonuç değişkeninde azalmayı ifade eder. İncelenen bağımsız değişkenlerin takip edilen sonuç değişkenleri üzerine etkilerini gösteren ANOVA test sonucu Çizelge 4’de verilmiştir. TFVM ve TFM miktarı, DPPH ve ABTS aktivitesi ile FRAP kapasitesi eşitlikleri için uyum değeri regresyon katsayısı 0.8-0.98 arasında olup yeterli tanımlayıcılığa sahiptir. R^2_{Adj} değerleri ise 0.88-0.97 arasında olup modelin güvenilirliğin ifade eder. Sinyal gürültü oranı ise tüm sonuç değişkenleri için 4’ün üzerinde olup yeterli sinyal seviyesi sağladığını belirtir.

Çizelge 4. Sonuç Değişkenleri için ANOVA test sonuçlarından elde edilen p değerleri

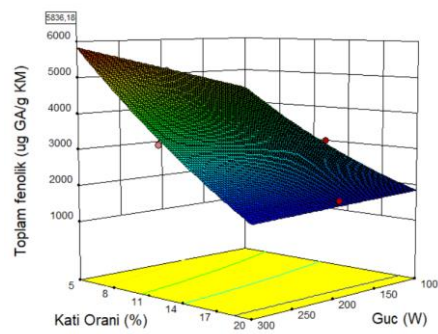
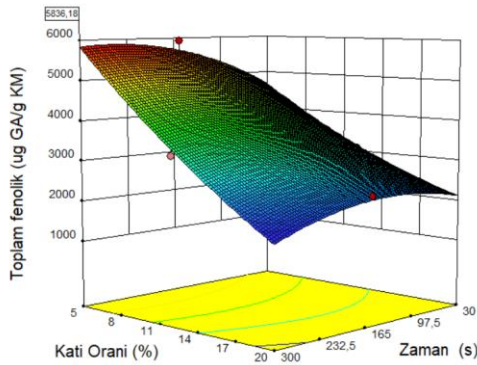
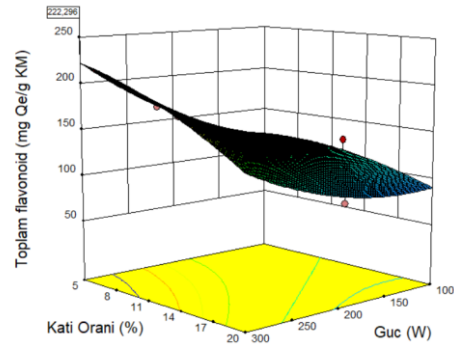
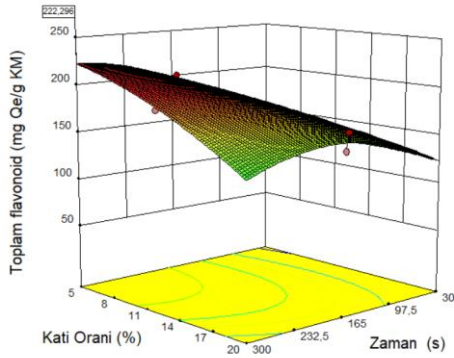
	<i>p değeri</i>				
	TFVM	TFM	DPPH	ABTS	FRAP
Model	0.00040	< 0.0001	0.00030	0.00040	< 0.0001
A-Süre (s)	0.12500	0.01870	0.14570	0.11170	0.00040
B-Güç (W)	0.01830	0.00100	0.00130	0.00750	< 0.0001
C-Katı miktarı (%)	< 0.0001	< 0.0001	0.47820	< 0.0001	< 0.0001
AB	0.29980	-	-	-	-
AC	0.17420	0.00190	0.00380	0.31290	< 0.0001
BC	-	0.00220	-	0.04300	0.27820
A²	0.02160	0.00090	0.00040	0.00080	< 0.0001
B²	0.11810	-	-	-	-
C²	0.22920	0.02770	0.00410	0.09790	0.11230
Model uyumsuzluğu	0.01	0.11310	0.00030	< 0.0001	0.32390
R²	0.9406	0.9821	0.8880	0.9135	0.9723
R²_{Adj}	0.8813	0.9682	0.8207	0.8462	0.9507
R²_{Pre}	0.3246	0.8875	0.3871	0.4174	0.8407
Sinyal gürültü oranı	16.05	31.2	10.95	15.55	22.4

