

# Gelişmiş Ekstraksiyon Teknikleri I

Geliş tarihi : 20.12.2011  
Düzeltilme tarihi : 27.02.2012  
Kabul tarihi : 08.03.2012

**Ebru Büyüktuncel\*<sup>o</sup>**

## *Giriş*

Nitel ve nicel analiz, bir örnek hazırlama işlemine karar verir. Ekstraksiyon basamağı, çoğu analitik işlemlerin vazgeçilmez bir parçasıdır. 1879 yılında F. Soxhlet tarafından geliştirilen ve 1980'lerin ortalarına kadar çok popüler olan Soxhlet ekstraksiyonu günümüzde hala rutin laboratuvarların çoğunda kullanılmaktadır. Son yıllarda gelişmiş ekstraksiyon tekniklerine artan bir talep olmuştur. Bunun nedeni, otomasyona uygun olması, ekstraksiyon zamanının kısalması, organik solvent tüketiminin azalması, analitik laboratuvarlarında kirliliğin önlenmesi ve örnek hazırlama maliyetindeki azalmadır<sup>1,2</sup>.

Yeni teknolojilerin gelişimine paralel olarak, ekstraksiyon prensiplerinin temel anlayışı ilerlemiştir. Bu ilerleme, örnek hazırlamada yeni yönelimlere yol açmıştır. Bunlar, mikroekstraksiyon, minyatürleştirme ve analitik işlemlerde kullanılan örnekleme, ayırma ve kantitasyon basamaklarının entegrasyonudur<sup>3</sup>. Bu yüzden örnek hazırlamada, klasik ekstraksiyon tekniklerinin yerini mikrodalga-destekli ekstraksiyon, süperkritik sıvı ekstraksiyonu, basınçlı sıvı ekstraksiyonu (veya hızlandırılmış solvent ekstraksiyonu), sonikasyon-destekli sıvı ekstraksiyonu gibi teknikler almıştır. Bu teknikler arasındaki benzerlik, ekstraksiyon olayının hızını önemli ölçüde artıran, yüksek sıcaklık ve basınçta çalışma olasılığıdır.

---

\* İnönü Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Ab. D., Malatya  
<sup>o</sup> Corresponding author: E-mail: saliha.buyuktuncel@inonu.edu.tr

### *Örnek Önişlemleri*

Bir örneğin analizi; örnekleme, örnek hazırlama, örnek analizi ve veri işleme olmak üzere dört farklı basamaktan oluşur. Örnek önişlemleri, modern analitik metodolojinin örnek hazırlama basamağında önemli bir rol oynar ve örnekleme ile birlikte anahtar basamaklardan birisidir. Aynı zamanda, analizin en fazla hataya eğilimi olan kısmıdır. Örnek önişleminin amacı, ilgilenilen analitleri matriksten izole etmek ve analizin seçiciliğini, tayin edilebilirliğini, güvenilirliğini, doğruluğunu ve tekrarlanabilirliğini artırmaktır. Örnek hazırlama, kirli olarak adlandırılan kompleks örnekler için çoğunlukla temizleme işlemlerini içerir. Buna ilaveten, genellikle analitlerin analitik yöntem tarafından ölçülebilen uygun seviyeye zenginleştirilmesi gereklidir.

Gerekli örnek hazırlama, örneğin doğasına ve kullanılan analitik metoda bağlıdır. Örnek matriksleri, organik veya inorganik olarak sınıflandırılabilir ve katı, sıvı veya gaz şeklinde alt gruplara ayrılabilir. Örneğin homojenizasyonu ve kurutması, genelde örnek işleminin ilk basamaklarıdır. Bir sonraki örnek önişlem basamağı genellikle ekstraksiyondur. Çok yaygın ön işlem yöntemleri Tablo 1'de liste halinde verilmiştir<sup>4</sup>.

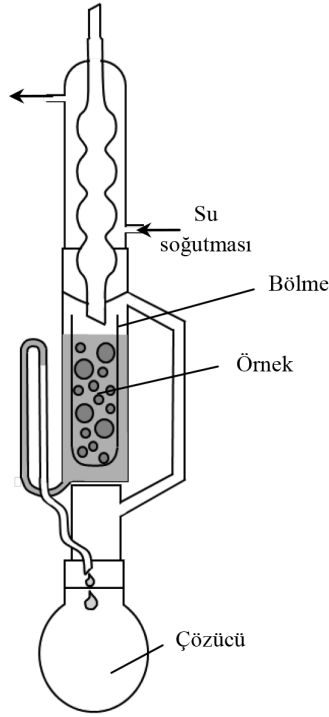
### *Soxhlet Ekstraksiyonu*

Soxhlet ekstraksiyonu özel bir cihazda gerçekleştirilir (Şekil 1). Katı veya yarı-katı numuneler için uygundur. Soxhlet ekstraktörü, en eski ekstraksiyon sistemlerinden biridir ve hala geniş ölçüde kullanılmaktadır. Soxhlet ekstraktörü, bir solvent şişesi, orta çemberde bir sıvı akış borusu (sifon), soğutulmuş bir kondansör (yoğuşturucu) ve ısıtma sisteminden meydana gelmiştir.

Katı örnek, orta çemberin içindeki ekstraksiyon bölmesinin içine yerleştirilir. Solvent bunun altındaki solvent şişesinin içine konur. Solvent kaynama sıcaklığının üzerinde ısıtılır ve kaynayan solventten gelen buharlar yoğunlaşmanın olduğu kondansatöre hareket eder; yoğunlaşır, örneğe doğru damlar. Solvent örneği ıslatır ve daha sonra solvent seviyesi sifonun tepesine ulaşır ulaşmaz, solvent tüm örnek bölmesini boşaltarak, solvent şişesine geri damlamaya başlar. Böylece sıcak solvent birkaç kere örnek içerisinde sirküle olur. Ekstrakte olan analitler solvent şişesinin

**TABLO II**  
En yaygın kullanılan örnek önışlem teknikleri

<b>Yöntem</b>	<b>Örnek tipi</b>
Tartma	Sıvı, katı
Kurutma	Gaz, sıvı, katı
Fitrasyon	Sıvı
pH ayarlama	Sıvı
Homojenizasyon	Katı
Öğütme (Grinding)	Katı
Çöktürme	Biyolojik örnekler
Karıştırma	Gaz, sıvı, katı
Özümseme (Digestion)	Katı biyolojik örnekler
Hücre parçalanması (cell disruption)	Katı, sıvı biyolojik örnekler
Diyaliz	Sıvı
Ultrafiltrasyon	Sıvı
Harmanlama, karıştırma (blending)	Katı
Lipofilizasyon (Freeze-drying)	Katı örnekler, biyolojik örnekler
Sonikasyon	Sıvı, katı
İz zenginleştirme (trace enrichment)	Tümü
Santrifüjleme	Sıvı
Seyreltme	Sıvı
Solvent deęiştirme	Sıvı
Soxhlet ekstraksiyonu	Katı
Sıvı-sıvı ekstraksiyonu	Sıvı
Sıvı-katı ekstraksiyonu	Sıvı, gaz
Süperkritik akışkan ekstraksiyonu	Katı
Gaz boşluğu (Headspace) teknikleri	Gaz, sıvı, katı
Mikrodalga destekli ekstraksiyon	Sıvı, katı
Ses dalgaları destekli ekstraksiyon	Sıvı, katı
Matriks katı-faz dispersiyonu	Sıvı, katı
Basınçlı sıvı ekstraksiyonu	Katı, yarı-katı
Su buharı distilasyonu ekstraksiyonu	Sıvı, katı
Katı-faz mikro ekstraksiyon	Sıvı, gaz
Membran ekstraksiyonu	Sıvı, gaz
Karıştırma çubuğu sorptif ekstraksiyonu (Stir bar sorptive extraction)	Sıvı, gaz
Türevlendirme	Sıvı, katı
Deriştirme	Tümü
Kolon kromatografisi	Sıvı (ekstraktlar)
İç standart ekleme	Tümü



**Şekil 1**  
Soxhlet ekstraktör cihazı

içinde kalırken, yalnızca temiz solvent buharlaştığından, her dolaşımında taze solvent kullanılır. Çevrim sayısını ve ekstraksiyon zamanını rapor etmek daha iyi bir karşılaştırma için önemlidir. Tipik ekstraksiyon zamanları 6 saatten 24 saate kadardır ve oldukça büyük solvent hacimleri (100-500 mL) gereklidir. Ekstraksiyon solventleri genellikle saf organik solventler veya bunların karışımlarıdır. Soxhlet ekstraksiyonu, esas olarak organik bileşiklerin katı örneklerden ekstraksiyonunda kullanılır. Bileşikler, solventin kaynama sıcaklığında termal olarak kararlı olmalıdır. Eşzamanlı ekstraksiyona izin veren Soxhlet cihazı çok düşük maliyetle temin edilebilir. Yöntemin kullanılması esnasında karşılaşılan problemler örnek bölmesinin temizliğinden kaynaklı olabilir. Kullanmadan önce, temiz bir solventle ekstrakte ederek temizlemek en iyisidir<sup>4</sup>.

Geleneksel Soxhlet ekstraksiyonu bazı cazip avantajlara sahiptir. Örnek, sürekli olarak taze solvent ile temas halindedir. Böylece matriksten analitin uzaklaştırılması artar. Distilasyon balonuna uygu-

lanan ısıyla, ekstraksiyon kavitesine ulaşıldığından, sistemin sıcaklığı oda sıcaklığından daha yüksek olur. Sistem bu yüksek sıcaklıkta değişmeden kalır. Ayrıca, özütlemeyen sonra filtrasyona gerek kalmaz ve örnekten üretilen madde miktarı, birkaç eşzamanlı ekstraksiyon paralel olarak gerçekleştirilerek arttırılabilir. Düşük maliyetli basit ekipman kullanılması buna olanak sağlar. Dahası, Soxhlet ekstraksiyonu az uğraş gerektiren çok basit bir metodolojidir. En son kullanılan alternatiflerinin çoğundan (mikrodalga destekli ekstraksiyon, süperkritik sıvı ekstraksiyonu gibi) daha fazla miktarda örnek kütlesi ekstrakte edilebilir<sup>5,6</sup>.

Soxhlet ekstraksiyonunun diğer katı örnek hazırlama teknikleriyle karşılaştırıldığında en önemli dezavantajları, uzun zaman gerektirmesi ve büyük miktarda organik solvent kullanmasıdır. Çok miktarda solventin zararsız hale getirilmesi yalnızca pahalı değil, aynı zamanda çevresel problemlerin kaynağıdır. Örnekler genellikle solventin kaynama noktasında uzun süre ekstrakte edilir. Bu da termal olarak kararsız olan hedef türlerin bozunmasına yol açabilir. Geleneksel Soxhlet cihazı, sürecin hızlanmasına yardımcı olan çalkalama sağlamaz. Büyük miktarlarda solvent kullanıldığından, ekstraksiyon sonrası buharlaştırma/deriştirme basamağı zorunludur. Soxhlet tekniği solvent seçiciliği ile sınırlıdır ve otomasyonu zordur<sup>6,7</sup>.

Aynı temel prensibe dayanan Soxhlet ekstraktörlerinin modern versiyonları geliştirilmiştir. Bunlar, basınçlı Soxhlet ekstraksiyonu, otomatikleştirilmiş Soxhlet ekstraksiyonu, ses dalgaları destekli Soxhlet ekstraksiyonu ve mikrodalga destekli Soxhlet ekstraksiyonudur.

Soxhlet ekstraksiyonu yüzyıldan fazla zamandır avantajlarını kanıtlamıştır. Bu avantajlar çoğu eksikliklerin üstesinden gelmiştir. Bunları şöyle sıralayabiliriz:

1. Basınçlı Soxhlet ekstraksiyonunda, örnek kartuşuna uygulanan basıncın artmasıyla, solventin katı örneğe nüfuz etmesi kolaylaşmıştır. Bunun sonucu ekstraksiyon zamanı kısalmış ve solvent hacmi de azalmıştır. Bununla beraber yüksek basınçta çalışmak, deneysel kurulumu zorlaştırmaktadır.

