



Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi

Araştırma Makalesi

Dişbudak Ağacı (Fraxinus Excelsior) Yapraklarından Klorojenik Asit Ekstraksiyonunun Yüzey Yanıt Metodolojisi ile Optimizasyonu ve Toplam Fenolik İçeriklerinin Tayin Edilmesi

 Yakup ATICI^{a,*},  İbrahim BULDUK^b

^a Kimya Mühendisliği Bölümü, Mühendislik Fakültesi, İstanbul Üniversitesi, İstanbul, TÜRKİYE

^b İş Sağlığı ve Güvenliği Bölümü, Uşak Sağlık Yüksekokulu, Uşak Üniversitesi, Uşak, TÜRKİYE

* Sorumlu yazarın e-posta adresi: yakupatici24@gmail.com

DOI : 10.29130/dubited.508604

ÖZET

Bitkisel kaynaklı besinlerin rengi, lezzeti ve dayanıklılığı üzerine etkili olan fenolik maddeler, antioksidan özelliklerine bağlı olarak antikanserojen, ve antimikrobiyal aktivite göstermeleri bakımından da insan sağlığı ile yakından ilişkilidir. Fenolik maddelerden biri de klorojenik asittir. Bu çalışmada, toplanan dişbudak ağacı yaprakları güneş almaksızın kurutulup sap kısmı ayrılıp öğütüldü. Öğütülen kısımlar su ile ekstrakte edildi. Ekstraktlar HPLC (Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi) kromatografik sistemde analiz edilerek, sonuçlar ppm düzeyinde ifade edildi. Box-Behnken tasarımına dayalı Yüzey Yanıt Yönteminin (RSM) kullanıldığı ultrasonik destekli ekstraksiyon ile Fraxinus Excelsior yapraklarından klorojenik asit ekstraksiyonunun optimum koşulları belirlendi. Ekstraksiyon verimi üzerine etkin deneysel koşullar; ekstraksiyon süresi (15-45 dakika), sıcaklık (30-70°C), ultrason gücü (25-75%) olarak seçilmiştir. Bu parametrelerin en iyi muhtemel kombinasyonları RSM ile elde edildi. Fraxinus Excelsior yaprakları için optimum koşulların; ultrason gücünün %39,12, ekstraksiyon süresinin 15,18 dakika, ekstraksiyon sıcaklığının 69,98°C olduğu belirlendi. Bu koşullarda maksimum klorojenik asit miktarı 11,70 ppm olarak belirlendi. Ayrıca antioksidan aktivitelerini görmek amacıyla UV spektrometre ile dişbudak ağacı yapraklarındaki toplam fenolik içerikleri ölçüldü. Öğütülmüş yapraklar etanol ile ekstrakte edildi. Ölçüm için kör, standart ve numune olmak üzere 3 tüp hazırlandı. Her bir numune kabından örnekler alınarak UV spektrometrede 765 nm’de absorbans değerleri ölçüldü. Fraxinus Excelsior yapraklarından toplam fenolik içeriğinin ölçülmesi için optimum koşulları belirlendi. Dişbudak yaprağı için optimum koşullar; ultrason gücü %47,76, süre 29,69 dakika, etanol konsantrasyonu %54,40 olarak belirlendi. Optimum koşullarda dişbudak yaprağındaki toplam fenolik içeriği 40,74 ppm bulundu. Buna göre elde edilen bu sonuçlar klorojenik asit etken bileşeninin ekstraksiyonu için ultrasonik destekli ekstraksiyonun (UAE) etkili bir metot olabileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Klorojenik Asit, Dişbudak Ağacı Yaprakları (Fraxinus Excelsior), Ekstraksiyon, Optimizasyon.

Optimization of Chlorogenic Acid Extraction from Ash Leave (Fraxinus Excelsior) by Response Surface Methodology and Determination of Total Phenolic Contents

ABSTRACT

One of the phenolic substances is chlorogenic acid. In this study, the collected ash tree leaves were dried. The milled fractions were extracted with water. The extracts were analyzed by HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) chromatographic system and the results were expressed in ppm. Optimum conditions of chlorogenic acid extraction from Fraxinus Excelsior leaves were determined by ultrasonic assisted extraction using Surface Response Method (RSM) based on Box-Behnken design. Effective experimental conditions on extraction yield; extraction time (15-45 minutes), temperature (30-70°C), ultrasound power (25-75%). The best possible combinations of these parameters were obtained by RSM. Optimum conditions for Fraxinus Excelsior leaves; 39,12% of ultrasound power, extraction time 15,18 minutes, the extraction temperature was determined to be 69,98°C. Under these conditions, the maximum amount of chlorogenic acid was determined to be 11,70 ppm. In addition, total phenolic contents of ash tree leaves were measured by UV spectrometer. The milled leaves were extracted with ethanol. Three tubes were prepared as blind, standard and sample. Samples were taken from each sample cup and absorbance values were measured at 765 nm in UV spectrometer. Optimum conditions for the measurement of total phenolic content of Fraxinus Excelsior leaves were determined. Optimum conditions for ash leaf; ultrasound power was 47,76%, duration 29,69 min, ethanol concentration 54,40%. The total phenolic content of ash leaf was found to be 40,74 ppm under optimum conditions. Accordingly, these results show that ultrasonic assisted extraction (UAE) can be an effective method for the extraction of the active ingredient chlorogenic acid.

Keywords: Chlorogenic Acid, Ash Tree Leaves (Fraxinus Excelsior), Extraction, Optimization

I. GİRİŞ

Klorojenik asit bitkinin tohumlarında, köklerinde ve yapraklarında doğal olarak bulunan bir bileşiktir. Klorojenik asitin en yaygın bilinen kaynakları kahve, enginar yaprağı, dişbudak yaprağı, kayısı yaprağı, patlıcan, erik, kivi, ısırgan otu gibi kaynaklardır. Büyük miktarda ve yüksek saflıkta klorojenik asit üretmek için araştırmalar her geçen gün artarak devam etmektedir. İlaç endüstrisi özellikle etkin maliyetli ve çevre dostu üretim yöntemleriyle ilgilenmektedir [1].