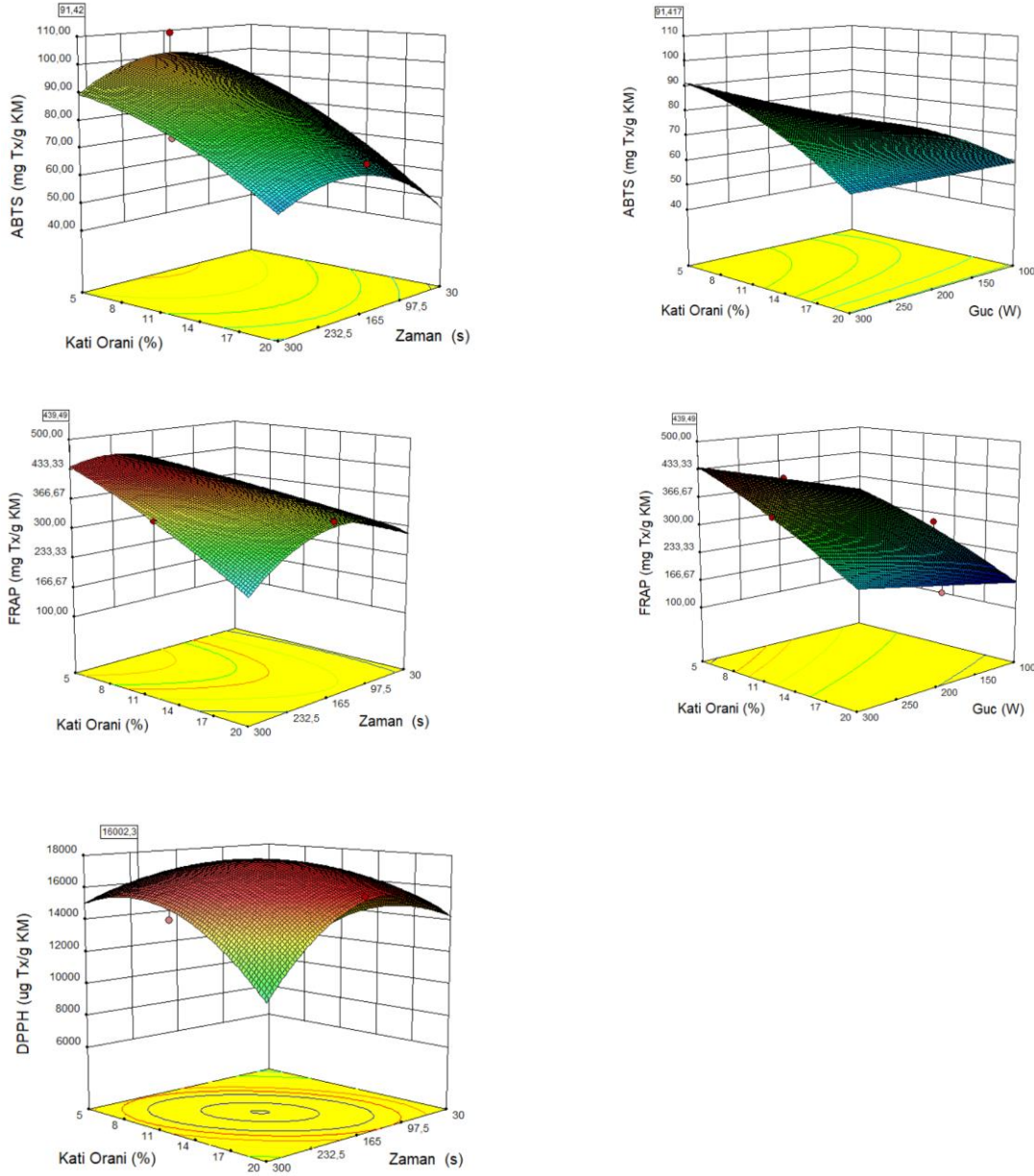
İncelenen bağımsız değişkenler arasında mikrodalga gücü Çizelge 4’de gösterildiği üzere tüm sonuç değişkenlerinde önerilen model ifadeler için istatistiksel açıdan önemlidir ($p < 0.05$). Mikrodalga gücü hedeflenen tüm sonuç değişkenleri için istatistiksel açıdan anlamlı lineer etkiye sahiptir. Ayrıca irridasyon süresinin de üstel etkisinin tüm sonuç değişkenleri için en etkin bağımsız değişken olduğu yine ANOVA çizelgesinden düşük p-değeri yardımıyla tespit edilmiştir. İrridasyon süresindeki değişimin takip edilen tüm sonuç değişkenlerine etkisinin anahtar bir değişken olacağı ve süredeki küçük değişimlerin büyük etkilere neden olacağı ön görülmektedir. Sabit son hacim içerisinde kullanılan katı madde yüzdesinin de takip edilen sonuç değişkenleri üzerine etkisi DPPH hariç önemli etkiye sahiptir. DPPH için ise bu değişkenin üstel etkisinin daha önemli olduğu ortaya konulmuştur. Bağımsız değişkenlerin incelenen değer aralıklarında takip edilen sonuç değişkenlerine ortak etkilerinin sınırlı olduğu, irridasyon süresi ile katı miktarı arasındaki etkileşimin TFM, DPPH ve FRAP değişkenleri için önemli olduğu görülmektedir.