2. Otomatikleştirilmiş Soxhlet ekstraksiyonunda kullanılan farklı özellikteki birkaç ticari ekstraktörün ortak paydası: ekstraksiyon süresini kısaltma, ekstraktant (ekstraksiyon yapan madde) hacmini azaltma ve birkaç örneğin eş zamanlı ekstraksiyonuna olanak sağlamaktır. Bu

cihazların en önemli kusuru yüksek maliyet ve çok yönlü olmamasıdır.

3. Dış enerjilerle ekstraksiyonun desteklenmesi (ultrasonik enerji ve mikrodalga kullanımı) Soxhlet ekstraksiyonunun eksiklerinin giderilmesi için en iyi alternatiftir<sup>6</sup>.

### *Uygulamaları*

Soxhlet ekstraksiyonu hem çevresel analizlerde, hem de gıda analizlerinde uygulanmıştır. Falandysz ve arkadaşları balıkta poliklorlu bifenilleri tayin etmişlerdir. Balıkların kas dokuları alınmış ve homojenize edilmiştir. Petri kaplarında dondurulmuş ve liyofilize edildikten sonra heksan ile Soxhlet cihazının gelişmiş bir versiyonunda (Soxtec HT6) ekstrakte edilmiştir. Analiz gaz kromatografisi-elektron yakalama dedektöründe (GC-ECD) gerçekleştirilmiştir<sup>8</sup>. Diagne ve arkadaşları, Soxhlet ekstraksiyonu yöntemiyle fasülyeden organofosforlu bir insektisit olan fenitrotiyon kalıntılarını ekstrakte etmişlerdir<sup>9</sup>. 10 g örnek 24 saat boyunca 200 mL diklormetan ile solventin kaynama sıcaklığında muamele edilmiştir. Daha sonra uçurularak zenginleştirilen örnek yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve GC-ECD ile tayin edilmiştir.

### *Basınçlı Sıvı Ekstraksiyonu (Pressurized Liquid Extraction, PLE)*

Ekstraksiyon için oldukça yeni bir tekniktir. Hızlandırılmış solvent ekstraksiyonu olarak da adlandırılır. Örneği sızdırmaz bir yüksek basınç ortamında tutarak, geleneksel solventler için daha yüksek sıcaklıklar kullanılmasına izin veren bir ekipman kullanır. Yükseltilmiş basınç, solventin daha yüksek sıcaklıklarda sıvı halde bulunmasını sağlar. PLE'de verim ve seçiciliği etkileyen kritik faktörlerden biri ekstraksiyon sırasında uygulanan sıcaklıktır. Yüksek sıcaklıkların kullanımı, van der Waals kuvvetleri, hidrojen bağı ve dipol çekim gibi analit-örnek matriksi etkileşimlerinin bozulmasına yardımcı olarak ekstraksiyon verimini artırır<sup>10</sup>. Termal enerji kullanımı benzer moleküller arasındaki kohezyon ve farklı moleküller arasındaki adhezyon kuvvetlerinin üstesinden gelmesine yardımcı olur. Bu durumda geribırakma (desorpsiyon) süreci için gerekli aktivasyon enerjisi azalır. Yükseltilmiş sıcaklık solventin, çözünenin ve matriksin yüzey gerilimini düşürür. Bu yüzden örneğin ıslanması artar. Solvent yüzey geriliminde azalma, solvent kavitesinin daha kolay

oluşmasını sağlar. Böylece analitlerin solventte daha hızlı çözünmesine izin verilir<sup>11</sup>. Artan sıcaklık sıvı solventin viskozitesini azaltır ve matriks partiküllerinin içine girmesini kolaylaştırır. Sıcaklık, güçlü analit ve matriks etkileşimlerinin bozulmasına yardım eder ve denge zamanını kısaltan difüzyon hızlarını artırır. Bu durum özellikle difüzyon kontrollü örneklerde daha hızlı ekstraksiyonlara izin verir. PLE'nin temel özelliği, gerekli solvent miktarını önemli ölçüde azaltırken, ekstraksiyon sürecinin hızını artıran yüksek difüzyon sınırları kullanmasıdır<sup>12</sup>. Yükseltilmiş sıcaklık nedeniyle ekstraksiyon kinetiği de daha hızlıdır. PLE'nin amacı, yüksek sıcaklık ve basınç kullanarak sıvı ekstraksiyonunu geliştirmektir. Yüksek sıcaklık ve basınç, solventin örnek matriksinin içine nüfuz etme kabiliyetini artırır. Genellikle ekstraksiyon, solventin atmosferik kaynama noktasının üstündeki bir sıcaklıkta gerçekleştirilir. Analitlerin yayılma gücü ve çözünürlüğü, artan sıcaklıkla artmaktadır. Bu ekstraksiyonu daha hızlı ve daha etkin yapmaktadır<sup>10, 13</sup>. Ekstraksiyon sırasında uygulanan basıncın temel avantajı, sıcaklık kaynama noktasının üzerine çıksa bile solventin sıvı durumunda kalmasıdır. Ekstraksiyon esnasında yüksek basınç, solventin analite ulaşmasını engelleyen, matrikste bulunan hava kabarcıkları ile ilgili problemleri kontrol eder. Bu koşullar analitin çözünürlüğünü ve matriksten desorpsiyon kinetiğini artırır<sup>14</sup>.

Bu yüzden tüm süreç Soxhlet ekstraksiyonundan daha hızlıdır. Isıtma sonrasında ekstraksiyon hücresi, solventin normal kaynama sıcaklığının altına kadar soğutulur. Daha sonra hücreye yüksek basınç uygulanır. Bu basınç, solvent ve ekstrakte edilen materyali bir filtreden geçerek dışarıya çıkmaya zorlar. Ekstraksiyon kinetiğini artıran 200°C'ye kadar yükseltilmiş sıcaklıkların kullanılmasından dolayı, solventin kaynamasını önlemek için 20 MPa kadar basınç gereklidir. Gerekli solvent miktarı, geleneksel sıvı ekstraksiyon yöntemlerinde kullanılan miktardan daha azdır. PLE'nin sınırlaması, ısısal kararlı olmayan örnekler için uygun olmamasıdır<sup>15</sup>.

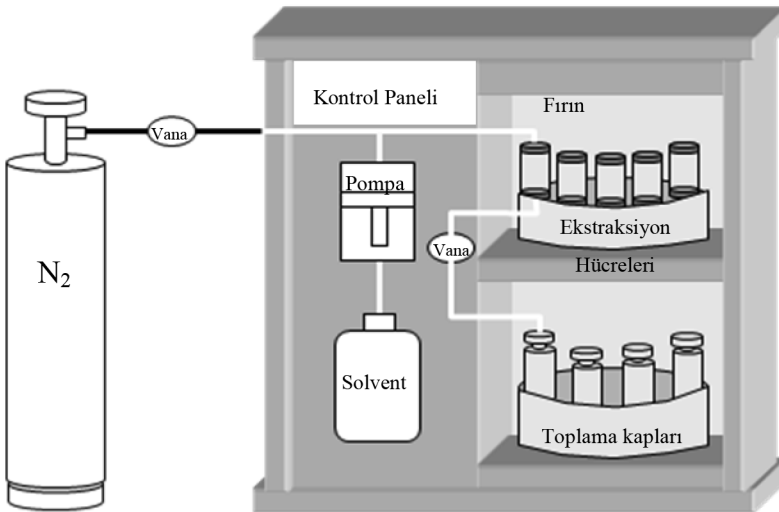
Bununla birlikte olası en yüksek sıcaklık ve basınç, mutlaka en yüksek verimle sonuçlanmaz. Bozucu etki de yapabilir. Ayrıca ekstraksiyon verimini etkileyen birkaç değişken daha vardır. Bunlar; ekstraksiyon zamanı, solvent seçimi, solvent hacmi ve yüklenen örnek miktarıdır. Orijinal örneğin bileşimine (organik bileşim, su içeriği, partikül boyutu ve heterojenite) ek olarak, örnek ön hazırlama teknikleri de (kurutma, öğütme gibi) sonucu etkileyebilir<sup>16</sup>.

PLE statik modda, dinamik modda veya bunların kombinasyonuyla gerçekleştirilebilir. Dinamik modda, solvent örneğin içinden akar. Statik basınçlı sıvı ekstraksiyonu manuel olarak kapalı bir kaptan gerçekleştirilebilir. Fakat ekstraksiyon daha çok otomatik bir enstrümanla gerçekleştirilir. Tipik bir PLE sistemi, bir fırın, ekstraksiyon hücresi, pompa ve basınç altında tutan sistem, birkaç vana ve toplama kaplarından oluşur (Şekil 2)<sup>17</sup>.

Statik ekstraksiyon modu şu basamakları içerir:

1. Ekstraksiyon hücresine örneğin yüklenmesi
2. Hücrenin organik solvent ile doldurulması
3. Hücrenin sıcaklık ve basıncının ayarlanması
4. Örneğin belirli bir zaman ekstrakte edilmesi
5. Basıncın serbest bırakılarak solventin toplama kabına transfer edilmesi. Tüm ekstraktın toplama kaplarına ulaşmasını sağlamak için hücrenin temiz solventle yıkanması
6. Uygun bir gaz kullanarak örnekten solvent atıklarının temizlenmesi

PLE sisteminde toplanan hacim miktarı hücre büyüklüğüne bağlıdır. 10-100 mL arasında olabilir. Bu yüzden son ekstraktı deriştirmek için



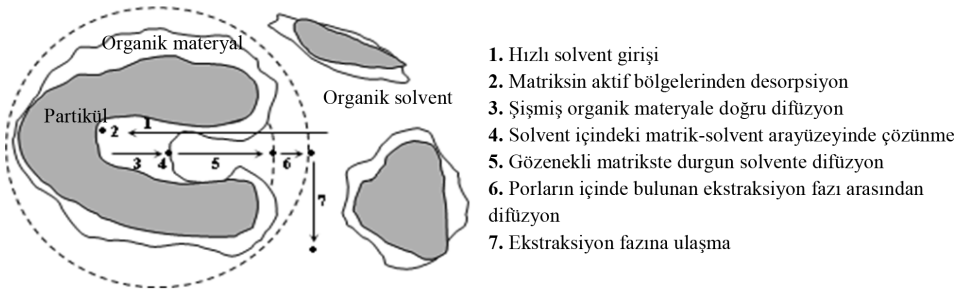
**Şekil 2**  
PLE sistemi



buharlaştırma basamağı gereklidir<sup>17</sup>.

Örnek ekstraksiyon hücresine yüklenmeden önce, genellikle önışlem uygulanır. Toprak ve benzeri matrikslere hava ile kurutma (24-48 saat) ya da dondurarak kurutma uygulanır<sup>18, 19</sup>. Örneğin kurutulması önemlidir. Çünkü matriksteki su ekstraksiyon verimini düşürür. Soxhlet ve süperkritik akışkan ekstraksiyonunda, yüksek miktarda suyla başa çıkmak için örneğe sodyum sülfat eklenmesi önerilmiştir<sup>20,21</sup>. Kurutma basamağını çoğunlukla eleme (2 mm elek)<sup>22</sup> veya örneğin 100-1000 µm aralığında bir boyuta öğütülmesi izler<sup>23</sup>. Örneğin daha küçük boyutlara öğütülmesi (<15µm), kısaltılmış difüzyon yol uzunluğundan dolayı analitin partikül yüzeyine taşınmasını kolaylaştırmada avantaj sağlayabilir<sup>16</sup>.

Ekstraksiyon verimi, örnek matriksinin doğasına, ekstrakte edilen analite ve analitin matriks içindeki yerine bağlıdır. Heterojen örneklerin ekstraksiyon süreci Pawliszyn tarafından 2003 yılında bir model çizilerek açıklanmıştır<sup>3</sup>. Bu model örnek partikülünün gözenekli ve bir organik katman tarafından sarıldığını varsaymıştır. Ekstraksiyon ve analitin örnek matriksinden geri kazanımı birkaç basamakta belirtilebilir. İlk olarak analitin ekstraksiyon kabından uzaklaştırılabilmesi için, bileşik örnek matriksindeki etkin bölgelerden geri bırakılır. Daha sonra matriks-sıvı arayüzeyine ulaşabilmek için, matriksin organik kısmına doğru difüze olur. Bu safhada analit, ekstraksiyon fazına dağılır. Sonra porların içinde bulunan ekstraksiyon fazı arasından difüze olur ve taşınım yoluyla ekstraksiyon fazı kısmına ulaşır (Şekil 3). Ekstraksiyon sürecinin son aşaması ekstrakte edilen analitin toplanmasıdır<sup>3,17</sup>.



