

Yıllık Pelinotunun (*Artemisia annua* L.) Kimyasal Kompozisyonu ve Antioksidan Kapasitesinin Belirlenmesinde Sub ve Süperkritik Akışkanların Etkisi

Murat TÜRK^{*1}, E. Sultan GİRAY²

¹Çukurova Üniversitesi, Ceyhan Meslek Yüksekokulu, Ceyhan, Adana
²Çukurova Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Adana

Geliş tarihi: 18.09.2020

Kabul tarihi: 23.10.2020

Öz

Bu çalışmada, tıbbi aromatik bitkilerden yıllık pelinotunun (*Artemisia annua* L.) kimyasal kompozisyonu ve antioksidan aktivitesi üzerine sub ve süperkritik akışkan ekstraksiyon metodlarının etkileri incelenmiştir. Uygulanan sub/süperkritik akışkan ekstraksiyonları, subkritik su, subkritik etanol ve süperkritik CO₂ kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemlerin etkinliği su buharı destilasyonu, geri soğutucu altında kaynatma ve ultrasonik banyoda organik çözücü ile ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak kıyaslanmıştır. Ekstraktların antioksidan aktivitelerini belirlemek için serbest radikal temizleme yöntemi (DPPH), toplam antioksidan kapasite (CUPRAC) ve toplam fenol içeriği (FOLIN) yöntemleri uygulanmıştır. Sonuçlar ekstraktlardaki bileşen ve konsantrasyonların ekstraksiyon metoduna göre değişiklik gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu farklılıktan yararlanarak ekstraktın kullanım amacına uygun ekstraksiyon metodu seçilebilir. Ekonomik olarak önemli olan oksijenli bileşenler en fazla sub-kritik su ekstraksiyonu ile elde edilmiştir. Antioksidan aktivite belirleme çalışmalarında en etkin yöntemin sub-kritik etil alkol ekstraksiyonu olduğu belirlenmiştir. Elde edilen sonuçların farmakoloji, gıda ve nutrasötik sektörlerine önemli katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Sub ve Süper kritik akışkanlar, *Artemisia annua* L., Antioksidan aktivite

The Effect of Sub and Supercritical Fluids in Determination Chemical Composition and Antioxidant Capacity of *Artemisia annua* L.

Abstract

In this study, the effects of sub and supercritical fluid extraction methods on the chemical composition and antioxidant activity of annual wormwood (*Artemisia annua* L.) which is important medicinal aromatic plants were investigated. The applied sub/supercritical fluid extractions were subcritical water, subcritical ethanol and supercritical CO₂. The efficiency of these methods has been compared by using steam distillation, refluxing and organic solvent extraction in an ultrasonic bath. Free radical scavenging method (DPPH), total antioxidant capacity (CUPRAC) and total phenol content (FOLIN) methods were conducted to determine the antioxidant activities of the extracts. The results revealed that the components and concentrations in the extracts varied according to the extraction method. Taking advantage of this difference, the extraction method suitable for the purpose of use of the extract can be selected.

*Sorumlu yazar (Corresponding author): Murat TÜRK, murturk@cu.edu.tr

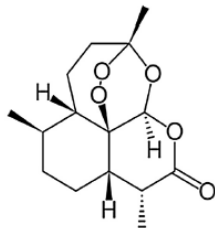
Economically important oxygenated components were mostly obtained by subcritical water extraction. It was determined that the most effective method in antioxidant activity determination studies was subcritical ethyl alcohol extraction. It is thought that the results obtained will make an important contribution to the pharmacology, food and nutraceuticals industries.

Keywords: Sub and Supercritical Fluids, *Artemisia annua L.*, Antioxidant activity

1. GİRİŞ

Tıbbi bitkiler; modern ilaçlar, geleneksel ilaçlar, gıda katkıları, nutrosotikler, sentetik ilaçların kimyasal birimleri ve farmakolojik ara ürünler için en zengin biyolojik kaynaklardır. Aromatik bitkiler ise tat, koku, kozmetikler ve kimyasal terpenlerin kaynağıdır. Tıbbi ve aromatik bitkiler, gelişmiş ülkelerde olduğu gibi gelişmekte olan ülkelerde de basit yöntemlerden en ileri tekniklere kadar çeşitli yöntemlerle ekstrakte edilerek değerli bir biyo kaynağa dönüştürülebilmektedir [1].