Bağımsız değişkenlerin sonuç değişkenlerine eş zamanlı etkileri Şekil 2’deki yanıt yüzey etkileşim grafiklerinde verilmiştir. Süre ile katı oranının hedef sonuç değişkenleri üzerindeki etkileşimi ilk sütunda verilen grafiklerde görülmektedir. Yüksek katı içeren ortamlarda irridasyon süresi biyoaktif bileşenlerin ekstraksiyonu için sınırlı kalmakla birlikte süre artışı başlangıçta ekstraksiyon verimini arttırırken belirli bir noktadan sonra azalmaya neden olmaktadır. Daha düşük katı miktarlarında sürenin etkisi önemli olup genel olarak en az katının kullanıldığı ortamlarda en yüksek değerlere ulaşmaktadır. Ortamda bulunan katının artmasıyla sıvıya geçen bileşenlerin miktarında artış olması beklenmektedir. Bu durum beklenen bir sonuç olmamakla birlikte seçilen sonuç değişkeni ekstraksiyon yoğunluğu olduğundan birim katı başına ortama salınan biyoaktif madde miktarındaki artış anlamlıdır. Literatürde farklı çalışmalarda farklı sonuç değişkeni seçilmekte ve yapılan yorumlar bu sonuç değişkenlerine göre değerlendirilmektedir. Benzer şekilde incelen tüm ekstraksiyon sürelerinde azalan madde miktarıyla birim katı başına ekstrakte edilen biyoaktif bileşen miktarı genel olarak artmaktadır. Bu artış TFVM için üst zaman değerinde (300 s) görülürken, TFM, FRAP ve ABTS için nispeten daha düşük bir zaman aralığında (165-225 s) maksimize olmaktadır. DPPH için elde edilen grafikte ise hem düşük hem de yüksek katı oranında optimuma ulaşıldığı, madde miktarı ve irridasyon süresinin birlikte artışının DPPH aktivitesinde azalmaya neden olduğu görülmektedir. Xu vd. (2017) MDE’de uzun irridasyon süresinin ortam sıcaklığını arttırması

nedeniyle sıcaklığa hassas bileşenlerin bozunmasına neden olacağını ifade etmektedir [26]. Dolayısıyla DPPH aktivitesini etkileyen bileşenlerin sıcaklığa karşı hassasiyeti olduğu söylenebilir.

Mikrodalga gücü ve katı oranı etkileşim grafiklerinde incelenen tüm katı değerlerinde mikrodalga gücü arttıkça ekstraksiyon verimi de artmaktadır. Benzer şekilde tüm güç değerlerinde azalan katı miktarında birim katı başına ekstrakte edilen madde miktarında da artış gözlenmektedir. Öte yandan yüksek güç değerindeki artış düşük güç değerindeki artıştan daha belirgindir. Katı-sıvı oranının nar kabuğu biyoaktif bileşen çözünmesine etkisine baktığımızda çözelti konsantrasyonundaki gradient farkının artması bileşenlerin çözünürlüğünü de arttırmaktadır. Ekstraksiyonda kullanılan katı miktarı arttıkça çözücüye geçen biyoaktif bileşenin de artması, çözünen-çözücü dengesine ulaşıldığında ise sabit kalması beklenir. MDE’de mikrodalga gücünün artması çözücünün bitki materyaline penetrasyonunu hızlandırarak hücre hasarını dolayısıyla da biyoaktif bileşenin çözücü ortamına geçişini arttırır [27]. Artan katı miktarı yeterli güç olmadığında biyoaktif bileşeni bulunduğu yerden çıkaracak gücü sağlamayabilir [28]. Birim katı madde başına düşen mikrodalga güç değeri ve takip edilen sonuç değişkenine göre ortamdaki davranışta farklılıklar grafiklerden görülmektedir. Sai-ut vd. (2023) pamuk çiçeklerinden elde ettiği ekstraktların DPPH aktivitesi analizinde benzer şekilde katı oranı arttıkça DPPH aktivitesinin de arttığını, belirli bir noktadan sonra azalma olduğunu belirtmiştir [29] .





Şekil 2. Sonuç Değişkenleri için Yanıt Yüzey Etkileşim Grafikleri

BBT'ye göre yapılan deneysel çalışma sonucunda elde edilen verilerin istatistiksel analizi ile elde edilen indirgenmiş model ifadelerin sayısal optimizasyon işlemi Design Expert 10.0.4.0 yazılımı yardımıyla yapıldı. Myers ve Montgomery'nin önerdiği sayısal optimizasyon yöntemiyle yapılan optimizasyon sonucunda önerilen noktalarda deneysel doğrulama deneyleri gerçekleştirildi ve sonuçlar Çizelge 5'de verildi. Takip edilen biyoaktif sonuç değişkenlerinin maksimum olduğu noktalarda katı miktarının en düşük olduğu noktaların (%5) önerildiği görülmektedir. Bu durum seçilen sonuç değişkenimizin ekstraksiyon yoğunluğu olmasından kaynaklanmaktadır. En seyreltik durumda katı bünyesinde bulunan biyoaktif bileşenlerin sıvı ortama geçmesi beklenen bir sonuçtur. Ancak burada ortamın aşırı seyreltik olması ve konsantrasyon değerinin dikkate alınmadığı bilinmelidir. Yine incelen bağımsız değişkenlerden mikrodalga güç değerinin incelen en yüksek değerde (300 W) olduğu görülmektedir. Kullanılan ev tipi mikrodalga sisteminde daha yüksek güç değerlerinin ekstraksiyon hücresinin mekanik dayanımını ve ortam sıcaklığını (94°C) arttırmasından dolayı daha üst değerler incelenmemiştir. Ekstraksiyon süresinin ise takip edilen sonuç değişkenine göre farklılık gösterdiği çizelgeden görülmektedir. Bu durum takip edilen biyoaktif özellik ve ekstraktta bu yöntemle etkileşimde bulunan maddelerin farklı bölgelerde