Önceden yapılan çalışmaların raporlarında klorojenik asitin kan basıncını düşürdüğü gözlemlenmiştir. Yine başka bir çalışmada, klorojenik asitin müshil etkisi yaptığı ortaya konulmuştur. Klorojenik asit insanlardaki bazı bitkilere karşı allerjik durumlarında bir duyarlaştırıcı olduğu öne sürülmektedir. Ayrıca fareler üzerinde yapılan çalışmalarda klorojenik asitin, psikostimülan (Merkezî sinir sistemindeki nöronları doğrudan uyaran ilaçların bir grubu) etkilere sahip olabileceği gözlemlenmiştir. Bunların yanı sıra klorojenik asitin, nöroenflamatuar koşullarda dopaminerjik nöronlar üzerinde yapılan çalışmalarda koruyucu etkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir [6].

Klorojenik asit ülkemizde üretilmemekte olup hem ilaç formunda hem de ilaç etken maddesi olarak ithal edilmektedir. Adı geçen bitkilerin yapraklarından klorojenik asit izole edilmesi ve saflaştırılması için kolay uygulanabilir bir metodun geliştirilmesi ile ülkemiz ilaç ve kimya sanayi için önemli bir gelişme

olacağı düşünülmektedir [2-3]. Bitkilerden doğal klorojenik asit geleneksel olarak çözücü ekstraksiyonu yöntemiyle üretilir.

Geleneksel üretim yöntemlerinde çevre ve insan sağlığını olumsuz etkileyecek toksik kimyasallar kullanılmaktadır. Geleneksel yöntemlerde üretim süreleri uzun ve maliyet yüksektir [4]. Kısa ekstraksiyon zamanı, minimum organik çözücü tüketimi ve çevre dostu yeni ekstraksiyon tekniklerine artan bir talep vardır. Ultrasonik destekli ekstraksiyon ucuz, basit ve geleneksel ekstraksiyon tekniklerine alternatiftir. Ancak dişbudak yaprağı ile ilgili olarak yaygın bir ekstraksiyon prosedürü mevcut değildir. Ekstraksiyon metodu tasarlanmalı ve optimize edilmelidir. Ekstraksiyon için çözücü tipi, solvent konsantrasyonu, katı/çözücü oranı, ekstraksiyon sıcaklığı, ekstraksiyon süresi ve ultrason gücü endüstriyel prosesi etkileyen işletme parametreleridir. Prosesi optimize etmek için diğer işletme parametreleri arasında muhtemel etkileşimler düşünülmelidir. Yüzey Yanıt Metodolojisi (RSM) işletme parametreleri arasındaki muhtemel etkileşimleri göz önünde bulundurur. RSM prosesin optimizasyonu, iyileştirilmesi ve geliştirilmesi için kullanılan istatistiksel ve matematiksel tekniklerin birleşimidir [8].

Yüzey yanıt metodolojisini ilk olarak Box ve Wilson çeşitli prosesler üzerindeki etkilerini değerlendirmiştir. Sonuç olarak, Yüzey yanıt metodolojisi prosesler için başarılı bir şekilde kullanılan matematiksel ve istatistiksel tekniklerin toplamıdır. Temel avantajı çoklu parametreleri değerlendirmek için ihtiyaç duyulan deney sayısını azaltmasıdır [9].

Yüzey yanıt metodolojisi fenolik bileşenlerin ekstraksiyonunu içeren besin sistemleriyle [10] ilgili biyokimyasal ve biyoteknolojik prosesleri optimize etmek için başarılı bir şekilde kullanılmıştır.

II. MATERYAL VE METOT

A. KULLANILAN MATERYAL

Deneyel çalışmalarda kullanılacak dişbudak ağacı yaprakları bahar aylarında Trakya Bölgesi'nden toplandı ve oda sıcaklığında karanlık odada bir ay süreyle kurutuldu. Kurutulmuş yapraklar ekstraksiyondan önce robot ile 80-100 mesh tane boyut aralığına öğütülmüştür.

Deneylerde kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıkta ve analizlerde kullanılan kimyasallar HPLC grade saflıktadır. Metanol, Amonyak, Asetik Asit, Hidroklorik Asit ve Sodyum Hidroksit ve Klorojenik asit standardı Sigma-Aldrich firmasından satın alındı. Çözücü olarak Millipore Milli-Q Su Saflaştırma Sisteminden elde edilen $18\text{ m}\Omega$ deiyonize su kullanıldı. Tampon çözeltilerin filtrasyonu için 0,45 μm boyutunda membran filtre (Millipore, Bedford, MA, USA) kullanılmıştır. Standart olarak kullanılan Klorojenik asitin özellikleri Çizelge 1' de gösterilmiştir.

B. ULTRASONİK DESTEKLİ EKSTRAKSİYON

Ultrasonik destekli ekstraksiyon Bandelin Sonorex marka 50 kHz frekanslı ultrasonik banyoda yapıldı. Erlen içerisine kurutulmuş ve öğütülmüş dişbudak ağacı yapraklarından 500 mg tartıldı. Üzerine 30 ml saf su ilave edildi. Erlenin ağzı alüminyum folyo ile kapatıldı ve banyo içerisine yerleştirildi. Erlendeki çözücü düzeyi ile ultrasonik banyodaki su düzeyi aynı tutuldu.

Tabloda belirtilen ultrason gücü, sıcaklık ve süre cihaza ayarlanarak cihaz çalıştırıldı. Ekstraksiyon işlemi tamamlandıktan sonra kapilerin tıkanmasını önlemek amacıyla çözelti önce Whatman marka filtre kâğıdı ile daha sonra 0,45 mikronluk membran filtre ile filtre edildi.

C. KROMATOGRFİK KOŞULLAR (HPLC METODU)

Ekstraktlardaki klorojenik asitin tanımlanması ve miktarının belirlenmesi oto örnekleyici, quaternar pompa, kolon fırını ve UV dedektör içeren ve bir Base-Deactivated Octa decyl silyl Silica Gel, 5 μm , 4.0 x 250 mm kolon kullanan Agilent 1260 Kromatografik Sistem ile yapıldı.

D. HPLC ANALİZ METODUNUN VALİDASYON ÇALIŞMALARI

Analiz metodunun validasyon çalışmaları kapsamında Sigma Aldrich firmasından temin edilen toz formundaki klorojenik asit standardı kullanılarak 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm ve 100 ppm'lik standart çözeltiler hazırlandı. Bu standart çözeltiler her biri beşer kez HPLC cihazına enjeksiyonu yapıldı. Elde edilen kromatogramlardaki pik alanlarından yararlanılarak gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik, kalibrasyon doğrusallığı ve tekrarlanabilirlik testleri yapıldı, konsantrasyon aralığı, korelasyon katsayısı, kayma, eğim, teşhis limiti değeri (LOD), tayin limiti değeri (LOQ) ve alıkonma zamanı tespit edildi.