Artemisia cinsinin üyeleri, en büyük ve yaygın olarak *Compositae* ailesine ait dağılmış türlerden biridir [2]. Yıllık pelinotu (*Artemisia annua L.*) ateş ve sıtma tedavisi için geleneksel Çin tıbbında kullanılan yıllık tıbbi bir bitkidir. Ayrıca yıllık pelinotu ekstraktları antimikrobiyal, antioksidan ve antiinflamatuvar aktivitelerle ilişkili çeşitli biyomedikal ve farmakolojik uygulamalar sergilemektedir. Yıllık pelinotunun kimyasal bileşimi uçucu ve uçucu olmayan bileşenlerden oluşur. Uçucu olmayan ana bileşenler arasında seskiterpenoidler, flavonoidler ve kumarinler bulunur. Bu seskiterpenoidler arasında, yıllık pelinotunun yapraklarında ve çiçeklerinde bulunan artemisininidir (Şekil 1). Artemisininin yıllık pelinotunun temel biyoaktif bileşimini temsil eder ve bu türün sıtma tedavisi aktivitesinden sorumludur [3].



Şekil 1. Artemisininin kimyasal yapısı

Tıbbi ve aromatik bitkilerin endüstriyel olarak değerlendirilmesi; çeşitli teknikler kullanarak aktif bileşenlerinin ekstrakte edilmesiyle başlar. Bu amaçla kullanılan yaygın yöntemler; maserasyon (ıslatma), demleme, sızdırma, parçalama, Soxhlet ekstraksiyonu, organik çözücülerle ekstraksiyon, mikrodalga yardımıyla ekstraksiyon, süperkritik akışkan ekstraksiyonu, ultrasonik ekstraksiyon ve hidroflorokarbon çözücülerle ekstraksiyondur. Aromatik bitkiler için hidro destilasyon (su, buhar ve su-buhar destilasyonları) ve sulu maserasyon en yaygın olarak uygulanan yöntemlerdir [1]. Çok daha yeni teknikler ise, katı-faz mikro ekstraksiyon, protoplast ekstraksiyon, mikrodestilasyon, termomikro destilasyon ve moleküler destilasyondur.

Tüm dünyada, bitkisel tıbbi ilaçlara, nutrosotiklere ve sağlık için doğal ürünlere gösterilen ilginin artmasıyla, tıbbi bitki ekstraktı üreticileri ve uçucu yağ üreticileri, ekstrakt ve uçucu yağ üretimi için belirli bir kaliteye sahip ve çalışma yapan her bir grubun birbirinden farklı sonuçlar vermeyeceği çok daha makul ekstraksiyon yöntemleri kullanmaya başlamışlardır [1]. Bu yaklaşımlar, hem artan kaliteli ürün isteğini karşılayabilmek hem de özellikle gelişmiş ülkelerde pazar sahibi olmak isteyen tıbbi aromatik bitkilerce zengin, gelişmekte olan ülkelerde kabul görmeye başlamıştır.

Uçucu yağlar, düşük konsantrasyonlarda bulunan kompleks karışımlardır. Bunların analiz edilmeden önce buldukları matriksten uzaklaştırılması gerekir. Bu amaçla hidrodestilasyon, buhar destilasyonu Soxhlet ekstraksiyonu yaygın olarak kullanılır. Ancak uçucu yağları oluşturan moleküller ısı olarak hassas ve sıcaklıkla kimyasal değişikliklere uğrayabilen bileşiklerdir. Bazı uçucu bileşenlerin kaybı, ısı ve hidrolitik etkilerle doymamış ve ester bileşiklerinin parçalanması ve ekstrakta zehirli çözücü kalıntısı, bu yöntemler kullanıldığında sık karşılaşılan dezavantajlardır.

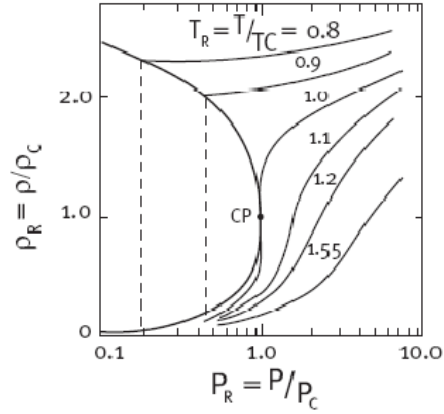
Bu dezavantajlar, uçucu yağ ekstraksiyonunda yeni, daha az enerji daha az çözücü kullanılan, süperkritik akışkan ekstraksiyonu, ultrasonik ekstraksiyon ve mikrodalga ekstraksiyonu gibi “yeşil” tekniklerin gelişmesine neden olmuştur[1].