optimizasyonun yapılacağını göstermektedir. Ayrıca TFVM ve ABTS optimizasyonu için aynı ekstraksiyon koşulları maksimizasyonu sağlarken, diğer yöntemler arasında özellikle irridasyon süresi açısından önemli farklılıklar olduğu dikkat çekmektedir. Design Expert 10.0.4.0 yazılımı belirlenen noktalarda yapılan deneysel çalışma sonuçları ve teorik değerlerle uyumu Çizelge 5’de verilmiştir. Doğrulama amacıyla yapılan deneylerle teorik değerlerin uyumunun yeterli olduğu görülmektedir.

Çizelge 5. Sonuç Değişkenleri için Optimum Şartlar ve Deneysel Sonuçlar

	Katı Oranı (%)	Süre (sn)	Mikrodalga Gücü (W)	Deneysel Değer	Deneysel Uyum (%)
TFVM	5	300	300	238.06 mg Qe/g KM	6.6
TFM	5	256	300	5512.12 µg GA/g KM	6.7
DPPH	12.6	179	300	20369.90 µg Tx/g KM	12.5
ABTS	5	300	300	108.75 mg Tx/g KM	6.6
FRAP	5	239	300	502.63 mg Tx/g KM	9.4

GC-MS Sonuçları

Bitkilerden elde edilen ekstraktların antioksidan kapasitesini belirlemede kullanılan analiz yöntemleri ekstrakttaki bileşenlerin kümülatif veya sinerjik/antagonistik etkisine karşılık gelir [30]. DPPH radikali yalnızca organik çözücülerini çözerken ABTS radikalleri hem su hem de organik çözücüde çözünen bileşenlerin analizini sağlar ancak her iki reaktif de sterik engellere sahiptir. FRAP reaktifi demir bağlayan, farklı reaktiviteye sahip bileşenler ile reaksiyona girer ancak kısa reaksiyon süresi ile analiz edilir [31]. Dolayısıyla aynı bitkisel materyalden, aynı ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen ekstraktların hedeflenen sonuç değişkenleri için farklı içeriğe sahip olması olağandır.

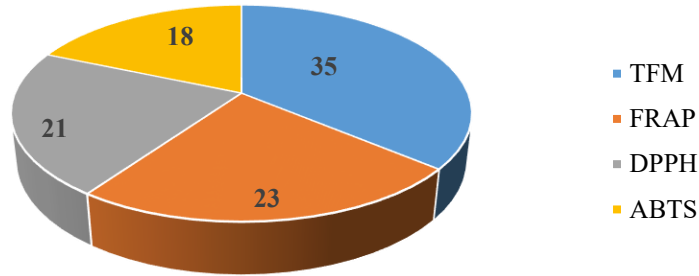
Bu çalışmada farklı sonuç değişkenleri için maksimize edilen ekstraktların bileşen profili GC-MS yardımı ile incelendi. Elde edilen bileşenlerin cihazda taranabilmesi için örnekler türevlendirildi. Türevlendirilen örneklerde öncelikle nar kabuğunun çeşitli şeker grupları ve fenolik asitler açısından zengin olduğu görüldü. Bu durum türevlendirme prosedürü ile de yakından ilişkilidir. Mikrodalga ekstraksiyon şartlarında farklı antioksidan parametrelerin optimizasyonu sonucunda elde edilen ekstraktların GC-MS analizleri sonucunda tanımlanan bileşiklerin listesi Ek 1’de verilmiştir. Tüm sonuç değişkenlerinde bulunan bazı bileşenler Çizelge 6’da verilmiştir.

Çizelge 6. GC-MS Analizinde Ortak Çıkan Bileşenler

Bileşen	FRAP	DPPH	TFM	ABTS
Butanedioic acid, bis(trimethylsilyl) ester	✓	✓	✓	✓
D-(-)-Ribofuranose, tetrakis(trimethylsilyl) ether	✓	✓	✓	✓
D-Arabinopyranose, tetrakis(trimethylsilyl) ether	✓	✓	✓	✓
Benzoic acid, 3,4,5-tris(trimethylsiloxy)-, trimethylsilyl ester	✓	✓	✓	✓
Galactopyranose, pentakis-O-(trimethylsilyl)	✓	✓	✓	✓
Gluconic acid, tetra(trimethylsilyl), ester	✓	✓	✗	✗
Sucrose TMS	✗	✗	✗	✓
Melatonin-2TMS	✓	✗	✗	✗
Glucosamine Meox1 TMS	✗	✗	✓	✗

Her bir sonuç değişkeni için optimum şartlarda elde edilen ekstraktların GC-MS analizinde, en fazla bileşen çeşidine TFM için optimize edilen şartlarda rastlanmıştır. Bu durum elektron veren tüm hidroksil gruplu yapıya duyarlı bir yöntem olan Folin-Ciocalteu metodundan kaynaklanıyor olabilir. Fenolikler

dışında bazı şeker türevleri ve organik asitler de antioksidan kapasiteye katkı sağlayan bileşenlerdir [32]. Şeker ve organik asitlerin uçuculuğunu ve kararlılığını artıran türevlendirme sonrası gerçekleştirilen analizlerde elde edilen bu bulgular ile uyum sağlamaktadır. Dolayısıyla bitkilerden elde edilen ekstraktların antioksidan kapasitesi gücüne sadece fenoliklerin değil çeşitli şeker grupları ile polar yapılı bileşenlerin de katkı sağladığı (sinerjik etki gösterdiği) söylenebilir.