E. TOPLAM FENOLİK MADDE MİKTARI TAYİNİ

Karanlık bir odada kurutulmuş numunelerin yaprakları ayrılarak laboratuvar tipi değirmende öğütüldü. 1 gr kurutulmuş öğütülmüş numuneden tartılarak 200 ml'lik erlene aktarıldı. Üzerine 50 ml (%70 Metanol + %30 demineralize su) ekstraksiyon çözücüsü eklendi. Ultrasonik banyoda 30 dk süreyle ekstraksiyon işlemi gerçekleştirildi. Ekstraksiyon tamamlanınca ekstrakt beyaz bant süzgeç kâğıdı ile süzüldü. Analize kadar ekstraktlar buzdolabında saklandı.

Ekstraktlarda Toplam Fenolik Madde miktarı tayini Folin Ciocaltaeu Yöntemine göre yapılmıştır. Standart olarak Gallik Asit kullanılmış, Fenolik içerikler Gallik Asit eşdeğeri olarak verilmiştir. Bu yöntemde 250 µl Folin Ciocaltaeu Phenol Reagent 50 µl ekstrakt ile karıştırıldı ve 500 µl % 20lik Sodyum Karbonat çözeltisi karışıma eklendi. Hacim 5 ml'ye demineralize su ile tamamlandı. Yarım saat karanlık bir odada bekletildikten sonra spektrofotometre ile (Perkin Elmer marka Lambda 35 model UV-VIS Spektrofotometre)765 nm dalga boyunda absorbanası ölçüldü. Ölçülen absorbanas değerinden Gallik Asit eşdeğeri olarak mg/gr toplam fenolik içerik sonucu hesaplanmıştır.

III. SONUÇLAR

A. ANALİTİK METODUN DOĞRUSALLIĞI

5 farklı konsantrasyona karşı elde edilen pik alanları grafiğe geçirilerek kalibrasyon doğrusallığı elde edilmiştir. Cihazın kalibrasyonu için 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, 100 ppm'lik standart çözeltilerinden ardı ardına beşer enjeksiyon yapıldı.

Tablo 1. HPLC (Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi) metodu

HPLC Analiz Metodu	
Kolon	Base-deactivated Octa decylsilyl Silica, 5 µm, 4.0 x 250mm
Mobil Faz	Mobil Faz A: %15 metanol + %85 ml saf su karışımı hazırlanır. pH seyreltik fosforik asit çözeltisi ile 2 ye ayarlanır. Mobil Faz B: Saf metanol
Enjeksiyon Hacmi	20 ml
Kolon Sıcaklığı	30°C
Dedeksiyon	330 nm
Akış Hızı	1 ml/dk
Analiz Süresi	36 dakika

Tablo 2. Analitik metodun validasyonu süresince farklı parametrelerin testinden elde edilen sonuçlar

Parametreler	Klorojenik Asit	
Linearite	Konsantrasyon Aralığı (ppm)	20-100
	Korelasyon Katsayısı	0,9999
	Kayma	4,526
	Eğim	6,4094
LOD	0,076	
LOQ	0,254	
Alıkonma Zamanı (dk)	9,480	

Tablo 3. Bağımsız değişkenlerin değerleri ve semboller

Bağımsız Değişkenler	Birimler	Değişkenlerin Sembolleri	Kod Düzeyleri		
			-1	0	1
Ultrason Gücü	%	A	25	50	75
Ekstraksiyon Süresi	dk	B	15	30	45
Ekstraksiyon Sıcaklığı	°C	C	30	50	70

Tablo 4. Dişbudak yaprağı ekstraksiyon verimi için deneysel sonuçlar

Deney No	Sonuçlar			
	Ultrason Gücü* (%)	Süre (dk)	Sıcaklık (°C)	Klorojenik Asit Verim (ppm)
1	50	45	70	11,49
2	25	30	70	11,16
3	50	30	50	8,13
4	75	15	50	8,04
5	25	30	30	6,75
6	25	15	50	6,72
7	50	15	30	6,85
8	75	45	50	7,95
9	50	30	50	7,09
10	50	30	50	8,15
11	75	30	70	10,35
12	50	30	50	7,47
13	50	45	30	9,30
14	75	30	30	6,66
15	50	15	70	11,70
16	25	45	50	8,24
17	50	30	50	8,12

* Ultrasonik banyonun toplam gücü 420 wattır.

B. ULTRASONİK DESTEKLİ EKSTRAKSİYON PERFORMANSI ÜZERİNE EKSTRAKSİYON ZAMANININ ETKİSİ

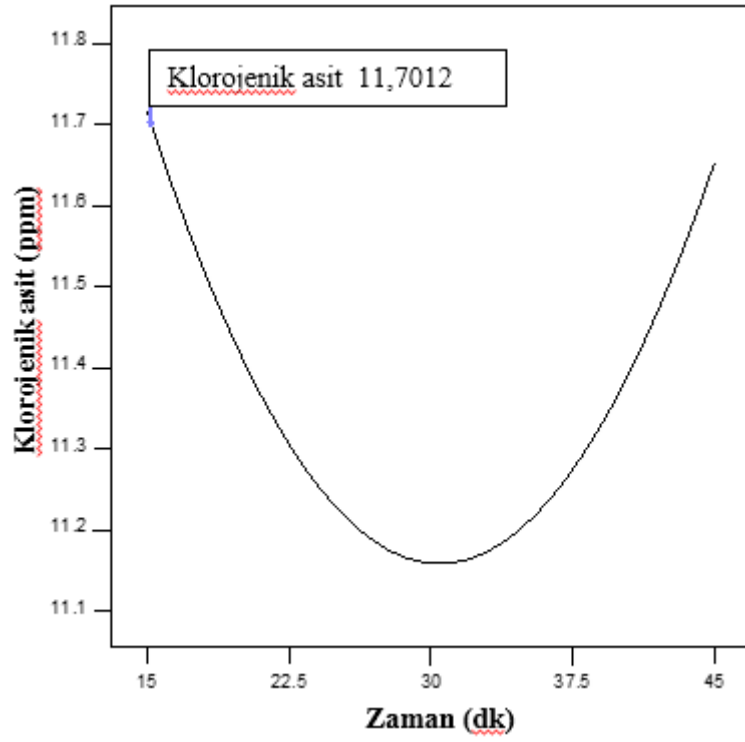
Ekstraksiyon verimi üzerine ultrason zamanının etkisi 15-45 dakika aralığında test edildi. Sonuçlar Tablo 4' de verilmiştir. Sonuçlar gösteriyor ki 15-30 dk arası çözücüye geçen klorojenik asit miktarı azalırken, 30. dakikadan sonra klorojenik asit miktarı giderek artmıştır. Klorojenik asitin çözücüye salınması ve hücre duvarlarının zarar görmesi için 15 dakika ultrason süresi yeterli olmaktadır.