**Şekil 3**

Organik bir solvent tarafından sarılan bir toprak veya sediment partikülünün genelleştirilmiş bir modeli için PLE'de ekstraksiyon basamakları<sup>24</sup>.

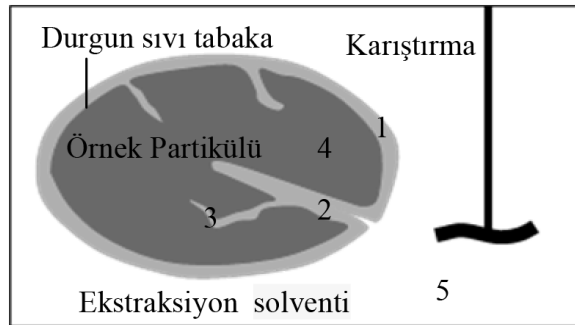
Ekstraksiyon sürecindeki kritik bir basamak, analitin örnek matrisi içindeki pozisyonudur. Beş farklı pozisyon olduğu varsayılmıştır (Şekil 4).

1. Matrisin yüzeyine adsorbe olması
2. Bir solvent gözeneginde çözünmesi ve/veya yüzeye adsorbe olması
3. Matrisin mikro/nano gözeneginde çözünmesi/adsorplanması
4. Matris kimyasal olarak bağlanması
5. Ekstraksiyon solventinde çözünmesi<sup>3</sup>.

Ekstraksiyon sürecinde hız sınırlayıcı basamak ekstrakte edilen matrisin doğasına bağlıdır. Doğal tortu (sediment), toprak ve çamur örneklerinin çalışıldığı çevresel uygulamalarda, solut-matris etkileşimlerinin üstesinden gelmek zor olduğundan, yüzeyden bırakma basamağı genellikle hız-sınırlayıcı basamaktır. Bitki materyallerinde, hız-sınırlayıcı basamak daha yaygın olarak çözünme veya difüzyon basamaklarıdır<sup>26,27</sup>.

### Uygulamaları

PLE, katı ve yarı-katı örneklerin ekstraksiyonu için geliştirilmiş bir tekniktir. Örnekler genellikle toprak, tortu veya gıda örnekleridir. Çoğu durumda, PLE için organik solventler kullanılır. Kritik altı (subcritical) su ekstraksiyonu veya basınçlı sıcak su ekstraksiyonu olarak adlandırılan



**Şekil 4**  
Örnek matrisinde analitin pozisyonu<sup>25</sup>

teknikte, suyun ekstraksiyon solvent olarak kullanılması da mümkündür. Bir solvent olarak suyun özellikleri, yüksek sıcaklıkta ve basınçta önemli ölçüde değişir. Gıda endüstrisinin polifenoller açısından değerli yan ürünlerinden biri, nar kabuklarıdır. Geleneksel olarak bitki materyallerinden organik solventler yardımıyla (özellikle metanol) ekstrakte edilir. Çam ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada polifenollerin ekstraksiyonu için basınçlı su ekstraksiyonu araştırılmıştır<sup>28</sup>. Ekstraksiyon sonuçlarını etkileyen en önemli faktörlerin partikül boyutu, sıcaklık ve statik zaman olduğu bulunmuştur. Sonuçlar, basınçlı su ekstraksiyonunun geleneksel metanol ekstraksiyonu kadar efektif olduğunu göstermektedir. Misel ortam gibi katkılar, sıvı ve çevresel örneklerden organik kirleticilerin ekstrakte edilmesi için alternatif olarak kullanılabilir<sup>29</sup>. Son zamanlarda, non-iyonik yüzey aktif çözeltiler alternatif bir solvent sistemi olarak kullanılmıştır<sup>30</sup>.

Luthria ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada soya fasülyesinde isoflavonların ekstraksiyonu için sistematik bir çalışma gerçekleştirilmiştir<sup>31</sup>. Yedi farklı solvent karışımı değerlendirilmiştir: asetonitril-su; etanol-su; metanol-su; dimetilsülfoksit-etanol-su; dimetilsülfoksit-asetonitril; Genapol-su. Bu değerlendirme altı farklı ekstraksiyon tekniği kullanılarak yapılmıştır: Çalkalama, vorteksleme, sonikasyon, karıştırma, Soxhlet ve PLE. Soya fasülyesi örneklerinden optimum geri kazanım dimetilsülfoksit-etanol-su (5:70:25, h/h/h) solvent karışımının kullanıldığı PLE yöntemi ile elde edilmiştir. Zhu ve arkadaşları herbisitlerin topraktan ekstraksiyonunda, kuru topraklar için ekstraksiyon verimine basıncın az etkisi olduğunu gözlemişlerdir ve 100-150°C sıcaklıkta verimin arttığını bulmuşlardır<sup>32</sup>. Bununla birlikte toprağın nemli olması durumunda 500 psi'dan 1500 psi'ya artan basınç, pestisitlerin daha iyi çözünmesinden dolayı faydalıdır<sup>33</sup>. Bernal ve arkadaşları, sertifikalı patates, havuç, zeytinyağı ve liyofilize edilmiş balık doku örneklerindeki organoklorin pestisitleri ve poliklorlu bifenilleri tayin etmişlerdir. Örnekleri izole etmek için basınçlı-Soxhlet ekstraksiyonunu kullanmışlardır<sup>34</sup>. Bu uygulamada ekstraktant olarak CO<sub>2</sub> kullanılmıştır. CO<sub>2</sub>'nin yoğunlaşması için ekstraksiyon sistemi, soğutucu su (0°C) pompalayan sıcaklık ayarlı banyo içine daldırılmıştır.

### *Mikrodalga-Destekli Solvent Ekstraksiyonu (Microwave-Assisted Extraction, MAE)*

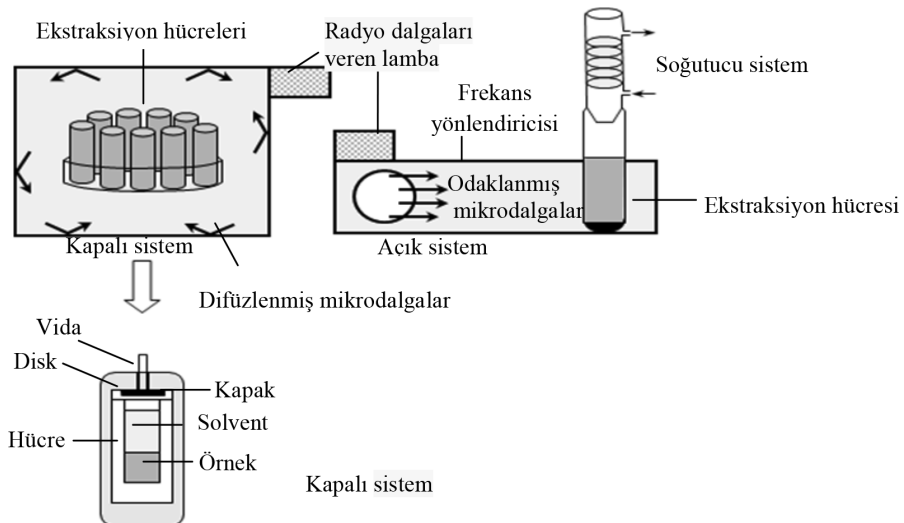
Mikrodalgalar yüksek frekanslı elektromanyetik dalgalardır (300-300000 MHz). Mikrodalga enerji kullanılarak ısıtmanın prensibi, iyonların iletimi ve dipol rotasyonu (dönme) yoluyla molekül üzerine mikrodalganın direkt etkisi temeline dayanır. Çoğu uygulamalarda bu iki mekanizma eş zamanlı meydana gelir. İyonik iletim, bir manyetik alan uygulandığında iyonların elektroforetik göçüdür. Çözeltilerin bu iyon akışına direnci friksiyon (sürtünme) ile sonuçlanır ve böylece çözelti ısınır. Dipol rotasyonu, uygulanan manyetik alanla dipollerin yeniden düzenlenmesi anlamına gelir. Ticari sistemlerde kullanılan 2450 MHz'de dipoller düzenlenir ve saniyede  $4.9 \times 10^9$  defa rasgele dağılır. Bu zorlanmış moleküler hareket, ısınmayla sonuçlanır<sup>2,17</sup>. MAE'de mikrodalga ışıması, ekstraksiyon solventini ve böylece de örneği ısıtmak için kullanılır. Başarılı bir ekstraksiyon gerçekleştirmek için uygun solvent seçimi çok önemlidir. Seçilen solventlerde mikrodalga ışımasını absorplaması, solventin matriksle etkileşimi ve analitin solventteki çözünürlüğü göz önüne alınmalıdır. Daha büyük dipol momente sahip olan solvent, mikrodalga ışıması altında daha hızlı ısınacaktır. Örneğin hekzan gibi nonpolar bir solvent (dipol moment $<0.1$ ) ısınmayacak, oysa 2.69 dipol momente sahip aseton birkaç saniye içinde ısınacaktır<sup>35</sup>. Eğer ekstraksiyonda hekzan ve toluen gibi nonpolar solventler gerekliyse, solventleri su metanol ve aseton gibi yüksek bir dipol momente sahip polar solventlerle karıştırmak önerilir. Seçilen solvent çok kuvvetli ısınmaya neden olursa, bileşiklerin degradasyonundan kaçınılamaz. Bu yüzden yaygın uygulama, yalnızca biri mikrodalga ışımayı absorplayan ikili karışımların (örneğin hekzan-aseton, 1:1) kullanımınıdır<sup>36</sup>. Diğer önemli faktörlerden biri de, ekstraksiyon solventi ile ekstraktın analizinde kullanılan analitik metodun uyumluluğudur. Gaz kromatografik analizler için daha az polar solventler, sıvı kromatografik analiz ve immunoassay teknikler için daha polar solventler tercih edilir. MAE'nin seçiciliği üzerine çok az literatür rapor edilmiştir. Örneğin içindeki tüm maddeler ekstrakte edildiğinden seçici bir ekstraksiyon tekniği olduğu söylenemez ve hemen hemen her durumda ekstraksiyon sonrası temizleme basamağı gereklidir<sup>35</sup>.

Ekstraksiyon genellikle kapalı bir kapta gerçekleştirilir. Bu durumda basınç artar ve solvent kaynama noktasından daha yüksek sıcaklıklara ısıtılabilir. Çoğu solvent için (aseton, aseton-hekzan, diklormetan-

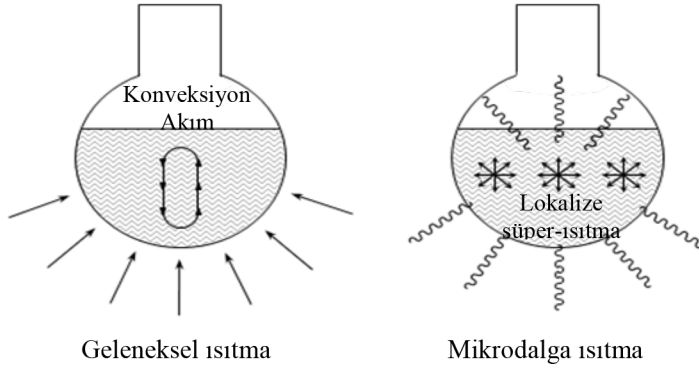
aseton gibi) kabın içindeki sıcaklık, solventin kaynama noktasının 2-3 katıdır. Temel olarak iki tip MAE sistemi kullanılabilir: Kapalı kap sistemi (kontrollü sıcaklık ve basınç altında) ve açık kap sistemi (atmosfer sıcaklığında). Her iki sistem de Şekil 5'de gösterilmiştir<sup>37</sup>. Kapalı kap sisteminde hücreler eşzamanlı olarak ısıtılırken, açık sistemde kaplar sıralı olarak ısıtılır. Açık kaplarda sıcaklık solventin atmosferik basınçta kaynama noktasıyla sınırlıyken, kapalı kaplarda sıcaklık uygulanan basınçla yükseltilebilir<sup>38</sup>. Kapalı kap sistemi uçucu bileşikler olması durumunda en uygun görünmektedir. Bununla birlikte, kapalı kaplarda, ekstraksiyon sonrasında kap açılmadan önce sıcaklığın düşmesini beklemek gereklidir. Bu ekstraksiyon süresini artırır (yaklaşık 20 dakika). Her iki sistem ekstraksiyon verimlerine göre karşılaştırıldığında, toprak örneğinden poliaromatik hidrokarbonların ekstraksiyonunda, benzer performans göstermişlerdir<sup>39</sup>.