Şekil 3. Farklı sonuç değişkenlerinin optimum değerlerinde bulunan ekstrakttaki ortak bileşen

Çakışan bileşenlerin en fazla gözlemlendiği antioksidan kapasite analiz yöntemleri FRAP ile DPPH yöntemi olup bu iki yöntemde 15 ortak bileşen tespit edilmiştir (Çizelge 7). Aralarındaki bu yüksek benzerlik her iki yöntemin de elektron transferine dayalı bir ölçüm prensibi ile çalışması nedeniyle yüksek korelasyona sahip olması ile açıklanabilir [33, 34]. Öte yandan ABTS yöntemi diğer yöntemlere kıyasla daha farklı bileşen içeriğine sahip olması ile dikkat çekmektedir. ABTS reaktifi hem sulu hem de organik çözücüde çözünen bir reaktiftir ki bu da daha fazla bileşen-reaktif etkileşimi sağlar. Elde edilen farklı bileşen profili çözünen bileşenlerin polaritesi ve ölçüm prensibinin yapısal farklılığından da kaynaklanıyor olabilir.

Çizelge 7. Sonuç Değişkenlerinin Ortak Bileşen Sayısı ve Benzerlik Oranları

Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemleri	Ortak Bileşen Sayısı	Korelasyon Değeri (Yaklaşık, r/N)
FRAP - DPPH	15	0.517
FRAP - TFM	15	0.349
FRAP - ABTS	9	0.281
DPPH - TFM	14	0.33
DPPH - ABTS	8	0.258
TFM - ABTS	10	0.233
Tüm sonuç değişkenlerinde	7	

Takip edilen sonuç değişkenlerinin tümünde belirlenen bileşenler polihidroksillenmiş karbonhidratlar ve karboksilik asitlerdir. Bu bileşenlerin hem hidrojen hem de elektron transferi testlerinde etkin oldukları düşünülmektedir. Literatürde yapılan bazı çalışmalarda çeşitli bileşenlerin bir arada bulunması ekstrakt bileşenlerinin sonuç değişkeni üzerinde sinerjik veya antagonistik etkisi olabileceğini göstermiştir [35]. Örneğin üzüm sırasında bulunan glukoz/früktöz şeker karışımı ile fenolik bileşenlerin sinerjik etki göstererek yüksek antioksidan aktivite sağladığı tespit edilmiştir [36].

Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları

Optimum koşullarda elde edilen ekstraktların antimikrobiyal aktiviteleri ölçülmüş ve Çizelge 8’de verilmiştir. Her bir optimum ekstrakt *S.aureus*, *E.coli* ve *P.digitalum* üzerinde farklı etki göstermiştir. Demir

vd. (2019) nar kabuğu solvent ekstraksiyonu ile elde ettiği biyoaktif bileşenlerinin *S.aureus*, *E. coli*, *Aspergillus niger* ve *A.flavus* mikroorganizmalarının gelişimi üzerinde inhibe edici özelliği olduğunu, gram (+) bakteriler üzerinde daha güçlü olduğunu, küflerde ise bakterilerden daha etkili olduğunu belirtmiştir [37]. Bu çalışmada her bir sonuç değişkeni için ayrı optimizasyon yapıldığından mikroorganizma üzerindeki etkinliği de farklılık göstermektedir. Her bir ekstrakt farklı ekstraksiyon koşullarında gerçekleştirildiğinden ekstrakt bileşimi de farklıdır. Sonuç değişkenlerinin mikroorganizma üzerinde farklı etki göstermesinin nedeni bileşen değişimindeki farklılıklardır.

Çizelge 8. Optimum Şartlarda Elde Edilen Ekstraktların Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları

DN	Sonuç Değişkenleri	Zon Çapı (mm)		
		<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i>	<i>P.digitatum</i>
1	TFVM/ABTS	26 ± 0.82	29 ± 1.41	15 ± 1
2	TFM	26 ± 1.41	28.67 ± 0.94	21 ± 1
3	DPPH	28 ± 2.16	28.67 ± 1.7	19 ± 1
4	FRAP	26.33 ± 1.25	27.67 ± 0.47	20.5 ± 0.5