C. ULTRASONİK DESTEKLİ EKSTRAKSİYON PERFORMANSI ÜZERİNE EKSTRAKSİYON SICAKLIĞININ ETKİSİ

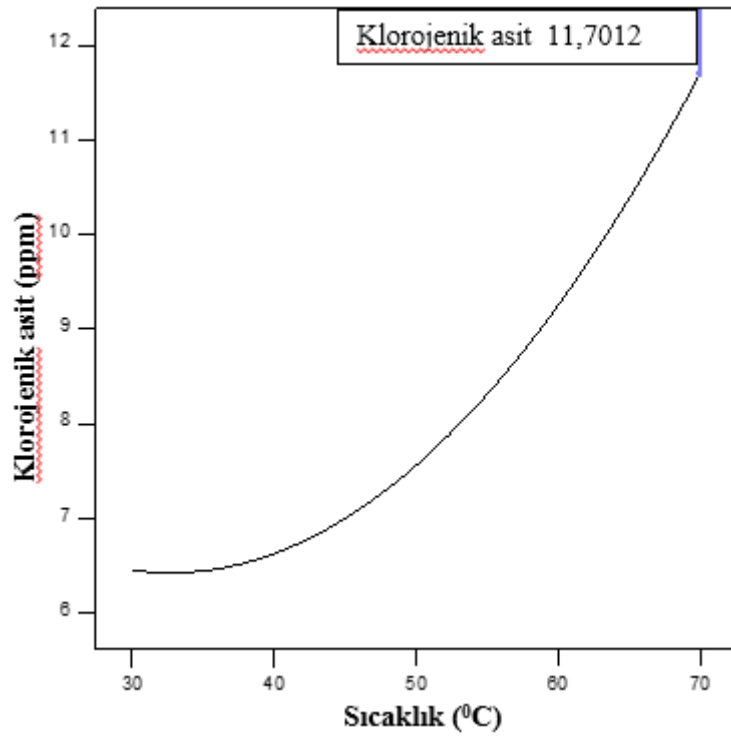
Daha yüksek sıcaklıklarda çalışmak pratik ve ekonomik olmadığı için dişbudak ağacı yapraklarının ekstraksiyonu 30-70°C aralığında değişen sıcaklıklarda yapılmıştır. Beklenildiği gibi klorojenik asitin ekstraksiyon verimi sıcaklığın bir fonksiyonu olarak kararlı bir şekilde artmıştır. Genelde yüksek sıcaklıktaki ekstraksiyonlar kütle transferini ve ekstraksiyon performansını artırır.

D. ULTRASONİK DESTEKLİ EKSTRAKSİYON PERFORMANSI ÜZERİNE ULTRASON GÜCÜNÜN ETKİSİ

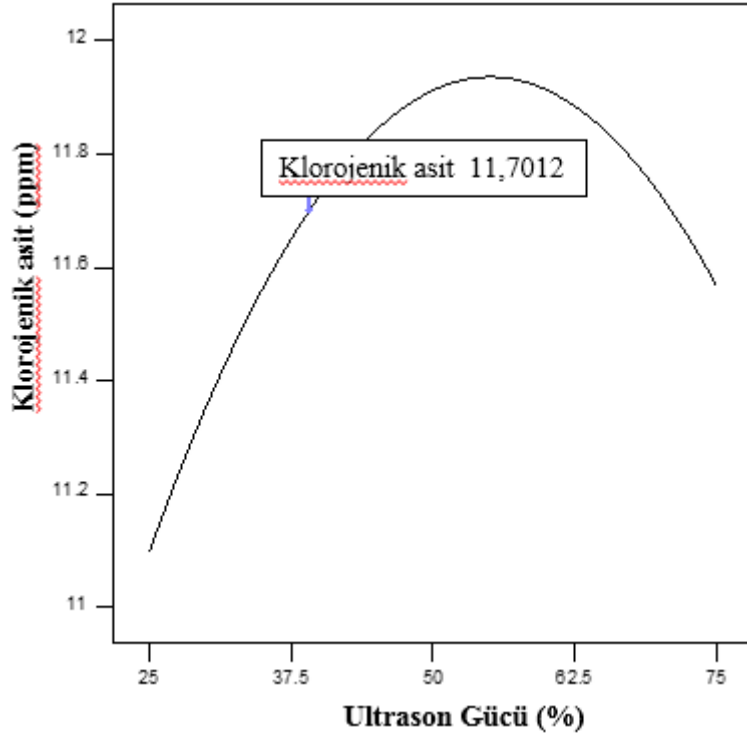
Ultrason gücünün artmasıyla dişbudak yaprağından çözücüye geçen klorojenik asit miktarı belli bir noktaya kadar artmıştır.



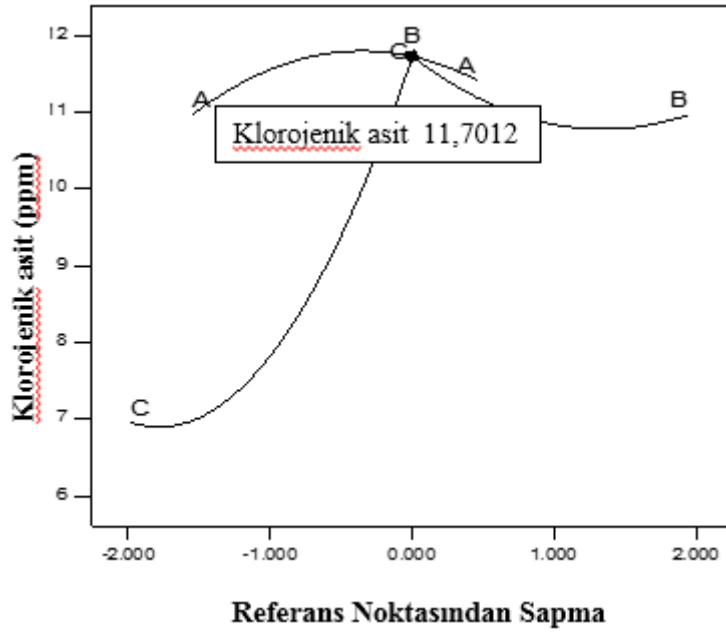
Şekil 1. Dişbudak ağacı yaprağında klorojenik asit veriminin ekstraksiyon zamanıyla değişimi