Süper kritik akışkan ekstraksiyonu, 20.yy’ın ikinci yarısında alternatif bir yöntem olmuştur. Bu alanda en yaygın kullanılan çözücü CO₂’dir. Bunun en önemli sebepleri ise, çalışma sıcaklığının ve ekstraksiyon sürelerinin düşük olması ve dolayısıyla ısı olarak bozulabilecek doğal bileşenlerin zarar görmesinin engellenmiş olmasıdır. Özellikle 1980’lerden itibaren yapılan yoğun araştırmalar ile günümüzde süper kritik akışkanlarla ekstraksiyona ait tüm teknik ve ekonomik sorunlar yanıtlanmıştır. Süper kritik akışkan, aynı zamanda “yoğun gaz” olarak da tanımlanabilir. Sıcaklığı kritik sıcaklığın üzerinde ve basıncı da kritik basıncın üzerinde olan akışkanlardır. Bir akışkanın süper kritik akışkan olarak adlandırılması için indirgenmiş sıcaklığın $T_r = T/T_c$ 1,2-1,3 arasında olması ($T_r = T/T_c$) gerekir. İndirgenmiş basınç P_r ise kullanılan sistemin teknik olarak elverdiği ölçüde olması yeterlidir ($P_r = P/P_c$). Uygun koşullar sağlandığında herhangi bir sıvı süper kritik koşullarına ulaşabilir. Ancak sadece kritik sıcaklığı oda sıcaklığının çok üzerinde olmayan sıvılar, tıbbi aromatik bitkilerin ekstraksiyonunda alternatif bir çözücü olabilirler[4]. Karbon dioksit, düşük kritik sıcaklığı ve basıncı nedeniyle en çok uygulanan çözücü olmuştur ($T_c=31,06$ °C ve $P_c=73,81$ bar), süper kritik karbondioksit aynı zamanda toksik ve alev alıcı olmayışı, ucuz ve kolay temin edilebilir olması nedeniyle de alternatif bir çözücüdür. Ayrıca, süper kritik akışkanın yoğunluğu da önemli bir parametredir. Süper kritik akışkanların ekstraksiyon çözücüsü olabilmesi yoğunluğu ile doğrudan ilişkilidir. Chrastil, yoğunluk ve çözünürlük arasındaki ilişkiyi formül 1 de verildiği gibi ifade etmiştir [4].

$$s = \rho^a \exp (b/T + c) \quad (1)$$

s çözünürlük; ρ çözücünün yoğunluğu; T mutlak çalışma sıcaklığı; a , b ve c düzeltme sabitleridir. Bir akışkan kritik şartlara yaklaştıkça yoğunluğu bir sıvının yoğunluğuna yaklaşır. Şekil 2’de CO₂

için yoğunluk izotermi indirgenmiş basınca karşı grafiğe geçirilmiştir. Buradan $T = 35$ °C ve $P = 200$ bar da $\rho = 866$ kg/m³ olduğu görülebilir. Çözücü yoğunluğu başarılı bir süper kritik akışkan ekstraksiyonunda anahtar faktördür.



Şekil 2. CO₂ için yoğunluk/basınç diyagramı

Sub- kritik su ise son birkaç yıl içinde çözücü olarak araştırmacılar tarafından kullanılmaya başlanmıştır.

Sub-kritik su ekstraksiyonu, 100-374 °C aralığında ve sıvı fazın oluşmasını sağlayacak bir basınçta suyun ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanıldığı bir yöntemdir. Bu koşullardaki su; pek çok organik molekül için iyi bir çözücü özelliğine sahip olması nedeniyle, bitki ekstraksiyonu için klasik ve süperkritik CO₂ ekstraksiyonu yöntemlerine karşı alternatif bir yöntem olarak gelecek vaat etmekte ve son yıllarda araştırmacılar tarafından artan bir ilgiyle kullanılmaktadır [5-6]. Sub-kritik su ekstraksiyonu, 100-374 °C aralığında ve sıvı fazın oluşmasını sağlayacak bir basınçta suyun ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanıldığı bir yöntemdir. Bu koşullardaki su; pek çok organik molekül için iyi bir çözücü özelliğine sahip olması nedeniyle, bitki ekstraksiyonu için klasik ve süperkritik CO₂ ekstraksiyonu yöntemlerine karşı alternatif bir yöntem olarak gelecek vaat etmektedir [7-8].