4. Sonuç ve Öneriler

Nar kabuğu yüksek besleyici ve medikal açıdan değerli bileşenlere sahip önemli bir endüstriyel yan üründür. Bu çalışmada MDE ile nar kabuğunun biyoaktif bileşenlerinin yüksek verimle ekstraksiyonu optimize edilmiştir. Üç seviyede (-1, 0, +1) üç faktör (mikrodalga gücü, süre ve katı oranı) Box Behnken yanıt yüzey etkileşimi ile ekstraktların optimum antioksidan özelliğini geliştirmek üzere optimize edilmiştir. Nitekim etkili bir yeşil ekstraksiyon tekniği olan MDE ile kısa sürede yüksek ekstraksiyon verimine sahip nar kabuğu bileşenleri elde edilmiştir. Elde edilen bileşenlerin GC-MS ile kalitatif analizi yapılmış, endüstriyel açıdan önemli bileşen türlerinin olduğu ortaya konmuştur. Her sonuç değişkenine göre ayrı ayrı yapılan analiz kısmen seçici bir ekstraksiyon sağlamış; elde edilebilecek farklı bileşen türlerini elde etme fırsatı sağlamıştır. Bu çerçevede bakıldığında nar kabuğu katma değerli ürünlerin eldesi için uygun bir substrattır. Ucuz ve kolay bulunur olması işletme maliyeti açısından kritik öneme sahip parametrelerdendir. Uygun bir üretim stratejisi belirlemek, sıfır atık hedefine ulaşmaya ve atığın ekonomik değerini arttırmaya yardımcı olabilir. Bu da dünya çapında gıda ekonomisine, çevreye ve sürdürülebilirliğe katkı sağlayabilir. Daha yüksek verim, verimlilik ve endüstriyel ölçekte üretim için daha fazla çalışma yapılmalıdır.

Teşekkür

Bu çalışma Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi MF 2481 nolu Münferit Araştırma Projesi ile desteklenmiştir.

Çıkar Çatışması Beyanı

Makalenin yazarları herhangi bir kurum, kuruluş, kişi ile kişisel ve finansal çıkar çatışması olmadığını beyan etmektedirler.

Kaynaklar

- [1] Khan MSA, Ahmad I. Herbal medicine: current trends and future prospects. New look to phytomedicine: Elsevier; 2019. p. 3-13.
- [2] Zaky AA, Akram MU, Rybak K, Witrowa-Rajchert D, Nowacka M. Bioactive compounds from plants and by-products: Novel extraction methods, applications, and limitations. AIMS Molecular Science. 2024;11:150-88.
- [3] Nieto G, Martínez-Zamora L, Peñalver R, Marín-Iniesta F, Taboada-Rodríguez A, López-Gómez A, et al. Applications of plant bioactive compounds as replacers of synthetic additives in the food industry. Foods. 2023;13:47.