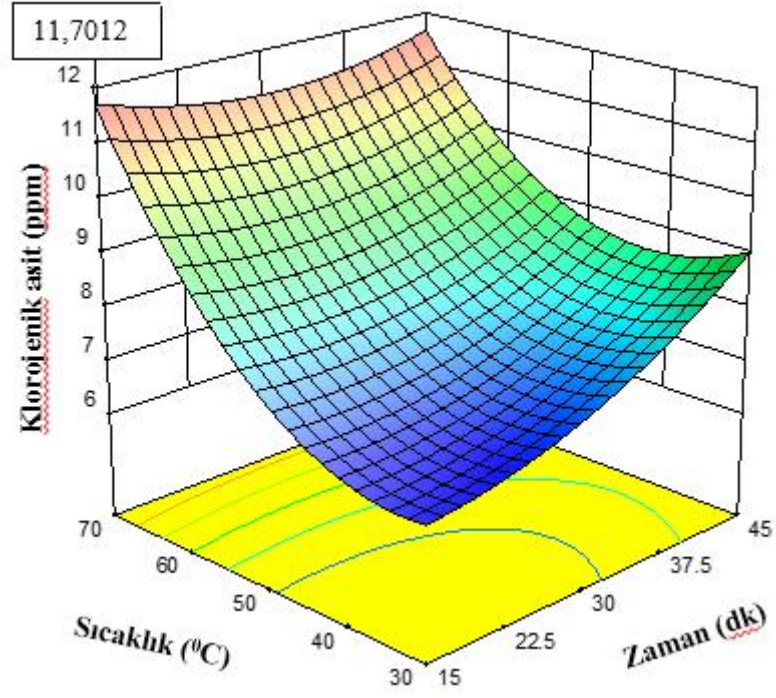
Şekil 2. Dişbudak ağacı yaprağından klorojenik asit ekstraksiyon veriminin sıcaklıkla değişimi



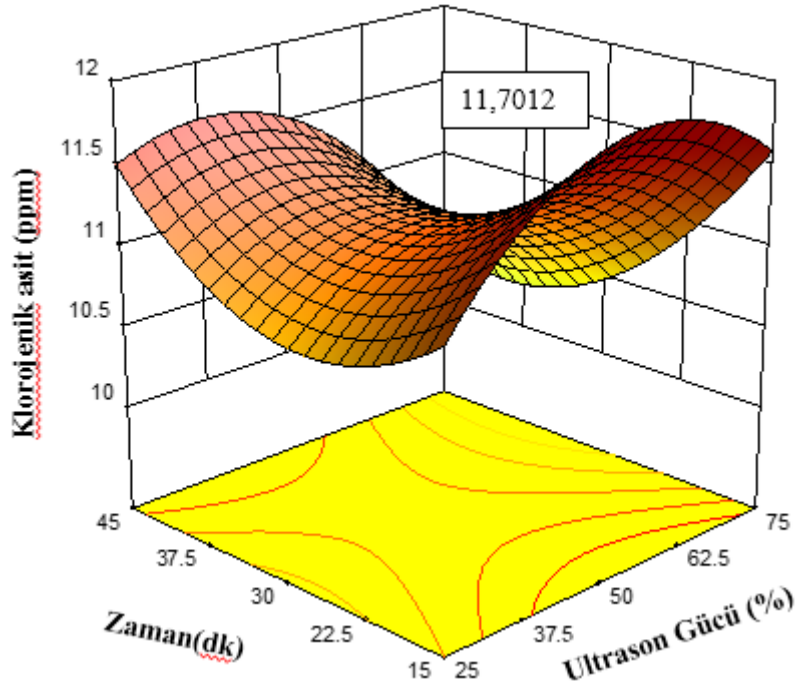
Şekil 3. Dişbudak ağacı yapraklarından klorojenik asit ekstraksiyon veriminin ultrason gücüyle değişimi



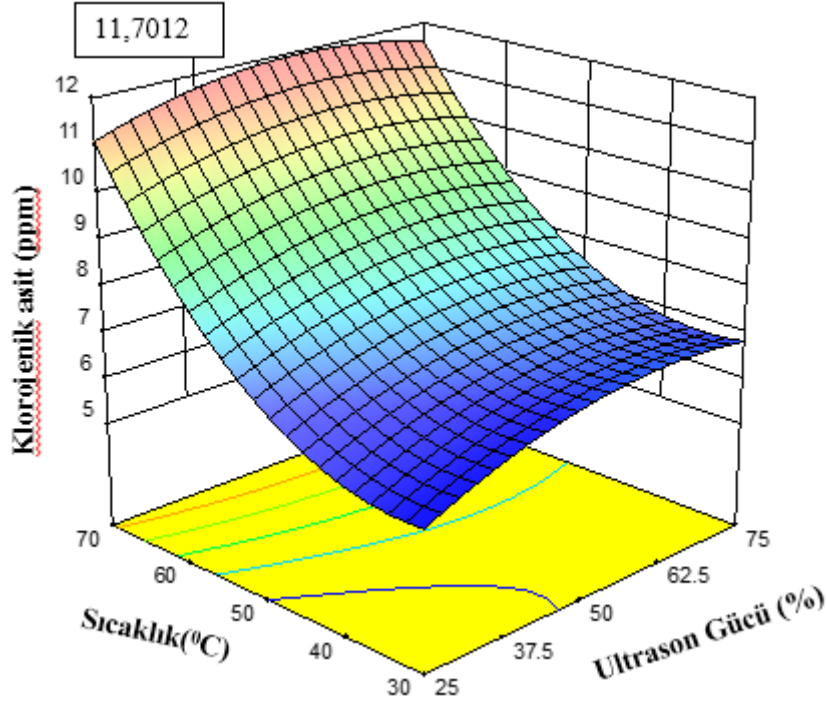
Şekil 4. Dişbudak ağacının yaprağından klorojenik asit ekstraksiyon veriminin tüm değişkenler ile değişimi grafiği (A: Ultrason gücü B: Zaman, C: Sıcaklık)