Bunların yanı sıra etanol insanlar için nispeten toksik bir çözücü olmaması, suya göre düşük kritik

sıcaklığa sahip olması, polaritesinin CO₂'de göre yüksek olması ve daha az korozif özellik göstermesi nedeniyle bitki ekstraksiyonunda alternatif olmaya adaydır [9].

Uçucu yağlar, gıda, farmakoloji ve parfüm endüstrisinde, koku ve tatları için kullanılan önemli doğal ürünlerdir. Özellikle enantiomerler ve yararlı kiral yapıtaşların sentezinde, aromatik kimyasalların da kaynağıdır. Son yıllarda uçucu yağların biyolojik ve farmakolojik aktiviteleri ve bileşenleri, artan bir şekilde bir ivme kazanmıştır. Uçucu yağların çoğu, hidrokarbonlar, esterler, terpenler, laktonlar, fenoller, aldehitler, asitler, alkol ve ketonlardan oluşur. Bunların arasında oksijenli bileşenler (alkol, ester, aldehit, keton, lakton, fenol) ana koku kaynağıdır. Bu bileşenler oksitleyici ve reçineleşme etkilerine karşı diğer bileşenlere göre daha kararlıdır. Diğer taraftan, monoterpenler ve seskiterpenler gibi doymamış bileşenler hava ve ışık varlığında oksitlenme ve reçineleşme eğilimindedirler.

İnsan sağlığı açısından büyük risk oluşturan başta kanser olmak üzere kalp ve damar hastalıkları gibi pek çok hastalığın ortaya çıkma riskini azaltan veya olumlu etkiler gösteren antioksidanlar, günümüzde oldukça ilgi çeken ve üzerinde pek çok araştırmalar yapılan bir konudur. Vücutta çeşitli metabolik reaksiyonlar sonucu oluşan ve bir veya daha fazla eşleşmemiş elektronu olması sebebiyle oldukça reaktif olan serbest radikallerin aşırı miktarları (reaktif oksijen türleri üretiminin, tüketiminden fazla olması 'oksidatif stres' olarak adlandırılır) birçok doku, organ ve sistemlerde hasarlara neden olur. Ayrıca, bitki ekstraktlarının gıda maddelerinin korunmasında da kullanılabilirliği bilinmektedir. Gıda maddelerinin işlenmesi, depolanması ve diğer işlemler sırasında lipidlerin oksidasyonu gıda ürünlerinde bozunmalara neden olan işlemlerin başında gelir. Dolayısıyla bunların dayanıklılığını artırmak için sentetik antioksidanlar kullanılmaktadır. Doğal antioksidanlar, sentetik olan bütillenmiş hidroksi toluen (BHT) ve bütillenmiş hidroksi anisol (BHA) bileşiklerinin kanserojenik oldukları şüpheleri nedeniyle doğal antioksidanlar tercih edilir hale gelmişlerdir [1].

Yapılan bir çalışmada, yıllık pelinotunda %1,4-4,0 arasında farklı yapılarda uçucu yağ bulunduğu, uçucu yağında temel bileşenler olarak kamfor, artemisia keton, germakren d ve 1,8-sineol'ün bulunduğu belirtilmektedir [10].

Juteau ve arkadaşları 2002 yılında yaptığı bir çalışmada, *Artemisia annua* nın uçucu kısımlarının kamfor (%44), germakren D (%16), *trans*-pinokarveol (%11), β -selinen (%9), α -karyofilen (%9) ve artemisia keton (%3)'dan oluşan uçucu yağın antimikrobiyal aktifliğini incelemişlerdir. Uçucu yağın, test edilen gram-pozitif bakteri *Enterococcus hirae*'nin ve tüm test mantarının gelişimini belirgin bir şekilde engellediğini tespit etmişlerdir. Bu uçucu yağ referans bileşiği %18'lik α -tocopherole eşdeğer bir antioksidan aktifliği gösterdiğini belirlemişlerdir [11].