Kapalı kap teknolojisi, PLE teknolojisiyle çok benzerdir. Her iki sistemde de solvent ısıtılır ve basınç uygulanır. Temel fark, ısıtmadır. Biri mikrodalga, diğeri geleneksel fırın ısıtmasıdır (Şekil 6)<sup>40</sup>. PLE'de, etkili parametrelerin sayısı azalır. Bu nedenle bu tekniğin uygulanması pratikte daha basittir.

Kullanılan ticari kapalı kap MAE sistemleri, bir manyetron tüp (çok kısa radyo dalgaları veren bir lamba), içinde döner bir tablada ekstraksiyon



**Şekil 5**  
MAE'de kapalı ve açık sistem



**Şekil 6**  
Isıtma modelleri

kaplarının bulunduğu fırın, sıcaklık ve basıncın kontrolü için izleme cihazları ve birkaç elektronik bileşenden oluşmaktadır. Ekstraksiyon süreci, ekstraksiyon hücresine örneğin yüklenmesiyle başlar. Mikrodalga ısıtma uygulanır ve solventi ayarlanan değerlere ısıtmak için, ön-ekstraksiyon basamağı başlatılır. Bu değerlere ulaşmak için gerekli zaman hem örnek sayısına hem de örnek türüne bağlıdır. Normal olarak ısıtma 2 dakikadan daha az bir zaman alır. Daha sonra örnek ışınlanır ve genellikle 10-30 dakika aralığında ekstrakte edilir<sup>2</sup>.

### Uygulamaları

MAE, sıvı örnekler için de uygun olmasına rağmen, tipik olarak katı örnekler için kullanılır. MAE uygun bir solvent seçimiyle, organik bileşikler dekompoze etmek ve yükseltgemek için kullanılabilir. Ekstraksiyon genellikle 20-50 mL solvent gerektirir<sup>4</sup>.

MAE genellikle çevresel analizlerde kullanılır. Tortu ve toprak gibi matrislerden, poliaromatik hidrokarbonlar, polikloro bifeniller ve organoklorlu pestisitlerin ekstraksiyonları çalışılmıştır<sup>41, 42</sup>. Zaman, sıcaklık, basınç ve nem içeriği gibi değişkenlerin ekstraksiyon verimine etkisi araştırılmıştır. Çoğu çalışmada matris neminin ekstraksiyon verimini artırdığı bulunmuştur<sup>2, 40</sup>. MAE gıda analizlerine de uygulanmıştır. Bouaid ve arkadaşları portakal kabuğunda atrazin ve dört organofosforlu pestisiti tayin etmişlerdir<sup>43</sup>. Ekstraksiyon hekzan/aseton (1:1) karışımında, 90°C sıcaklıkta, 10 dakikada ve 475 watt (w) mikrodalga

gücünde yapılmıştır. Ekstraktlar gaz kromatografisi-azot-fosfor dedektör (GC-NPD) ile analiz edilmiştir. Papadakis ve arkadaşları, susam tohumlarında 16 organoklorin insektisitinin ekstraksiyonunu MAE ile gerçekleştirmişlerdir<sup>44</sup>. Solvent karışımı olarak su:asetonitrilin (5:95, v/v) kullanıldığı ekstraksiyon, 100°C sıcaklıkta, 10 dakikada gerçekleşmiştir. Ekstraksiyon basamağını, ekstraktın Florisil ile temizlenme basamağı ve gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS) ile analizi izlemiştir. Franke ve arkadaşları serumdan ilaç ekstraksiyonunda mikrodalga ısımasını kullanmıştır ve sonuçları klasik sıvı-sıvı ekstraksiyonuyla karşılaştırmışlardır<sup>45</sup>. Model ilaç olarak lidokain, metadon, diazepam, nordiazepam, proksifen ve norproksifen test edilmiştir. Kantitasyon GC-NPD ile gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem birkaç adli vakaya başarıyla uygulanmıştır. Desrosiers ve arkadaşları, iskelet dokularından ilaç (pentobarbital, ketamin, diazepam) ekstraksiyonu için MAE kullanmışlardır. Doku ekstraktları enzim-bağlı immunosorbent testi (ELISA) ile analiz edilmiştir<sup>46</sup>. Diğer bir uygulama alanı terpenler, alkaloidler, uçucu yağlar, karotenoidler gibi doğal ürünlerin ekstraksiyonudur. Paprikada renk pigmentleri ekstrakte edilmiştir. Aseton-su (1:1, v/v) solvent karışımı kullanılarak elde edilen optimal koşullar; 120 saniye ekstraksiyon zamanı ve 50 W enerjidir. MAE koşullarında örnek sıcaklığı 60°C'nin altında tutulmuştur. Bunun nedeni daha yüksek sıcaklıkta ısıtma karotenoid moleküllerinin yeniden düzenlenmesine ve toplam karotenoid içeriğinde azalmaya neden olabilir. Hidrofobik karotenoidlerin daha hidrofilik bileşiklere yükseltgenmesiyle termooksidasyon da gerçekleşebilir<sup>47</sup>. Ayçiçeği tohumlarındaki pestisit atıklarının tayini için mikrodalga destekli Soxhlet ekstraksiyonu kullanılarak diklormetan solventiyle hızlı bir analitik yöntem geliştirilmiştir. Ekstraksiyon verimini etkileyen mikrodalga gücü, ışınlama zamanı, ekstraktant hacmi ve devir sayısı optimize edilmiştir. Ekstraksiyondan sonra orijinal ekstraktın lipid fraksiyonundan pestisit atıklarını izole etmek için, sıvı-sıvı ekstraksiyonu ve Florisil makro kolon kullanımıyla temizleme basamağı uygulanmıştır. Daha sonra örnek GC-MS sistemine enjekte edilmiştir<sup>48</sup>. Topraktan nitratlanmış polisiklik aromatik hidrokarbonların hızlı ekstraksiyonu için mikrodalga destekli Soxhlet ekstraksiyonu önerilmiştir. Işınlama gücü, zamanı, devir sayısı ve solvent hacmi, deneysel dizayn metodolojisi kullanılarak optimize edilmiştir. Nitro-poliaromatik hidrokarbonlar, amino- poliaromatik hidrokarbonlara indirgenmiştir. İndirgenmiş analitler heptaflorobutirik anhidrit ile türevlendirilmiş ve GC-ECD ile tayin edilmiştir<sup>49</sup>.

### *Ses Dalgaları-Destekli Sıvı Ekstraksiyonu (Sonication-Assisted Liquid Extraction, SAE)*

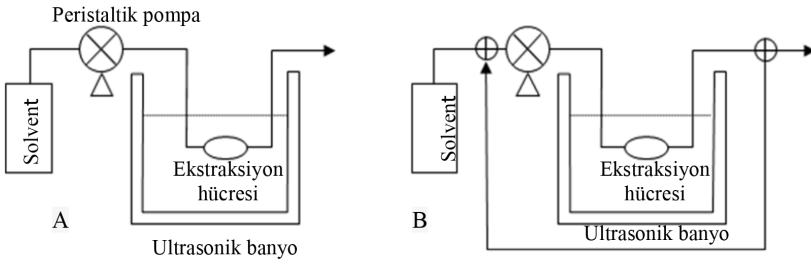
Ses dalgaları-destekli sıvı ekstraksiyonu, ultrasonik ekstraksiyon olarak da adlandırılır. Bu yöntemde örneğe 20 kHz üstündeki frekanslarla akustik titreşimler uygulanır. Bu titreşimler sıvının içinden geçtiğinde kavitasyon (boşluk oluşumu) meydana gelir. Ultrasonik enerjinin neden olduğu kavitasyon olarak bilinen bu etki sıvı ortamda çok sayıda ufacık kabarcıklar üretir ve katıların mekanik olarak sarsılmasına neden olarak partiküllerin kopmasını sağlar. Ses dalgaları genellikle analitin iyi geri kazanımıyla sonuçlanan katı ve solvent arasında etkin bir temas sağlar<sup>50</sup>. Ses dalgaları, hem katı hem de sıvı örnek hazırlamada kullanılır. Katı örneklerin ekstraksiyonu, digesyonu ve bulamaç oluşumu işlemini destekler. Sıvı örneklerde ise, sıvı-sıvı ekstraksiyonu, homojenizasyonu veya emülsiyon haline getirmeyi desteklemek için kullanılır<sup>51</sup>. Katı örneklerden analitlerin ekstraksiyonu, su banyosuna ultrasonik radyasyon uygulanmasıyla veya prob (ultrasonik aygıtların ucunda bir alıcı bulunan hareketli kısmı) gibi diğer cihazlarla gerçekleştirilir<sup>52</sup>. En çok kullanılan ve en ucuz ultrasonik radyasyon kaynağı ultrasonik banyodur<sup>53</sup>. Ayrıca örneklerin sonikasyonu için güçlü silindirik bir prob kullanan daha etkin bir sistem geliştirilmiştir<sup>54</sup>. Banyo ve prob arasındaki seçim analizin gerekliliklerine bağlıdır. Eğer amaç toplam katı-sıvı ekstraksiyonu ise, etkili bir prob kullanımı daha iyi olabilir. Çünkü ekstraksiyon için gerekli zaman daha azdır. Bununla birlikte, çok sayıda örneğin ultrasonik banyo ile analiz edilmesi daha iyi bir seçenektir. Sonikasyon problemlerinin ultrasonik banyoya karşı kullanımı, enerji dağılımında homojeniteyi sağlar. Fakat ultrasonik uçlar daha pahalıdır, ömrü daha kısadır ve daha düşük sayıda örnek işlenmesine izin verir<sup>51</sup>.

Ekstraksiyon verimini artırmak için solvent türü, sıcaklık ve sonikasyon genliği koşulları gibi farklı faktörleri optimize etmek gereklidir. Ekstraksiyon verimini etkileyen diğer parametreler; sonikasyon zamanı, örnek partikül boyutu, örnek miktarı ve kullanılan cihazdır. Son zamanlarda, solvent miktarını azaltmayı sağlamak için analitik örnek hazırlama işlemlerine özel önem verilmektedir. Ultrason radyasyonun ilginç bir uygulaması dinamik ses dalgaları-destekli ekstraksiyondur. Burada numune ultrasonik su banyosuna yerleştirilmiş bir ekstraksiyon hücresi<sup>55, 56</sup> veya ultrasonik problu bir su banyosu içine konulur. Bu sistem taze ekstraksiyon solventinin sürekli olarak örneğe pompalandığı, artan analit transferi olan açık bir sistem veya ekstraktın seyrelmesini



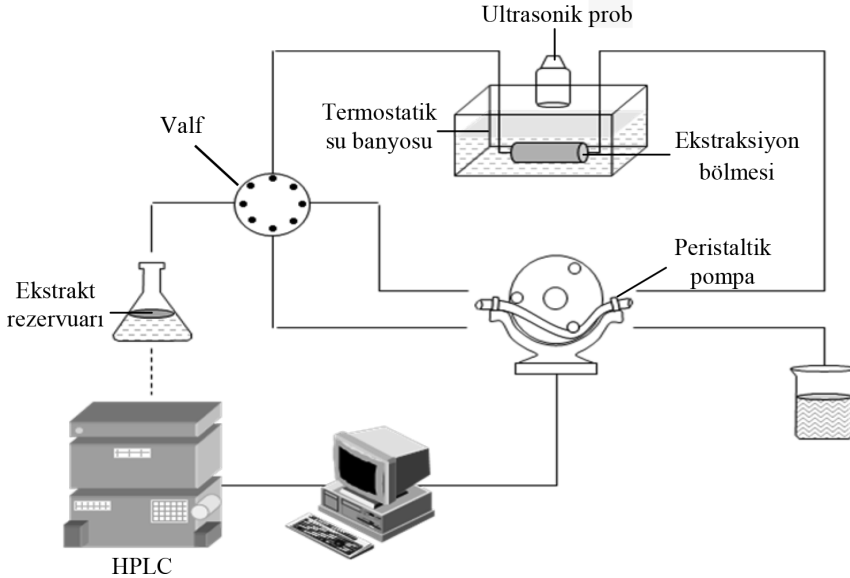
engelleyen ekstraksiyon solventinin yeniden dolaştığı kapalı bir sistem olarak kullanılabilir (Şekil 7)<sup>51</sup>. MAE sistemi gibi, SAE sistemi de statik veya dinamik bir sistem olabilir. Analitler katı matriksten solvente transfer olur olmaz uzaklaştığından, dinamik ekstraksiyon kullanımı daha avantajlıdır. Diğer bir avantajı da, dinamik sistemde örneğin sürekli olarak taze solvente maruz kalmasıdır. Bu durum analitlerin örnek matriksinden solvente transferini artırır. Ekstraksiyon tipik olarak 20-200 mL solvent gerektirir ve ekstraksiyon zamanı 2 ila 20 dakika aralığındadır.