Şekil 5. Ekstraksiyon sıcaklığına zaman oranının bir fonksiyonu olarak dişbudak ağacı yapraklarından klorojenik asit verimi için yüzey yanıt grafiği



Şekil 6. Ekstraksiyon zamanına ultrason gücü oranının bir fonksiyonu olarak dişbudak ağacı yapraklarından klorojenik asit verimi için yüzey yanıt grafiği



Şekil 7. Ekstraksiyon sıcaklığına ultrason gücü oranının bir fonksiyonu olarak dişbudak ağacı yapraklarından klorojenik asit verimi için yüzey yanıt grafiği

E. YÜZEY YANIT METODUYLA ULTRASONİK DESTEKLİ EKSTRAKSİYONUN OPTİMİZASYONU

Aynı anda tek faktör yaklaşımı olarak bilinen proses değişkenlerinin bireysel etkileri önceki bölümde uygulandı. Bu klasik yaklaşım proses değişkenlerinin birbiriyle olan muhtemel etkileşimlerini göz ardı eder. Yüzey yanıt metodolojisi işletme parametreleri arasındaki muhtemel etkileşimleri göz önünde bulundurur.

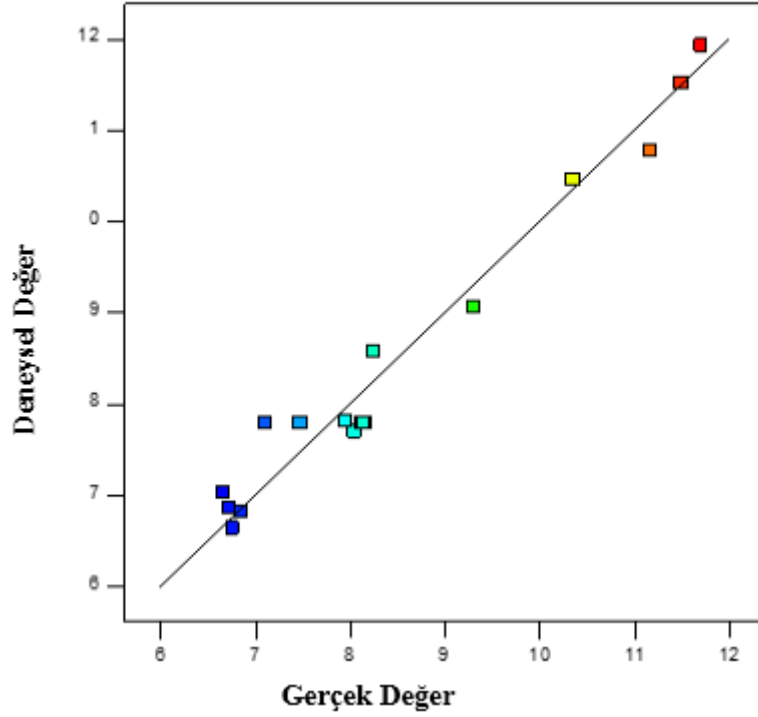
Çizelge minimum, orta, maksimum noktaları içeren üç parametreyi (Ultrason gücü, zaman ve sıcaklık) göstermektedir. 17 deney çalışıldı, dizayn expert software tarafından rastgele seçildi ve yanıtlar kaydedildi. Yazılım nedeniyle yüzey yanıt metodolojisi kullanan, ekstraksiyon verimleri için sadece adım adım ileri değil aynı zamanda geri yok etme regresyonlarını uygulayan kuadratik bir model elde edildi.

Software'den yüzey yanıt metodu kullanan kuadratik bir model aşağıda verildiği gibi türetildi.

$$\text{Model} = 8,05369 + 0,0934110 * A + 1,35 * 10^{-3} * B - 0,21831 * C - 2,21 * 10^{-3} * B * C - 9,27 * 10^{-4} * A^2 + 2,33 * 10^{-3} * B^2 + 3,79 * 10^{-3} * C^2$$

A: Ultrason Gücü, B: Zaman, C: Sıcaklık

Deneysel Değer & Gerçek Değer



Şekil 8. Dişbudak yaprağı için denklemden elde edilen değerler ile deneysel verilerin karşılaştırılması (Deneysel veriler Tablo 4 te verilmiştir)

Optimum ekstraksiyon koşulları dizayn expert software optimizasyonu kullanarak bulundu. Bu değerler dişbudak ağacı yaprakları (*Fraxinus Excelsior*) için ultrason gücünün %39,12, ekstraksiyon süresinin 15,18 dakika, ekstraksiyon sıcaklığının 69,98°C olduğu optimum koşullar belirlendi. Bu koşullarda maksimum klorojenik asit miktarı 11,70 ppm olarak belirlendi. Optimal koşullar bulunduktan sonra gerçek numune ekstraksiyonu deneyleri 3 kez tekrarlandı ve sonra relatif standart sapmalı ortalama hesaplandı.

Ortalama: 10,2553

Standart Sapma: 0,015

Relatif Standart Sapma: 0,425

Klorojenik asit miktar (mg/500 mg numune): 10,2553 ± 0,015

İstatistiksel değerlendirme için sonuçlar uygundur.

F. MODEL UYGUNLUĞU

Ekstraksiyon verimlerinin yanıtları için dizayn expert 8.0.7.1 kuadrik denklemleri için varyans (ANOVA) analizleri kullanılmıştır. Değişkenlerin en uygununu elde etmek için stepwise (adım adım) regresyonu kullanıldı. Geri teknikler parametreleri tahmin etmek için tüm değişkenleri içermektedir. Standardize betanın en yüksek değerlerine sahip önemli değişkenler denkleme katılacaktır [10-11].

Çalışmamızda, türetilen model ekstraksiyon verimleri için R-Squared (0,9650); Adj R-Squared (0,9200) ve Pred R-Squared (0,7325) değerleri elde edilmiştir. Bu değerler türetilen modelin hassasiyetini göstermektedir. Sonuçta, ultrasonik destekli ekstraksiyon ile dişbudak ağacı yapraklarından ekstraksiyon veriminin belirlenmesi yüzey yanıt modellemesi ile başarılıdır. Ayrıca varyasyon katsayısı değeri: C.V = %5,70 olarak bulunmuştur. Bu düşük varyasyon değeri deneysel sonuçların güvenilirliği ve yüksek hassasiyetini gösterilmektedir.