Tzenkova ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, Bulgaristan'da yabani olarak yetişen *Artemisia annua*'nın uçucu yağı hidrodestilasyon ile elde etmişler ve GC/MS ile analiz etmişlerdir. Ana bileşenleri α -karyofillene (%24,73), α -kuveben (%13,53), α -kopaen (%7,42), β -selinene (%8,21), artemisia keton (%8,45) ve kamfor (%3,61) olarak belirlemişlerdir. Uçucu yağ bileşenlerinin diğer coğrafi bölgelerde yetişenlerden farklı olduğunu gözlemişlerdir [12].

2017 yılında yapılan bir başka çalışmada, yıllık pelinotu, süper kritik karbon dioksit ile ekstrakte edildikten sonra, kalan atık kısımdan fenolik bileşenler, su veya etanol gibi çözücülerle ikinci bir ekstraksiyon ile elde edildiği bildirilmiştir. Birinci basamakta yüksek verimle artemisin elde edildiğini ve sıtma tedavisinde etki gösterdiğini belirtmişlerdir. Atık kısmın ikinci ekstraksiyonunda artemisin bulunmamasına rağmen yüksek fenol içeriğe sahip olduğunu saptamışlar ve yüksek antioksidan kapasite gösterdiğini rapor etmişlerdir [3].

Bu çalışmada, tıbbi özelliklere sahip olan yıllık pelinotu (*Artemisia annua* L.) bitkisinin kimyasal kompozisyonu ve antioksidan aktivitesi üzerine sub ve süperkritik akışkan ekstraksiyon metodlarının etkileri incelenmiştir. Uygulanan

sub/süperkritik akışkan ekstraksiyonları, subkritik su, subkritik etanol ve süperkritik CO₂ kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemler su buharı destilasyonu, geri soğutucu altında kaynatma ve ultrasonik banyoda organik çözücü ile ekstraksiyon yöntemleri ile karşılaştırılmıştır. Ekstraktlara uygulanan antioksidan aktivite belirleme metodları olarak, serbest radikal temizleme yöntemi (DPPH), toplam antioksidan kapasitesi (CUPRAC) ve toplam fenol içeriği (FOLIN) yöntemleri kullanılmıştır. Belirlenen antioksidan kapasiteye göre en etkin bitki ekstraktı ve bir bitki için en yüksek antioksidan aktivite gösteren ekstraksiyon metodu değerlendirilmiştir. Ekstraksiyon verimi, biyolojik aktivite, bir bileşenin en fazla miktarda olması istenen bir kompozisyon gibi amaca uygun bir ekstraksiyon metodunun seçilebileceği bir çalışma amaçlanmıştır.

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Materyal

2.1.1. Bitki Kaynağı

Denemelerde kullanılan yıllık pelin otu (*Artemisia annua* L.), Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri araştırma alanında yetiştirilmiştir. Yıllık pelinotunun bitkinin toprak üstü kısımları saf su ile yıkandıktan sonra oda koşullarında karanlıkta 2 hafta boyunca kurutulmuştur. Kurutulmuş örnekler, 5 mm'lik iç çapa sahip huni boynundan geçecek şekilde elle öğütülmüştür. Kurutulmuş ve öğütülmüş bitki örnekleri, analizden önce plastik şişelerde buzdolabında 4 °C de saklanmıştır.

2.1.2. Kimyasallar

Hekzan, diklorometan, etanol, metanol, DPPH, tert-butil metileter, sodyum hidroksit, aseton, neokuprin, sodyum klorür, Amonyum asetat, Bakır(II) klorür, BF₃-metanol (%10-15 w/v), Folin-Ciocalteu reaktifi, troloks ve gallik asit (Merck-Sigma-Aldrich analitik saflıkta), CO_{2(g)} (Linde % 99,9999), C18 kartuş (Agilent marka).

2.2. Metot

2.2.1. Süper Kritik CO₂ Yöntemiyle (skCO₂E) Bitki Ekstraktlarının Hazırlanması

Ekstraksiyonlar Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Organik Kimya Araştırma Laboratuvarında oluşturulan sistemin kullanılmasıyla gerçekleştirilmiştir (Şekil 3). Çalışmada kullanılan parametreler ve aralıkları ön denemeler yapılarak Çizelge 1'de verilmiştir. Ekstraksiyon hücresi 2,0 g örnekle doldurulduktan sonra istenilen ekstraksiyon sıcaklığında çalışmak için fırın içine yerleştirilmiştir. Bir ISCO pompası yardımıyla istenilen basınçta süper kritik CO₂ hücreye gönderilerek, 30 dk statik ve 20 dk dinamik ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. Ekstrakte edilen bileşenleri toplamak için, yaklaşık 2 mL dk⁻¹ akış hızında bir restriktör (Suprex marka) ile içinde diklorometan bulunan bir tüpte toplanmıştır.