Ayrıca, dinamik ses dalgaları-destekli ekstraksiyon ile enstrümantal analiz yönteminin çevrim içi bağlanması mümkündür (Şekil 8).



**Şekil 7**

Dinamik ses dalgaları-destekli ekstraksiyonun şematik gösterimi  
**A)** Açık sistem **B)** Kapalı sistem



**Şekil 8**

Dinamik ses dalgaları-destekli sıvı ekstraksiyonun analiz sistemine bağlanmasının şematik gösterimi<sup>57</sup>.

## Uygulamaları

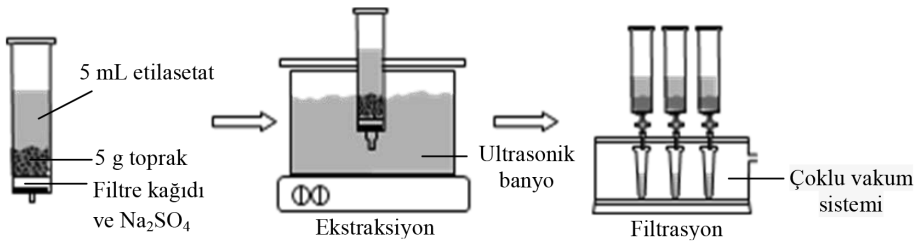
SAE sıvı ve katı örneklerin her ikisi için veya organik ya da inorganik bileşiklerin ekstraksiyonu için kullanılabilir. Ses dalgaları organik bileşiklerin yükseltgenmesi veya ayrışmasında yardım için de kullanılabilir<sup>15</sup>.

Sánchez-Brunete ve arkadaşları toprakta pestisitlerin tayini için küçük kolonlarda ses dalgaları- destekli ekstraksiyon olarak adlandırılan minyatürize edilmiş bir teknik geliştirmişlerdir<sup>58</sup>. Şekil 9'da toprak ekstraksiyonu şematik olarak gösterilmiştir.

Bu teknik daha yüksek polaritedeki karbamat pestisitlerin ekstraksiyonuna uygulanmıştır. Ekstraksiyon solventi olarak, % 82 ile % 99 aralığında geri kazanım elde edilmesini sağlayan metanol seçilmiştir<sup>59</sup>. Son zamanlarda, farklı kimyasal sınıfta ve geniş polarite aralığında 50 pestisit eş zamanlı analizinde uygulanan bu yöntemde etil asetat ekstraksiyon solventi olarak kullanılmıştır. Yüksek tekrarlanabilirlik ve düşük gözlenebilir limitleri elde edilmiştir<sup>60</sup>. Tablo II'de toprakta SAE uygulanarak poliaromatik hidrokarbonların (PAH) tayini için geliştirilen birkaç analitik yöntem özetlenmiştir. Ekstraksiyon genellikle ultrasonik banyoda gerçekleştirilmiştir.

Toprakta antibiyotik, hormon gibi farmasötik bileşiklerin derişiminin tayin edilmesinde farklı SAE yöntemleri geliştirilmiştir (Tablo III). Bu yöntemler gıdalarda pestisit kalıntılarının, poliaromatik hidrokarbonların, antibiyotiklerin, endüstriyel kirleticilerin, inorganik kirleticilerin tayininde kullanılmaktadır<sup>65-68</sup>.

Ses dalgaları-destekli Soxhlet ekstraksiyonu ayçiçeği, kolza ve soya fasülyesi tohumlarından toplam yağ içeriğini ekstrakte etmek için



**Şekil 9**

Küçük kolonlarda ses dalgaları-destekli ekstraksiyonun şematik gösterimi

TABLO II

Poliaromatik hidrokarbonların tayini için geliştirilen yöntemlerden bazıları

Tayin edilen PAH sayısı	Ses dalgaları-destekli ekstraksiyon koşulları				Temizleme	Tayin	Referans
	Solvent	Zaman (dak)	Sıcaklık (°C)	Tip			
16	Aseton	15x2	Oda Sıcaklığı	UB	SPE-C18: aseton	LC-FD LC-UV	61
16	EtOAc	15x2	Oda Sıcaklığı	UB		GC-MS	62
16	n-Hekzan-DCM (1:1, v/v)	10x3	Oda Sıcaklığı	UB	SPE-alüminyum: n-hexane-DCM (10:1, v/v)	GC-MS	63
16	DCM	75	Oda Sıcaklığı	UB	SPE-C18: aseton	LC-UV	64

UB: Ultrasonik banyo; EtOAc: Etilasetat; DCM: diklormetan

kullanılmıştır. 10 g örnek, selüloz ekstraksiyon kartuşüne yerleştirilmiştir. Kartuş, Soxhlet cihazına konulduktan sonra, cihaz 75°C sıcaklıktaki termostatlı su banyosu içine yerleştirilmiştir. Kartuşe ses dalgaları uygulanmıştır. Ekstraksiyonda 100 mL n-hekzan kullanılmıştır. Örnek kartuşüne ses dalgaları uygulanması, yağın kantitatif ekstraksiyonu için gerekli Soxhlet ekstraksiyon çevrim sayısını çok büyük ölçüde azaltmış böylece ekstraksiyon zamanı geleneksel işlemlere kıyasla yarı yarıya azalmıştır<sup>34</sup>.

### *Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu (Supercritical Fluid Extraction, SFE)*

SFE'de, ekstraksiyon sıvısı, kritik üstü haldedir. Süperkritik akışkan, kendi kritik sıcaklığı üzerinde ısıtılan ve kendi kritik basıncı üzerinde basınç uygulanan bir element, madde veya karışım olarak tanımlanır. Bir süperkritik akışkan tek bir faz halinde bulunur (ne gaz ne de sıvıdır) ve basıncın veya sıcaklığın artmasıyla sıvılaştırılmaz veya buharlaştırılmaz. Bu yüzden süperkritik akışkan, bir gaz ve bir sıvı arasındaki maddenin ara formunu gösterir. Sıvıdaki gibi yüksek yoğunluk ve çözme gücü, gazdaki gibi düşük viskozite, sıfır yüzey gerilimi ve analitler için yüksek difüzyon hızına sahiptir. Daha yüksek difüzyon katsayıları ve düşük viskoziteleri nedeniyle, süperkritik akışkanların katı gözenekli materyallere nüfuz

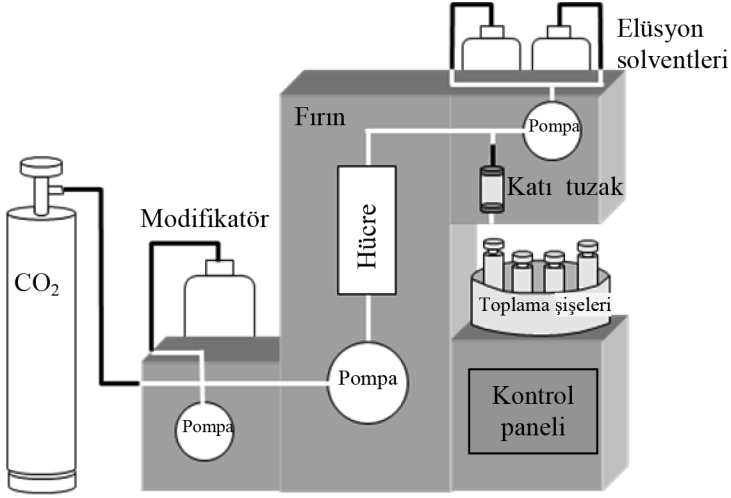
**TABLO III**  
Farmasötik bileşiklerin derişiminin tayini

Bileşik	Ses dalgaları-destekli ekstraksiyon koşulları			Temizleme	Tayin	Matriks	Ref
	Solvent	Zaman(dak)	Sıcaklık(°C)				
Oksitetrasiklin Sülfakloropiridazin Tilozin	Na2EDTA-MeOH	10x3	Oda Sıcaklığı	SPE-C18: tampon LLE; n-hekzan	LC-MS/MS	Yer altı suyu	69
Estrojenler Progesterenler	Aseton-MeOH (1:1, v/v)	5x3	Oda Sıcaklığı	SPE-C18: AcCN	LC-DAD	Nehir tortusu	70
Enoksasin Norfloksasin Danofloksasin Enrofloksasin	MeOH-amonyak (75:25, v/v)	30	Oda Sıcaklığı	SPE-MIP: MeOH	LC-UV	Toprak	71
Klofibril asit İbuprofen Naproksen Ketoprofen Diklofenak Triklosan	Aseton-EtOAc %10 asetik asit	5x4	Oda Sıcaklığı	SPE-C18: pH 3 EtOAc	GC-MS (MTBSTFA)	Toprak	72

MTBSTFA: N-metil-N-(ter-butildimetilsilil)trifloroasetamid; AcCN: asetonitril; MIP: moleküler damgalı polimerler

etmesi çok uygundur. Çözme ve yayılma gücü sıvılara göre daha fazla olduğundan, hızlı reaksiyon kinetiğine sahiptirler<sup>73, 74</sup>. Normal sıvıların tersine, süperkritik akışkanlar sıkıştırılabilir ve bu yüzden yoğunlukları geniş bir aralıkta değiştirilebilir. Yoğunluk ve diğer özellikleri, sıcaklık ve basıncın ayarlanmasıyla kolaylıkla değiştirilebilir. Bu önemlidir, çünkü süperkritik akışkanının daha yüksek yoğunluğu, onun daha iyi çözme kabiliyeti anlamına gelmektedir. Yoğunlukla süperkritik akışkanlardaki maddelerin çözünürlüğü, sıvıdaki çözünürlüğünü geçer. Süperkritik akışkan çeşitli örnek matrisleri için mükemmel bir ekstraksiyon ortamı oluşturur. Sıcaklık ve basınç değiştirilerek çözme gücüyle oynanmasıyla yüksek seçicilik de sağlanır<sup>73</sup>. SFE'de, akışkan sürekli olarak örnek içinden geçmeye zorlanır. Bu yüzden kantitatif veya tam bir ekstraksiyon sağlayabilir<sup>75</sup>. Süperkritik akışkan olarak genellikle düşük kritik sıcaklık ve basınca sahip olduğundan karbondioksit (Kritik koşulları = 30.9°C ve 73.8 bar) kullanılır. Karbondioksit ayrıca toksik değildir, alev almaz ve oldukça ucuzdur. Nonpolar olduğundan, daha polar analitlerin ekstraksiyonunu artırmak için karbondioksite modifikatörler eklenir. Tipik modifikatörler metanol ve diklormetandır.