Tablo 5. Dişbudak yaprağı ANOVA tablosu

Kaynak	Kareler Toplamı	df	Kareler Ortalaması	F Değeri	P Değeri P Olasılık> F
Model	45,05	9	5,01	21,44	0,0003
A-Ultrason Gc	2,112E-003	1	2,112E-003	9,047E-003	0,9269
B-Zaman	1,68	1	1,68	7,21	0,0313
C-Sicaklik	28,65	1	28,65	122,70	< 0,0001
AB	0,65	1	0,65	2,78	0,1397
AC	0,13	1	0,13	0,56	0,4805
BC	1,77	1	1,77	7,58	0,0284
A²	1,42	1	1,42	6,06	0,0433
B²	1,16	1	1,16	4,97	0,0609
C²	9,70	1	9,70	41,54	0,0004
Artık Değer	1,63	7	0,23	-	-
Uyum eksikliği	0,69	3	0,23	0,97	0,4897
Hata	0,95	4	0,24	-	-
Düz Toplam	46,69	16		-	-

*Düz. Toplam: Düzeltmiş ortalamaların toplamı

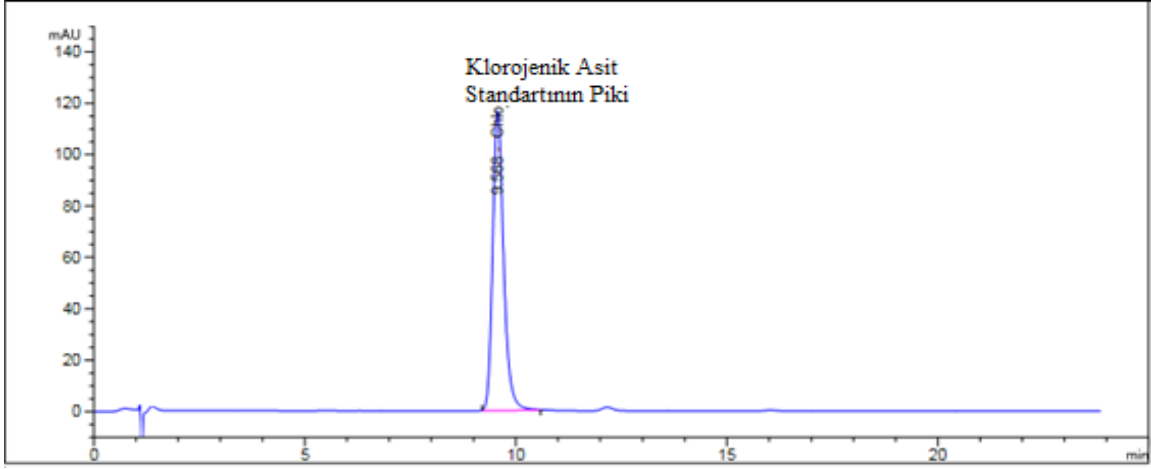
*df: Serbestlik derecesi

Çalışmamızda dişbudak ağacı yapraklarından klorojenik asit ekstraksiyonu için varyasyon katsayısı değeri (% C.V) 5,70 bulunmuştur.

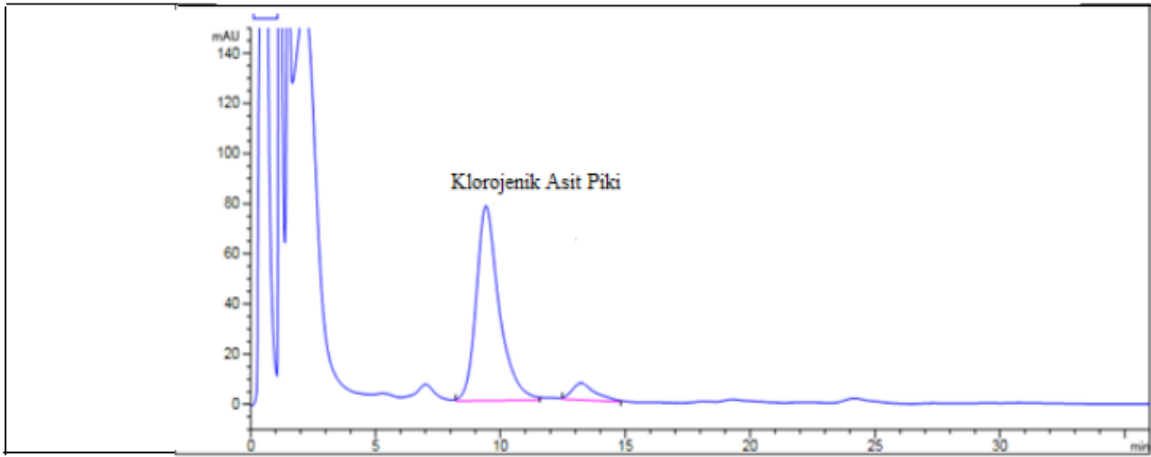
Şekillerde ultrasonik destekli ekstraksiyon ile elde edilen ekstraktların ekstraksiyon verimi ile ilgili eşitliklerden hesaplanan data ve deneysel data arasındaki ilişkiyi gösteriyor. İşletme koşullarında deneysel data ile modelden hesaplanan datanın uyum içinde olduğu görülmektedir.

Yapılan deneysel çalışmalar sonucunda elde edilen verilerin optimizasyonu sonucu Yüzey Yanıt Yöntemi ile elde edilen sonuçlar bu uyumluluğu göstermektedir.

Şekillerde ultrasonik destekli ekstraksiyon ile elde edilen ekstraktların ekstraksiyon verimi ile ilgili eşitliklerden hesaplanan data ve deneysel data arasındaki ilişkiyi gösteriyor. İşletme koşullarında deneysel data ile modelden hesaplanan datanın uyum içinde olduğu görülmektedir.



Şekil 9. Klorojenik asit standardının kromatogramı



Şekil 10. Dişbudak ağacı yaprağı ekstraktının kromatogramı

G. TOPLAM FENOLİK İÇERİKLERİ

Çalışmanın ikinci aşamasında ise dişbudak ağacı yapraklarının antioksidan kapasitelerini belirlemek için toplam fenolik içerikleri UV Spektrometre ile analiz edildi. Dişbudak yaprağı için optimum koşullar; ultrason gücü %47,76, süre 29,69 dakika, etanol konsantrasyonu %54,40 olarak belirlendi. Optimum koşullarda dişbudak yaprağında toplam fenolik içeriği 40,74 ppm olarak belirlendi.