- [4] Zhuang D, He N, Khoo KS, Ng E-P, Chew KW, Ling TC. Application progress of bioactive compounds in microalgae on pharmaceutical and cosmetics. *Chemosphere*. 2022;291:132932.
- [5] Chole PB, Manjunath B. Nutritional, biochemical and antioxidant activities of edible and non-edible parts of *Punica granatum* L. 2024.
- [6] Mungwari CP, King'ondeu CK, Sigauke P, Obadele BA. Conventional and modern techniques for bioactive compounds recovery from plants. *Scientific African*. 2024:e02509.
- [7] Zaid NM, Sekar M, Bonam S, Gan S, Lum P, Begum M, et al. Promising natural products in new drug design, development, and therapy for skin disorders: an overview of scientific evidence and understanding their mechanism of action, *Drug Des. Dev. Ther.* 16 (2022) 23–66. 2022.
- [8] Singh B, Singh JP, Kaur A, Singh N. Phenolic compounds as beneficial phytochemicals in pomegranate (*Punica granatum* L.) peel: A review. *Food chemistry*. 2018;261:75-86.
- [9] Turker S, Polat AA, Bindak R. Seasonal changes of carbohydrates in fruit peels, leaves and shoots of three pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in upper Euphrates basin. *Scientia Horticulturae*. 2022;304:111315.
- [10] Arun N, Singh D. *Punica granatum*: a review on pharmacological and therapeutic properties. *Int J Pharm Sci Res*. 2012;3:1240.
- [11] Maphetu N, Unuofin JO, Masuku NP, Olisah C, Lebelo SL. Medicinal uses, pharmacological activities, phytochemistry, and the molecular mechanisms of *Punica granatum* L.(pomegranate) plant extracts: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2022;153:113256.
- [12] Ruan J-H, Li J, Adili G, Sun G-Y, Abuduaini M, Abdulla R, et al. Phenolic compounds and bioactivities from pomegranate (*Punica granatum* L.) peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2022;70:3678-86.
- [13] Erdoğan S. Portakal ve nar kabuğu atıklarının bisküvi ve kek üretiminde kullanım olanakları: Necmettin Erbakan University (Turkey); 2023.
- [14] Topkaya C. Nar kabuğu tozu ilavesinin keklerin besinsel, duyuşsal ve mikrobiyolojik özelliklerine etkisi: Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü; 2017.
- [15] Şencan A, Yavuzarslan MZÇ. Nar Kabuğundan Elde Edilen Aktif Karbon ile Meyve Suyundan Pestisit Adsorpsiyonu. Süleyman Demirel University Faculty of Arts and Science Journal of Science. 2022;17:577-88.
- [16] Yılmaz F, Bahtiyari Mİ. Çeşitli bitkisel kaynaklarla yünlü kumaşların renklendirilmesi. *Tekstil ve Mühendis*. 2017;24:62-71.
- [17] Kaderides K, Papaoikonomou L, Serafim M, Goula AM. Microwave-assisted extraction of phenolics from pomegranate peels: Optimization, kinetics, and comparison with ultrasounds extraction. *Chemical Engineering and Processing-Process Intensification*. 2019;137:1-11.
- [18] Alben KT. Books and Software: Design, analyze, and optimize with Design-Expert. ACS Publications; 2002.
- [19] Noriega P, Mafud DdF, Souza Bd, Soares-Scott M, Rivelli DP, Barros SBdM, et al. Applying design of experiments (DOE) to flavonoid extraction from *Passiflora alata* and *P. edulis*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2012;22:1119-29.
- [20] Karabulut I, Bilenler T, Sislioglu K, Gokbulut I, Seyhan F, Ozdemir IS, et al. Effect of fruit canopy positions on the properties of apricot (*Prunus armeniaca* L.) varieties. *Journal of Food Biochemistry*. 2018;42:e12458.
- [21] Kurtlar T. Badem ilave edilen çikolatalarda antioksidan kapasite değişimlerinin incelenmesi: Fen Bilimleri Enstitüsü; 2011.
- [22] Villaño D, Fernández-Pachón M, Moyá ML, Troncoso A, García-Parrilla M. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*. 2007;71:230-5.
- [23] Nenadis N, Wang LF, Tsimidou M, Zhang HY. Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS assay. *J Agr Food Chem*. 2004;52:4669-74.
- [24] Yıldırım A, Gül A, Başaran N, Şen A, Bitiş L, Tanyıldızı MŞ. Anti-inflammatory activities of some *Anthemis* species used in the treatment of inflammation-related diseases, GC/MS and LC-MS/MS analysis with bioactivity-guided fractionation. *South African Journal of Botany*. 2024;168:286-95.
- [25] Tisza S, Sass P, Molnár-Perl I. Optimization of the simultaneous determination of acids and sugars as their trimethylsilyl (oxime) derivatives by gas chromatography-mass spectrometry and determination of the composition of six apple varieties. *Journal of Chromatography A*. 1994;676:461-8.
- [26] Xu D-P, Li Y, Meng X, Zhou T, Zhou Y, Zheng J, et al. Natural antioxidants in foods and medicinal plants: Extraction, assessment and resources. *International journal of molecular sciences*. 2017;18:96.
- [27] Özbek HN, Yanık DK, Fadiloğlu S, Göğüş F. Optimization of microwave-assisted extraction of bioactive compounds from pistachio (*Pistacia vera* L.) hull. *Separation Science and Technology*. 2020;55:289-99.
- [28] Dahmoune F, Spigno G, Moussi K, Remini H, Cherbal A, Madani K. *Pistacia lentiscus* leaves as a source of phenolic compounds: Microwave-assisted extraction optimized and compared with ultrasound-assisted and conventional solvent extraction. *Industrial crops and products*. 2014;61:31-40.

- [29] Sai-Ut S, Kingwascharapong P, Mazumder MAR, Rawdkuen S. Optimization of polyphenolic compounds from *Gossampinus malabarica* flowers by microwave-assisted extraction technology. *Future Foods*. 2023;8:100271.
- [30] Danet AF. Recent advances in antioxidant capacity assays: IntechOpen; 2021.
- [31] Gulcin İ, Alwasel SH. Metal ions, metal chelators and metal chelating assay as antioxidant method. *Processes*. 2022;10:132.
- [32] Everette JD, Bryant QM, Green AM, Abbey YA, Wangila GW, Walker RB. Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin– Ciocalteu reagent. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2010;58:8139-44.
- [33] Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*. 1999;26:1231-7.
- [34] Real R, Vargas JM. The probabilistic basis of Jaccard's index of similarity. *Systematic biology*. 1996;45:380-5.
- [35] Hajimehdipoor H, Shahrestani R, Shekarchi M. Investigating the synergistic antioxidant effects of some flavonoid and phenolic compounds. *Research journal of pharmacognosy*. 2014;1:35-40.
- [36] Peinado J, López de Lerma N, Peinado RA. Synergistic antioxidant interaction between sugars and phenolics from a sweet wine. *European Food Research and Technology*. 2010;231:363-70.
- [37] Demir T, Akpınar Ö, Kara H, Güngör H. Nar (*Punica granatum* L.) kabuğunun in vitro antidiyabetik, antienflamatuar, sitotoksik, antioksidan ve antimikrobiyal aktivitesi. *Akademik Gıda*. 2019;17:61-71.