SFE'de süperkritik akışkan üretimi, basınç, sıcaklık ve akış hızı kontrolü sağlayan bir cihazla gerçekleştirilir (Şekil 10)<sup>17</sup>. Genellikle ekstraksiyon dinamik moda uygulanır. Fakat statik veya statik/dinamik birleştirilmiş ekstraksiyon da uygulanabilir. Ekstrakt ya uygun bir solvent içinde veya katı-faz tuzağında (trap) toplanır. Ekstraksiyon 10-20 mL solvent gerektirir ve ekstraksiyon süresi 20-60 dakika aralığındadır. Geleneksel yöntemlere göre belirgin avantajı kısa ekstraksiyon zamanı ve organik solventlerin az kullanımınıdır. Bazı çalışmalar 20-60 dakikalık SFE'nin, birkaç saatlik Soxhlet ekstraksiyonundan daha yüksek geri kazanımlar sağladığını göstermiştir<sup>76, 77</sup>. Referans standart materyaller olan tortu ve kas dokusundan poliklorlu bifenillerin, SFE ve Soxhlet ekstraksiyonuyla tayini yapılarak yöntemlerin karşılaştırılması sağlanmıştır. SFE ile poliklorlu bifenillerin tayininde ekstraksiyon süresi 18-24 saatten 50 dakikaya indirilmiş ve Soxhlet ekstraksiyonu ile 250 mL olan organik solvent kullanımı 7.5 mL ye düşürülmüştür<sup>78</sup>. Genelde, SFE katı örneklerden organik analitlerin ekstraksiyonu için kullanılır. Isısal olarak kararsız analitler için de uygundur.



**Şekil 10**  
SFE sistemi<sup>37</sup>

### Uygulamaları

SFE, çevresel, farmasötik, polimer ve gıda analizlerinde kullanılmaktadır. Ham sebze yağları gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılır. İstenmeyen bileşiklerin uzaklaştırılması için tüketilmeden önce yağların rafine edilmesi gerekir. Sıfırlama süreci sırasında, yağdaki faydalı bileşikler de kaybolabilir. Buğday tanesi yağında<sup>79</sup>, preslenerek elde edilen yeşil kahve yağında<sup>80</sup>, ham palmye yağında<sup>81</sup> ilgilenilen bileşiklerle zenginleştirilmiş ekstraktlar elde etmek için alternatif bir sıfırlama metodu olarak SFE önerilmiştir. Yeşil çaydan seçici olarak kafein ekstraksiyonunda yardımcı solvent olarak su ile süperkritik CO<sub>2</sub> kullanılmış ve matriksten antioksidanların ekstraksiyonu önlenmiştir<sup>82</sup>. Uçucu yağlar, yağ asitleri<sup>83</sup> ve/veya karotenoidler gibi biyoaktif bileşikler<sup>84</sup> meyve ve sebzelerden süperkritik CO<sub>2</sub> kullanarak ekstrakte edilmiştir. Daidzein ve genistein gibi izoflavonlar 350-500 bar arasındaki yüksek basınçlarda sulu metanol ve süperkritik CO<sub>2</sub> kullanılarak ekstrakte edilmişlerdir<sup>85</sup>.

SFE'nin en ilginç uygulamalarından biri, genetik olarak değiştirilmiş farklı mısır ve soya türlerinde amino asit ilişkisini belirlemede kullanılmasıdır. Amino asitleri ekstrakte etmek için %35'lik metanol

ile modifiye edilmiş süperkritik CO<sub>2</sub>, 80°C sıcaklık ve 120 bar basınçta kullanılmıştır. Ekstraktlar GC-MS ile analiz edilmiştir<sup>86</sup>.

SFE gıda endüstrisinde yan ürünleri değerlendirmede geniş ölçüde kullanılmaktadır. Yan ürünlerin ekstraksiyonu, yararlanılmayan fakat değerli bileşiklerin uzaklaştırılmasını sağlar. Tablo IV'de nar çekirdeği, çay sapı gibi yan ürünlerde çeşitli bileşiklerin çalışma koşulları verilmiştir.

SFE uzun zamandan beri bitki materyallerinden spesifik aktivite gösteren etkin bileşiklerin ekstraksiyonu için kullanılmaktadır (Tablo V).

İnsan faaliyetlerinin çevreye etkisini belirlemek önemlidir ve toprak ile tortu bu etkinin önemli göstergeleridir. Miyawaki ve arkadaşları, toprak ve tortularda poliklor dibenzo-p-dioksin, poliklor dibenzofuran, poliklor bifenil ve dioksin tayini için hızlı bir strateji geliştirmişlerdir<sup>96</sup>. Tarımsal ve endüstriyel toprak örnekleri suyla modifiye edilmiş süperkritik CO<sub>2</sub> kullanarak 300 bar basınçta, 130°C sıcaklıkta ve 50 dakika süreyle ekstrakte edilmiştir. Kirlilikler alumina ile doldurulmuş SPE kartuşu kullanılarak tuzaklanmış ve hekzan ile geri alınmıştır. Derişimler GC-MS ile belirlenmiştir. Klasik ekstraksiyon işlemleri ile 3 güne ihtiyaç duyulurken, SFE ile toplam analiz süresi 2 saate indirilmiştir. Diğer birkaç çalışma Tablo VI'da verilmiştir.

TABLO IV  
Yan ürünlerin SFE yöntemi ile tayin koşulları

Matriks	Bileşikler	Ekstraksiyon koşulları	Analitik Teknik	Referans
Domates	Tokoferoller, fitosteroller	CO <sub>2</sub> , 300 bar, 40°C	HPLC-DAD (290, 320, 360 nm) GC-FID	87
	Likopen	CO <sub>2</sub> + yardımcı solvent, 250-450 bar, 40-70°C	HPLC-DAD (460 nm)	
Nar çekirdekleri	Polifenoller	CO <sub>2</sub> , 130-470 bar, 40-70°C	GC-FID HPLC-UV (292 nm)	88
Çam kabuğu	Antioksidanlar	CO <sub>2</sub> + etanol 100-300 bar, 30-50°C	TLC, GC-MS, HPLC-UV (280 nm)	89
Çay sapı	Kafein	CO <sub>2</sub> , 200 bar, 55°C	HPLC-UV (272 nm)	90

TABLO V

Biyoaktif bileşiklerin bitki materyallerinden SFE yöntemi ile tayin koşulları

Bitki materyali	Bileşikler	Fonksiyonel aktivite	Ekstraksiyon koşulları	Analitik teknik	Referans
Kakule	Uçucular, yağ asitleri, tokoferoller	Antioksidan	CO <sub>2</sub> , 300 bar, 35°C	GC-MS HPLC-FD HPLC-DAD	91
Zencefil	Uçucu yağlar	Antipiretik (Ateş düşürücü)	CO <sub>2</sub> + metanol 100 bar, 30°C, 40 dak	GC-MS	92
Kedi otu	Valerenik asit	Sakinleştirici	CO <sub>2</sub> + etanol 360 bar, 37°C, 20 dak	GC-MS	93
Kuşburnu	Karotenoidler Yağ asitleri	Antioksidan	CO <sub>2</sub> , 450 bar, 80°C, 150 dak CO <sub>2</sub> , 300 bar, 80°C, 3 saat	HPLC-UV GC-FID	94, 95

TABLO VI

Çevresel kirleticilerin SFE yöntemi ile tayin koşulları

Bileşik	Matriks	Ekstraksiyon koşulları	Diğer özellikler	Analitik teknik	Referans
Fipronil Akrinatriin Piridaben Kresoksim-metil	Kavun	CO <sub>2</sub> , 300 bar, 80°C	Hidromatriks ve susuz magnezyum sülfat	GC-MS	97
Poliaromatik hidrokarbonlar	Nehir sel havzası toprağı	CO <sub>2</sub> , 200 bar, 50°C	C18 tuzaklama	GC-MS	98
Dioksin ve Poliklorlubifeniller	Balık yağı	CO <sub>2</sub> , 300 bar, 70°C	Aktive edilmiş karbona bağlı karşı akım ekstraksiyonu	GC-MS GC-FID	99

### Sonuç

Ekstraksiyon işleminin yönetilmesinde çeşitli faktörler vardır. Ekstraksiyonda sıcaklığın; çözünürlük, katıların yayılma gücü, viskozite ve sıvıların yüzey gerilimi gibi önemli olaylar üzerine etkisi vardır. Çoğu durumda, sıcaklıktaki bir artış, çözünürlüğü artırır ve moleküllerin yayılma gücünü artırır. Bu da genellikle ekstraksiyonun güçlenmesiyle sonuçlanır. MAE, SFE, PLE veya ASE, SAE gibi teknikler arasındaki benzerlik, ekstraksiyon olayının hızını önemli ölçüde artıran, yüksek sıcaklık ve basınçta çalışma olasılığıdır. Tablo VII'de bu yöntemlerin avantajları ve dezavantajları özetlenmiştir.



TABLO VII

Gelişmiş ekstraksiyon tekniklerinin karşılaştırılması

<b>Ekstraksiyon Teknikleri</b>	<b>Avantajları</b>	<b>Dezavantajları</b>
Soxhlet Ekstraksiyonu	Fazla miktarda örnek kütlesi ekstrakte edilmesi Matrikse bağımlı olmaması Filtrasyon gerektirmemesi Az uğraş gerektiren çok basit bir metodoloji olması Düşük maliyetli basit ekipman kullanılması	Büyük miktarda organik solvent kullanılması (100-500 mL) Uzun zaman gerektirmesi (6-24 saat) Ekstraksiyon sonrası buharlaştırma/deriştirme basamağı
Basınçlı Sıvı Ekstraksiyonu	Filtrasyon gerektirmemesi Hızlı olması (10-40 dakika) Düşük solvent tüketimi (20-50 mL) Kullanımının kolay olması Otomasyona uygun olması	Yüksek maliyet Matrikse bağımlı olması
Mikrodalga-Destekli Sıvı Ekstraksiyonu	Hızlı olması (10-30 dakika) Düşük solvent tüketimi (20-50 mL) Daha yüksek sıcaklıklar Ekstraksiyon parametrelerinin tamamen kontrolü (zaman, güç, sıcaklık) Kurutucu ajanlar gerektirmemesi	Seçilen solventlerin mikrodalga ışımasını absorplaması (polar solventler) Herşey ekstrakte edilir, temizleme basamağı gereklidir Hesaplı maliyet
Ses Dalgaları-Destekli Sıvı Ekstraksiyonu	Fazla miktarda örnek kütlesi ekstrakte edilmesi Matrikse bağımlı olmaması Hızlı olması (2-20 dakika) Düşük maliyet	Büyük miktarda solvent kullanılması (20-200 mL) Filtrasyon gerektirmesi
Süperkritik Sıvı Ekstraksiyonu	Hızlı olması (20-60 dakika) Düşük solvent tüketimi (10-20 mL) CO <sub>2</sub> in toksik olmaması, alev almaması, çevre dostu olması, ucuz olması Sıcaklık, basınç ve modifikatör değiştirilerek yüksek seçicilik sağlanması Isısız olarak kararsız analitler için uygun olması Otomasyona uygun olması	Yüksek maliyet Matrikse bağımlı olması CO <sub>2</sub> nonpolar olduğundan, daha polar analitlerin ekstraksiyondaki zorluk Verimini artırmak için, modifikatör eklenmesi Islak veya sıvı örnekler ve çözeltilerin ekstraksiyonunda zorluk

### Özet

Son yıllarda, çevresel kirleticilerin bir sağlık riski olduğuna dair toplum bilinci artmıştır. Hava, su ve toprak, tortu, gıda gibi katı örneklerde bulunan toksik kirleticilerin tayin edilmesine duyulan ihtiyaç

neticesinde çevresel araştırma ve izlemeye olan ilgi artmıştır. Yüksek seçicilikte ayırmalar ve kantitasyon için duyarlı enstrümantasyona rağmen “seyrelt ve enjekte et” yaklaşımı, çevresel tayinlerle bağdaşmaz. Örnek matrislerinden eser düzeydeki analitlerin zenginleştirilmesi ve izole edilmesi için bir ekstraksiyon basamağı gereklidir. Klasik ekstraksiyon uygulamaları büyük miktarlarda solvent tüketir. Böylece kendi çevresel ve mesleki tehlikelerini yaratırlar ve genellikle çok düşük seçicilik sağlarlar. Örneğin, farklı matrislerde yarı-uçucu bileşikleri, katı örnekler için Soxhlet ekstraksiyonu, sulu matrisler için sıvı-sıvı ekstraksiyonu gibi geleneksel yaklaşımlar kullanılarak analiz edildiğinde, toksik kimyasal yönetimi ve imhası gereklidir. Basınçlı sıvı ekstraksiyonu (PFE), katı-faz mikroekstraksiyon (SPME), mikrodalga-destekli sıvı ekstraksiyonu (MAE), süperkritik sıvı ekstraksiyonu (SFE) gibi yeni teknolojilerin gelişimi solvent kullanımını azaltmıştır. Bu yeni tekniklere artan bir talep olmuştur, çünkü bu teknikler otomasyona uygundur, çok daha hızlıdır ve çevre dostu tekniklerdir.