IV. DEĞERLENDİRME

Bu çalışmanın ilk aşamasında dişbudak ağacı yaprağından klorojenik asitin HPLC (Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi) ile belirlenmesi için metod optimizasyonu yapıldı. Klorojenik asitin potansiyel kaynakları dişbudak ağacı yaprakları bu çalışmada araştırma materyali olarak kullanıldı. Kurutulmuş yapraklar ultrasonik destekli ekstraksiyon yöntemi ile ekstrakte edildi.

Ultrasonik destekli ekstraksiyon yöntemi çevre dostudur, geleneksel ekstraksiyon metotlarına göre daha az çözücü kullanılması ve kısa sürede yapıldığı için avantajlıdır [12-13]. Dişbudak ağacı yaprakları (*Fraxinus Excelsior*) için optimum koşullar; ultrason gücü %39,12, ekstraksiyon süresi 15,18 dakika, ekstraksiyon sıcaklığı 69,98°C olarak belirlendi. Bu koşullarda maksimum klorojenik asit miktarı 11,70 ppm olarak belirlendi. Optimal koşullar bulunduktan sonra gerçek numune ekstraksiyon deneyleri 3 kez tekrarlandı ve sonra relatif standart sapmalı ortalama hesaplandı. Dişbudak ağacı yaprağında klorojenik asit ekstraksiyon verimi $10,2553 \pm 0,015$ ppm bulunmuştur. Çalışmanın iki aşamasında da kullanılan ultrasonik destekli ekstraksiyonun diğer ekstraksiyon tekniklerine alternatif yöntem olabileceği görülmüştür.

Ekstraksiyon tekniklerinden katı-sıvı (Soxhlet) ekstraksiyonu, daha uzun süre gerektirmesi ve büyük miktarda organik çözücü kullanılmasından dolayı ultrasonik destekli ekstraksiyona göre dezavantajlıdır. Ayrıca Soxhlet ekstraksiyonun çözücü seçiciliği ve otomasyonu zor olması gibi dezavantajları da bu yöntem alternatif bir yöntem ihtiyacı duyulduğunu göstermektedir. Basınçlı sıvı ekstraksiyonunda ise örneğe ekstraksiyon işlemi yapılmadan önce dondurma ve kurutma gibi ön işlemler gerektirebilir. Ayrıca çok fazla organik çözücü kullanılması ve temizliğinin maliyetli olması da bu ekstraksiyon tekniğinin dezavantajlarından. Mikrodalga destekli ekstraksiyon yönteminde ise fazla miktarda organik çözücü kullanılması bu yöntemi dezavantajlı bir yöntem yapmaktadır. Süper kritik akışkanlarla ayırma işlemlerinin yüksek basınçta gerçekleşmesinden dolayı yüksek yatırım maliyeti ve yüksek enerji gereksinimi gibi birkaç dezavantajı vardır. Son derece önemli olduğu halde ihmal edilen diğer bir dezavantajı ise, en çok kullanılan karbondioksittir.

Buna göre elde edilen sonuçlar klorojenik asit etken bileşeninin ekstraksiyonu için Ultrasonik Destekli Ekstraksiyonun (UAE) etkili bir metot olabileceğini göstermiştir.

TEŞEKKÜR: Bu çalışma Uşak Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi tarafından desteklenmiştir.

V. KAYNAKLAR

- [1] Y. Chen, Q. J. Yu, X. Li, Y. Luo, H. Liu "Extraction and HPLC Characterisation of Chlorogenic Acid from Tobacco Residuals," *Separation Science and Technology*, c. 42, s. 15, ss. 3481-3492, 2007.
- [2] W. Shen, R. Qi, J. Zhang, Z. Wang, H. Wang, C. Hu, Y. Zhao, M. Bie, Y. Wang, Y. Fu, M. Chen, D. Lu, "Chlorogenic Acid Inhibits LPS-Induced Microglial Activation and Improves Survival of Dopamine Neurons," *Brain Research Bulletin*, c. 88, s. 5, ss. 487-494, 2012.
- [3] H. Jang, H. R. Ahn, H. Jo, K. A. Kim, E. H. Lee, K. W. Lee, S. H. Jung, C. Y. Lee, "Chlorogenic Acid and Coffee Prevent Hypoxia-Induced Retinal Degeneration," *J. Agric. Food Chem.*, c. 62, s. 1, ss. 182-91, 2014.
- [4] M. Banožić, I. Banjari, M. Jakovljević, D. Šubarić, S. Tomas, J. Babić ve S. Jokić, Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Some Bioactive Compounds from Tobacco Waste, *Molecules*, c. 24, s. 8, ss. 1611, 2019.
- [5] A. Ayelign ve K. Sabally, "Determination of Chlorogenic Acids (CGA) in Coffee Beans Using HPLC," *American Journal of Research Communication*, c. 1, s. 2, ss. 78-91, 2013.
- [6] E. Zeiger, R. Tice, "Chlorogenic Acid and Caffeic Acid Review of Toxicological Literature Prepared for Integrated Laboratory Systems, *Research Triangle Park*, ss. 327-331, 1998.
- [7] A. Mustafa, C. Turner, "Pressurized Liquid Extraction as a Green Approach in Food and Herbal Plant Extraction: A Review," *Analytica Chimica Acta*, c. 703, s. 1, ss. 8, 2011.

- [8] K. B. Wilson, "On the Experimental Attainment of Optimum Conditions," *Journal of the Royal Statistical Society*, c. 13, s. 1, ss. 1-45, 1951.
- [9] T. Cui, K. Nakamura, L. Ma, J. Z. Li, H. Kayahara, "Analyses of Arbutin and Chlorogenic Acid, the Major Phenolic Constituents in Oriental Pear," *J. Agric. Food Chem.*, c. 53, s. 1, ss. 3882–3887, 2005.
- [10] Y. Chen, "Extraction of Chlorogenic Acid from Tobacco Residuals," *Separation Science and Technology*, c. 42, s. 5, ss. 3481-3492, 2007.
- [11] H. M. Santos, J. L Capelo, "Trends in Ultrasonic-Based Equipment for Analytical Sample Treatment," *Talanta*, c. 73, s. 5, ss. 795-802, 2007.
- [12] J. L Capelo, A. M Mota "Ultrasonication for Analytical Chemistry," *Current Analytical Chemistry*, c. 1, s. 2, ss. 193, 2005.
- [13] D. L Luthria, R. Biswas, S.Natarajan, "Comparison of Extraction Solvents and Techniques Used Forth Eassay of Isoflavones from Soybean," *Food Chemistry*, c. 105, s. 1, ss. 325, 2007.