Ekler

Ek 1: Nar Kabuğu Optimize Edilen Ekstraktların Bileşen Değişimi

RT	Bileşenler	FRAP	DPPH	TFM	TFVM/ABTS
9,611	Butanedioic acid, bis(trimethylsilyl) ester (CAS)	+	+	+	+
14,506	D-(-)-Lactic acid, trimethylsilyl ether, trimethylsilyl ester			+	
15,329	Acetic acid, [(trimethylsilyl)oxy]-, trimethylsilyl ester		+	+	
26,87	Propanoic acid, 2,3-bis[(trimethylsilyl)oxy]-, trimethylsilyl ester		+	+	
32,332	Malic acid, tris(trimethylsilyl) ester	+	+	+	
34,343	Threonic Acid,O,O,O,O-TMS			+	
34,346	L-Threonic acid, tris(trimethylsilyl) ether, trimethylsilyl ester		+		
34,868	1,2-Benzenedicarboxylic acid, diethyl ester (CAS)			+	
36,347	1,5-Anhydro-D-sorbitol, tetrakis(trimethylsilyl) ether		+	+	+
36,465	D-(-)-Ribofuranose, tetrakis(trimethylsilyl) ether (isomer 1)	+	+	+	+
36,57	D-Arabinopyranose, tetrakis(trimethylsilyl) ether (isomer 1)	+	+	+	+
36,762	D-(+)-Ribono-1,4-lactone, tris(trimethylsilyl) ether			+	
36,944	Mannose, 6-deoxy-2,3,4,5-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-, L-			+	
37,61	Gluconic acid, 2-methoxime, tetra(trimethylsilyl)-, trimethylsilyl ester		+	+	
40,738	4-Nitrophenyl-.beta.-D-galacturonide, tris(trimethylsilyl) ether, trimethylsilyl ester	+	+	+	
41,744	Glycoside, .alpha.-methyl-trtrakis-O-(trimethylsilyl)-			+	
42,076	D-(-)-Fructofuranose, pentakis(trimethylsilyl) ether (isomer 2)	+	+	+	+
42,279	1,2,3-Propanetricarboxylic acid, 2-[(trimethylsilyl)oxy]-, tris(trimethylsilyl) ester			+	
42,368	Sorbopyranose, 1,2,3,4,5-pentakis-O-(trimethylsilyl)-, L-		+	+	+
43,184	L-Altrose, 2,3,4,5,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)- (CAS)	+	+	+	+
43,389	N,O,O'-tris-(trimethylsilyl) aspartic acid	+		+	+
43,53	.beta.-D-Allopyranose, pentakis(trimethylsilyl) ether			+	
44,105	.alpha.-L-Galactofuranose, 6-deoxy-1,2,3,5-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-			+	+
44,66	.beta.-D-Allopyranose, pentakis(trimethylsilyl) ether	+		+	
45,016	Glucosamine Meox1 TMS			+	
45,412	Trimethylsilyl ether of glucitol	+	+	+	+
45,535	Ethyl 2,3,4,6-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-D-glucopyranoside		+	+	+
45,685	Benzoic acid, 3,4,5-tris(trimethylsiloxy)-, trimethylsilyl ester	+	+	+	+
46,761	Galactopyranose, 1,2,3,4,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-, .beta.-d-	+	+	+	+
47,213	Glucoheptonic Acid TMS	+	+	+	
49,243	Myo-Inositol, 1,2,3,4,5,6-hexakis-O-(trimethylsilyl)-	+		+	
65,67	2-O-methylbaeomycesic acid	+	+	+	+
36,58	DL-Arabinopyranose, tetrakis(trimethylsilyl) ether				+
40,981	D-(-)-Tagatofuranose, pentakis(trimethylsilyl) ether (isomer 2)		+		+
43,019	Glucufuranoside, methyl 2,3,5,6-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-, .alpha.-D-				+
44,044	[3,5-Di(trifluoromethyl)pyrazol-4-yl]glycine				+
44,682	D-(+)-Galactopyranose, pentakis(trimethylsilyl) ether (isomer 1)		+		+
45,826	Glucopyranose, 1,2,3,4,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-, D-				+
48,913	L-Fucitol, pentakis(trimethylsilyl) ether				+
49,257	İnositol,O,O,O,O,O-TMS		+		+
61,391	Sucrose TMS				+
65,726	D-Lactitol, nonakis(trimethylsilyl) ether				+
36,947	.beta.-L-(-)-Fucopyranose, tetrakis(trimethylsilyl) ether		+		
41,743	Mannose, 6-deoxy-2,3,4,5-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-, L-	+	+		
42,332	Per(trimethylsilyl)-D-lyxose		+		
45,166	Levoglucosan, tris(trimethylsilyl)-		+		
66,62	Gusation A	+	+		
70,76	4-(2',4'-dimethoxy-6'-propylbenzoyloxy)-2-hydroxy-6-pentylbenzoic acid		+		
74,119	Arsenous acid, tris(trimethylsilyl) ester (CAS)		+		
43,533	d-(+)-Xylose, tetrakis(trimethylsilyl) ether		+		
37,934	4,6-Dioxoheptanoic acid, tris-(O-trimethylsilyl)-	+			
41,465	Citric acid-TetraTMS	+			
42,296	[1,1'-Biphenyl]-4-carboxylic acid, trimethylsilyl ester (CAS)	+			
42,579	D-Allofuranose, pentakis(trimethylsilyl) ether	+			
43,852	Melatonin-2TMS	+			
44,072	d-(+)-Gluconic acid .delta.-lactone, tetrakis(trimethylsilyl) ether	+			
44,516	2-Deoxy-D-ribose, tris(trimethylsilyl) ether, trimethylsilyloxime (isomer 2)	+			
70,893	Nakijiquinone B	+			