*Anahtar kelimeler:* Soxhlet ekstraksiyonu, basınçlı sıvı ekstraksiyonu, mikrodalga-destekli sıvı ekstraksiyon, sonikasyon-destekli sıvı ekstraksiyonu, süperkritik sıvı ekstraksiyonu, çevre analizi

### *Summary*

#### **Advanced Extraction Techniques I**

In the past several decades, public awareness has increased that environmental contaminants are a health risk. As a result of a requirement for determination of toxic contaminants in air, water, and solids (including soil, sediment and food samples), the interest in environmental research and monitoring has increased. Although highly selective separation and sensitive instrumentation for quantification, the approach of “dilute and shoot” of is not compatible with environmental determinations. An extraction step is necessary for isolation and enrichment trace level analytes from sample matrixes. Classical extraction procedures consume large amounts of solvents, thus they create their environmental and occupational hazards, and often provide very little selectivity. For example, when semivolatile compounds in different matrixes are analyzed by using conventional approaches such as Soxhlet extraction for solid samples,

liquid-liquid extraction for aqueous matrixes, toxic chemical management and disposal are required. The development of new technologies, such as pressurized liquid extraction (PLE), solid-phase microextraction (SPME), microwave-assisted extraction (MAE) and supercritical fluid extraction (SFE) reduced solvent use. There has been an increasing demand for new techniques, because they are appropriate automation, a lot faster and are environmentally friendly techniques.

*Key words:* Soxhlet extraction, pressurized liquid extraction, microwave-assisted extraction, sonication-assisted extraction, supercritical fluid extraction, environmental analysis.

### KAYNAKLAR

1. Wan, H.B., Wong, M.K.: Minimization of solvent consumption in pesticide residue analysis. *Journal of Chromatography A*, 754(1-2), 43 (1996)
2. Eskilsson, C.S., Bjorklund, E.: Analytical-scale microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, 902(1), 227 (2000)
3. Pawliszyn, J.: Sample preparation: Quo Vadis? *Analytical Chemistry*, 75(11), 2543 (2003)
4. R. Kellner, M.M., M.Otto, M.Valcarcel, H.M. Widmer, *Sample Preparation*, in *Analytical Chemistry: Modern Approach to Analytical Science*. 2004, Wiley: Weinheim. p. 506-508.
5. Luque-Garcia, J.L., de Castro, M.D.L.: Focused microwave-assisted Soxhlet extraction: devices and applications. *Talanta*, 64(3), 571 (2004)
6. de Castro, M.D.L., Priego-Capote, F.: Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of Chromatography A*, 1217(16), 2383 (2010)
7. de Castro, M.D.L., Garcia-Ayuso, L.E.: Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. *Analytica Chimica Acta*, 369(1-2), 1 (1998)
8. Falandysz, J., Wyrzykowska, B., Warzocha, J., Barska, I., Garbacik-Wesolowska, A., Szefer, P.: Organochlorine pesticides and PCBs in perch *Perca fluviatilis* from the Odra/ Oder river estuary, Baltic Sea. *Food Chemistry*, 87(1), 17 (2004)
9. Diagne, R.G., Foster, G.D., Khan, S.U.: Comparison of Soxhlet and microwave-assisted extractions for the determination of fenitrothion residues in beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(11), 3204 (2002)
10. Richter, B.E., Jones, B.A., Ezzell, J.L., Porter, N.L., Avdalovic, N., Pohl, C.: Accelerated solvent extraction: A technique for sample preparation. *Analytical Chemistry*, 68(6), 1033 (1996)
11. Mockel, H.J., Welter, G., Melzer, H.: Correlation between Reversed-Phase Retention and Solute Molecular-Surface Type and Area .1. Theoretical Outlines and Retention of Various Hydrocarbon Classes. *Journal of Chromatography*, 388(2), 255 (1987)
12. Moreno, E., Reza, J., Trejo, A.: Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil using water under subcritical conditions. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 27(4), 239 (2007)

13. Lundstedt, S., van Bavel, B., Haglund, P., Tysklind, M., Oberg, L.: Pressurised liquid extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soils. *Journal of Chromatography A*, 883(1-2), 151 (2000)
14. Rostagno, M.A., Villares, A., Guillamon, E., Garcia-Lafuente, A., Martinez, J.A.: Sample preparation for the analysis of isoflavones from soybeans and soy foods. *Journal of Chromatography A*, 1216(1), 2 (2009)
15. R. Kellner, M.M., M.Otto, M.Valcarcel, H.M. Widmer, *Sample Preparation, in Analytical Chemistry: A Modern Approach to Analytical Science*, xyz, Editor. 2004, Wiley: Weinheim.
16. Bjorklund, E., Bowadt, S., Nilsson, T., Mathiasson, L.: Pressurized fluid extraction of polychlorinated biphenyls in solid environmental samples. *Journal of Chromatography A*, 836(2), 285 (1999)
17. Camel, V.: Recent extraction techniques for solid matrices-supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: their potential and pitfalls. *Analyst*, 126(7), 1182 (2001)
18. Wenzel, K.D., Hubert, A., Manz, M., Weissflog, L., Engewald, W., Schuurmann, G.: Accelerated solvent extraction of semivolatile organic compounds from biomonitoring samples of pine needles and mosses. *Analytical Chemistry*, 70(22), 4827 (1998)
19. Arnold, C.G., Berg, M., Muller, S.R., Dommann, U., Schwarzenbach, R.P.: Determination of organotin compounds in water, sediments, and sewage sludge using perdeuterated internal standards, accelerated solvent extraction, and large-volume-injection GC/MS. *Analytical Chemistry*, 70(14), 3094 (1998)
20. Schantz, M.M., Nichols, J.J., Wise, S.A.: Evaluation of pressurized fluid extraction for the extraction of environmental matrix reference materials. *Analytical Chemistry*, 69(20), 4210 (1997)
21. Heemken, O.P., Theobald, N., Wencławiak, B.W.: Comparison of ASE and SFE with Soxhlet, sonication, and methanolic saponification extractions for the determination of organic micropollutants in marine particulate matter. *Analytical Chemistry*, 69(11), 2171 (1997)
22. Saim, N., Dean, J.R., Abdullah, M.P., Zakaria, Z.: An experimental design approach for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons from highly contaminated soil using accelerated solvent extraction. *Analytical Chemistry*, 70(2), 420 (1998)
23. Vandenburg, H.J., Clifford, A.A., Bartle, K.D., Zhu, S.A., Carroll, J., Newton, I.D., Garden, L.M.: Factors affecting high-pressure solvent extraction (accelerated solvent extraction) of additives from polymers. *Analytical Chemistry*, 70(9), 1943 (1998)
24. Bjorklund, E., Nilsson, T., Bowadt, S.: Pressurised liquid extraction of persistent organic pollutants in environmental analysis. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 19(7), 434 (2000)
25. Mustafa, A., Turner, C.: Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. *Analytica Chimica Acta*, 703(1), 8 (2011)
26. Smith, R.M.: Extractions with superheated water. *Journal of Chromatography A*, 975(1), 31 (2002)
27. Ong, E.S., Cheong, J.S.H., Goh, D.: Pressurized hot water extraction of bioactive or marker compounds in botanicals and medicinal plant materials. *Journal of Chromatography A*, 1112(1-2), 92 (2006)
28. Cam, M., Hisil, Y.: Pressurised water extraction of polyphenols from pomegranate peels. *Food Chemistry*, 123(3), 878 (2010)
29. Ferrera, Z.S., Sanz, C.P., Santana, C.M., Rodriguez, J.J.S.: The use of micellar systems in the extraction and pre-concentration of organic pollutants in environmental samples. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 23(7), 469 (2004)

30. Choi, M.P.K., Chan, K.K.C., Leung, H.W., Huie, C.W.: Pressurized liquid extraction of active ingredients (ginsenosides) from medicinal plants using non-ionic surfactant solutions. *Journal of Chromatography A*, 983(1-2), 153 (2003)
31. Luthria, D.L., Biswas, R., Natarajan, S.: Comparison of extraction solvents and techniques used for the assay of isoflavones from soybean. *Food Chemistry*, 105(1), 325 (2007)
32. Zhu, Y., Yanagihara, K., Guo, F.M., Li, Q.X.: Pressurized fluid extraction for quantitative recovery of chloroacetanilide and nitrogen heterocyclic herbicides in soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(9), 4097 (2000)
33. Richter, B.E., Covino, L.: New environmental applications of accelerated solvent extraction. *Lc Gc North America*, 18(10), 1068 (2000)
34. Bernal, J.L., Delnozal, M.J., Jimenez, J.J.: Use of a High-Pressure Soxhlet Extractor for the Determination of Organochlorine Residues by Gas-Chromatography. *Chromatographia*, 34(9-10), 468 (1992)
35. Lopez-Avila, V.: Sample preparation for environmental analysis. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 29(3), 195 (1999)
36. Blanco, E.V., Mahia, P.L., Lorenzo, S.M., Rodriguez, D.P., Fernandez, E.F.: Optimization of microwave-assisted extraction of hydrocarbons in marine sediments: comparison with the Soxhlet extraction method. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 366(3), 283 (2000)
37. Camel, V.: Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 19(4), 229 (2000)
38. Renoe, B.W.: Microwave-Assisted Extraction. *American Laboratory*, 26(12), 34 (1994)
39. Saim, N., Dean, J.R., Abdullah, M.P., Zakaria, Z.: Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soil using Soxhlet extraction, pressurised and atmospheric microwave-assisted extraction, supercritical fluid extraction and accelerated solvent extraction. *Journal of Chromatography A*, 791(1-2), 361 (1997)
40. Letellier, M., Budzinski, H.: Microwave assisted extraction of organic compounds. *Analisis*, 27(3), 259 (1999)
41. Thompson, S., Budzinski, H., LeMenach, K., Letellier, M., Garrigues, P.: Multi-residue analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons, polychlorobiphenyls, and organochlorine pesticides in marine sediments. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 372(1), 196 (2002)
42. LopezAvila, V., Benedicto, J.: Microwave-assisted extraction combined with gas chromatography and enzyme-linked immunosorbent assay. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 15(8), 334 (1996)
43. Bouaid, A., Martin-Esteban, A., Fernandez, P., Camara, C.: Microwave-assisted extraction method for the determination of atrazine and four organophosphorus pesticides in oranges by gas chromatography (GC). *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 367(3), 291 (2000)
44. Papadakis, E.N., Vryzas, Z., Papadopoulou-Mourkidou, E.: Rapid method for the determination of 16 organochlorine pesticides in sesame seeds by microwave-assisted extraction and analysis of extracts by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1127(1-2), 6 (2006)
45. Franke, M., Winek, C.L., Kingston, H.M.: Extraction of selected drugs from serum using microwave irradiation. *Forensic Science International*, 81(1), 51 (1996)
46. Desrosiers, N.A., Betit, C.C., Watterson, J.H.: Microwave-assisted extraction in toxicological screening of skeletal tissues. *Forensic Science International*, 188(1-3), 23 (2009)

47. Kiss, G.A.C., Forgacs, E., Cserhati, T., Mota, T., Morais, H., Ramos, A.: Optimisation of the microwave-assisted extraction of pigments from paprika (*Capsicum annuum* L.) powders. *Journal of Chromatography A*, 889(1-2), 41 (2000)
48. Prados-Rosales, R.C., Garcia, J.L.L., de Castro, M.D.L.: Rapid analytical method for the determination of pesticide residues in sunflower seeds based on focused microwave-assisted Soxhlet extraction prior to gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 993(1-2), 121 (2003)
49. Priego-Capote, F., Luque-Garcia, U., de Castro, M.D.L.: Automated fast extraction of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons from soil by focused microwave-assisted Soxhlet extraction prior to gas chromatography-electron-capture detection. *Journal of Chromatography A*, 994(1-2), 159 (2003)
50. Capelo, J.L., Mota, A.M.: Ultrasonication for analytical chemistry. *Current Analytical Chemistry*, 1(2), 193 (2005)
51. Tadeo, J.L., Sanchez-Brunete, C., Albero, B., Garcia-Valcarcel, A.I.: Application of ultrasound-assisted extraction to the determination of contaminants in food and soil samples. *Journal of Chromatography A*, 1217(16), 2415 (2010)
52. Santos, H.M., Capelo, J.L.: Trends in ultrasonic-based equipment for analytical sample treatment. *Talanta*, 73(5), 795 (2007)
53. Huertas-Perez, J.F., Iruela, M.D., Garcia-Campana, A.M., Gonzalez-Casado, A., Sanchez-Navarro, A.: Determination of the herbicide metribuzin and its major conversion products in soil by micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1102(1-2), 280 (2006)
54. Lesueur, C., Gartner, M., Mentler, A., Fuerhacker, M.: Comparison of four extraction methods for the analysis of 24 pesticides in soil samples with gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-ion trap-mass spectrometry. *Talanta*, 75(1), 284 (2008)
55. Domeno, C., Blasco, M., Sanchez, C., Nerin, C.: A fast extraction technique for extracting polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from lichens samples used as biomonitors of air pollution: Dynamic sonication versus other methods. *Analytica Chimica Acta*, 569(1-2), 103 (2006)
56. Hyotylainen, T., Riekkola, M.L.: Potential of effective extraction techniques and new analytical systems for profiling the marine environment. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 26(8), 788 (2007)
57. Erbay, Z., Icier, F.: The Importance and Potential Uses of Olive Leaves. *Food Reviews International*, 26(4), 319 (2010)
58. Sanchez-Brunete, C., Perez, R.A., Miguel, E., Tadeo, J.L.: Multiresidue herbicide analysis in soil samples by means of extraction in small columns and gas chromatography with nitrogen-phosphorus and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 823(1-2), 17 (1998)
59. Sanchez-Brunete, C., Rodriguez, A., Tadeo, J.L.: Multiresidue analysis of carbamate pesticides in soil by sonication-assisted extraction in small columns and liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1007(1-2), 85 (2003)
60. Sanchez-Brunete, C., Albero, B., Tadeo, J.L.: Multiresidue determination of pesticides in soil by gas chromatography-mass spectrometry detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(6), 1445 (2004)
61. Kayali-Sayadi, M.N., Rubio-Barroso, S., Diaz-Diaz, C.A., Polo-Diez, L.M.: Rapid determination of PAHs in soil samples by HPLC with fluorimetric detection following sonication extraction. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 368(7), 697 (2000)

62. Sanchez-Brunete, C., Miguel, E., Tadeo, J.L.: Rapid method for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in agricultural soils by sonication-assisted extraction in small columns. *Journal of Separation Science*, 29(14), 2166 (2006)
63. Martinez, E., Gros, M., Lacorte, S., Barcelo, D.: Simplified procedures for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in water, sediments and mussels. *Journal of Chromatography A*, 1047(2), 181 (2004)
64. Oleszczuk, P., Baran, S.: Concentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludge-amended soil. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 36(9-10), 1083 (2005)
65. Rodriguez-Sanmartin, P., Moreda-Pineiro, A., Bermejo-Barrera, A., Bermejo-Barrera, P.: Ultrasound-assisted solvent extraction of total polycyclic aromatic hydrocarbons from mussels followed by spectrofluorimetric determination. *Talanta*, 66(3), 683 (2005)
66. Zhou, J.H., Xue, X.F., Li, Y., Zhang, J.Z., Chen, F., Wu, L.M., Chen, L.Z., Zhao, J.: Multiresidue determination of tetracycline antibiotics in propolis by using HPLC-UV detection with ultrasonic-assisted extraction and two-step solid phase extraction. *Food Chemistry*, 115(3), 1074 (2009)
67. Nania, V., Pellegrini, G.E., Fabrizi, L., Sesta, G., De Sanctis, P., Lucchetti, D., Di Pasquale, M., Coni, E.: Monitoring of perfluorinated compounds in edible fish from the Mediterranean Sea. *Food Chemistry*, 115(3), 951 (2009)
68. Collasiol, A., Pozebon, D., Maia, S.M.: Ultrasound assisted mercury extraction from soil and sediment. *Analytica Chimica Acta*, 518(1-2), 157 (2004)
69. Blackwell, P.A., Lutzhoft, H.C.H., Ma, H.P., Halling-Sorensen, B., Boxall, A.B.A., Kay, P.: Ultrasonic extraction of veterinary antibiotics from soils and pig slurry with SPE clean-up and LC-UV and fluorescence detection. *Talanta*, 64(4), 1058 (2004)
70. de Alda, M.J.L., Gil, A., Paz, E., Barcelo, D.: Occurrence and analysis of estrogens and progestogens in river sediments by liquid chromatography-electrospray-mass spectrometry. *Analyst*, 127(10), 1299 (2002)
71. Turiel, E., Martin-Esteban, A., Tadeo, J.L.: Molecular imprinting-based separation methods for selective analysis of fluoroquinolones in soils. *Journal of Chromatography A*, 1172(2), 97 (2007)
72. Xu, J., Wu, L.S., Chen, W.P., Chang, A.C.: Simultaneous determination of pharmaceuticals, endocrine disrupting compounds and hormone in soils by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1202(2), 189 (2008)
73. Zougagh, M., Valcarcel, M., Rios, A.: Supercritical fluid extraction: a critical review of its analytical usefulness. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 23(5), 399 (2004)
74. Mira, B., Blasco, M., Berna, A., Subirats, S.: Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of essential oil from orange peel. Effect of operation conditions on the extract composition. *Journal of Supercritical Fluids*, 14(2), 95 (1999)
75. Stashenko, E.E., Puertas, M.A., Combariza, M.Y.: Volatile secondary metabolites from *Spilanthes americana* obtained by simultaneous steam distillation solvent extraction and supercritical fluid extraction. *Journal of Chromatography A*, 752(1-2), 223 (1996)
76. Reindl, S., Hofler, F.: Optimization of the Parameters in Supercritical-Fluid Extraction of Polynuclear Aromatic-Hydrocarbons from Soil Samples. *Analytical Chemistry*, 66(11), 1808 (1994)
77. Lee, H.B., Peart, T.E., Hongyou, R.L., Gere, D.R.: Supercritical Carbon-Dioxide Extraction of Polycyclic Aromatic-Hydrocarbons from Sediments. *Journal of Chromatography A*, 653(1), 83 (1993)

78. Schantz, M.M., Bowadt, S., Benner, B.A., Wise, S.A., Hawthorne, S.B.: Comparison of supercritical fluid extraction and Soxhlet extraction for the determination of polychlorinated biphenyls in environmental matrix standard reference materials. *Journal of Chromatography A*, 816(2), 213 (1998)
79. Eisenmenger, M., Dunford, N.T.: Bioactive components of commercial and supercritical carbon dioxide processed wheat germ oil. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 85(1), 55 (2008)
80. de Azevedo, A.B.A., Kieckbush, T.G., Tashima, A.K., Mohamed, R.S., Mazzafera, P., de Melo, S.A.B.V.: Extraction of green coffee oil using supercritical carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids*, 44(2), 186 (2008)
81. Davarnejad, R., Kassim, K.M., Zainal, A., Sata, S.A.: Supercritical fluid extraction of beta-carotene from crude palm oil using CO<sub>2</sub>. *Journal of Food Engineering*, 89(4), 472 (2008)
82. Kim, W.J., Kim, J.D., Kim, J., Oh, S.G., Lee, Y.W.: Selective caffeine removal from green tea using supercritical carbon dioxide extraction. *Journal of Food Engineering*, 89(3), 303 (2008)
83. Mitra, P., Ramaswamy, H.S., Chang, K.S.: Pumpkin (*Cucurbita maxima*) seed oil extraction using supercritical carbon dioxide and physicochemical properties of the oil. *Journal of Food Engineering*, 95(1), 208 (2009)
84. Shi, J., Yi, C., Ye, X.Q., Xue, S., Jiang, Y.M., Ma, Y., Liu, D.H.: Effects of supercritical CO<sub>2</sub> fluid parameters on chemical composition and yield of carotenoids extracted from pumpkin. *Lwt-Food Science and Technology*, 43(1), 39 (2010)
85. Yu, J., Liu, Y.F., Qiu, A.Y., Wang, X.G.: Preparation of isoflavones enriched soy protein isolate from defatted soy hypocotyls by supercritical CO<sub>2</sub>. *Lwt-Food Science and Technology*, 40(5), 800 (2007)
86. Bernal, J.L., Nozal, M.J., Toribio, L., Diego, C., Mayo, R., Maestre, R.: Use of supercritical fluid extraction and gas chromatography-mass spectrometry to obtain amino acid profiles from several genetically modified varieties of maize and soybean. *Journal of Chromatography A*, 1192(2), 266 (2008)
87. Vagi, E., Simandi, B., Vasarhelyine, K.P., Daood, H., Kery, A., Doleschall, F., Nagy, B.: Supercritical carbon dioxide extraction of carotenoids, tocopherols and sitosterols from industrial tomato by-products. *Journal of Supercritical Fluids*, 40(2), 218 (2007)
88. Abbasi, H., Rezaei, K., Emamdjomeh, Z., Mousavi, S.M.E.: Effect of various extraction conditions on the phenolic contents of pomegranate seed oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110(5), 435 (2008)
89. Braga, M.E.M., Santos, R.M.S., Seabra, I.J., Facanali, R., Marques, M.O.M., de Sousa, H.C.: Fractioned SFE of antioxidants from maritime pine bark. *Journal of Supercritical Fluids*, 47(1), 37 (2008)
90. Icen, H., Guru, M.: Extraction of caffeine from tea stalk and fiber wastes using supercritical carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids*, 50(3), 225 (2009)
91. Hamdan, S., Daood, H.G., Toth-Markus, M., Illes, V.: Extraction of cardamom oil by supercritical carbon dioxide and sub-critical propane. *Journal of Supercritical Fluids*, 44(1), 25 (2008)
92. Yang, Z.N., Luo, S.Q., Peng, Q.C., Zhao, C., Yu, Z.W.: GC-MS Analysis of the Essential Oil of Coral Ginger (*Zingiber corallinum* Hance) Rhizome Obtained by Supercritical Fluid Extraction and Steam Distillation Extraction. *Chromatographia*, 69(7-8), 785 (2009)
93. Salimi, A., Fatemi, S., Nei, H.Z.N., Safaralie, A.: Mathematical Modeling of Supercritical Extraction of Valerenic Acid from *Valeriana officinalis* L. *Chemical Engineering & Technology*, 31(10), 1470 (2008)



94. Machmudah, S., Kawahito, Y., Sasaki, M., Goto, M.: Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of rosehip seed oil: Fatty acids composition and process optimization. *Journal of Supercritical Fluids*, 41(3), 421 (2007)
95. Machmudah, S., Kawahito, Y., Sasaki, M., Goto, M.: Process optimization and extraction rate analysis of carotenoids extraction from rosehip fruit using supercritical CO<sub>2</sub>. *Journal of Supercritical Fluids*, 44(3), 308 (2008)
96. Miyawaki, T., Kawashima, A., Honda, K.: Development of supercritical carbon dioxide extraction with a solid phase trap for dioxins in soils and sediments. *Chemosphere*, 70(4), 648 (2008)
97. Boulaid, M., Aguilera, A., Busonera, V., Camacho, F., Monterreal, A.V., Valverde, A.: Assessing supercritical fluid extraction for the analysis of fipronil, kresoxim-methyl, acrinathrin, and pyridaben residues in melon. *Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes*, 42(7), 809 (2007)
98. Yang, Y., Cajthaml, T., Hofmann, T.: PAH desorption from river floodplain soils using supercritical fluid extraction. *Environmental Pollution*, 156(3), 745 (2008)
99. Kawashima, A., Watanabe, S., Iwakiri, R., Honda, K.: Removal of dioxins and dioxin-like PCBs from fish oil by countercurrent supercritical CO<sub>2</sub> extraction and activated carbon treatment. *Chemosphere*, 75(6), 788 (2009)