Şekil 3. Süper kritik akışkan ekstraksiyon sistemi, A: ISCO pompa; B: Fırın C: Ekstraksiyon hücresi; D: HPLC pompası

2.2.2. Sub-Kritik Su (sbkH₂O/E) Yöntemiyle Bitki Ekstraktlarının Hazırlanması

Ekstraksiyon hücresi 2,0 gram örnekle doldurulduktan sonra istenilen ekstraksiyon sıcaklığında çalışmak için fırın içine yerleştirilmiştir. Bir HPLC pompası yardımıyla istenilen basınçta gazı giderilmiş deiyonize su, 2 mL/dk akış hızında hücreye gönderilmiştir. 30 dk süreyle statik ekstraksiyon ve ardından 20 dk dinamik ekstraksiyonla örnek toplanmıştır. (Şekil 3). Kullanılan parametreler ve aralıkları ön denemeler yapılarak Çalışma koşulları, Çizelge 1. de verilmiştir. Uçucu yağlar bir kez 5 mL

diklorometan ile sıvı-sıvı ekstraksiyon yapılarak alınmıştır.

2.2.3. Sub-Kritik Su (sbkH₂O) Yöntemiyle Bitki Ekstraktlarının Hazırlanması

Ekstraksiyon hücresi 2,0 gram örnekle doldurulduktan sonra fırın içine yerleştirilmiştir. Çizelge 1'de verilen çalışma koşullarında, bir HPLC pompası yardımıyla, istenilen basınçta gazı giderilmiş etanol 2 mL/dk akış hızında hücreye gönderilmiştir. 30 dk süreyle statik ekstraksiyon ve ardından 20 dk dinamik ekstraksiyonla örnek toplanmıştır (Şekil 3).

Çizelge 1. Yıllık pelinotunun sub ve süperkritik akışkanlarla ekstraksiyon için çalışma koşulları

Çözücü	T (°C)	P (atm)	Akış Hızı (ml/dk)	Zaman (dk)
skCO ₂	40	300	2	20 (statik), 30 (dinamik)
H ₂ O	125	80	2	30 (statik), 20 (dinamik)
EtOH	125	80	2	30 (statik), 20 (dinamik)

2.2.4. Su Buharı Destilasyonu ile Bitki Ekstraksiyonu (SBD)

Pelinotunun üst kısımlarından alınan 50 g kurutulmuş örnek Neo-clevenger aparatında su buharı destilasyonu yöntemi ile 3 saat süreyle ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon sonunda sulu fazdan uçucu yağların kuru olarak alınması katı faz ekstraksiyon sistemiyle yapılmıştır.

2.2.5. Ultrasonik Banyoda Organik Çözücülerle Bitki Ekstraksiyonu (USE)

2,0 gram pelinotu örneği 30 mL ter-butyl metil eter ile oda sıcaklığında ultrasonik banyoda 2 saat süreyle ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon sonunda ekstrakt ve artık 10000 rpm de 30 dk santrifüj edildikten sonra ekstrakt Whatman 4 nolu süzgeç kağıdı ile süzülerek alınmıştır.

2.2.6. Organik Çözücülerle Geri Soğutucu Altında Kaynatma ile Bitki Ekstraksiyonu (GSK)

2 gram bitki örneği 30 mL (1:1 v/v) diklorometan:aseton çözücü karışımı ile karışımın

kaynama sıcaklığında 3 saat süreyle geri soğutucu altında kaynatılarak ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon sonunda ekstrakt ve artık 10000 rpm de 30 dk santrifüj edildikten sonra ekstrakt Whatman 4 nolu süzgeç kağıdı ile süzülerek alınmıştır.

2.2.7. Katı Faz Ekstraksiyonu

Bu çalışmada C18 kartuş kullanılmıştır. Kolon yıkama ve şartlama işlemi metanol-su (1:1) karışımı kullanılmıştır. Örnek toplama işlemi çözücü olarak hekzan kullanılmıştır [13].

2.2.8. Kromatografik Ayırma ve Tanımlama

Tüm deneylerden elde edilen ekstraktların GC-MS analizleri Termo-Finnigan Trace marka kütle spektrometresinde elektron impakt (70 eV) ile yapılmıştır. Kromatografik ayırma TR-MS-5 (60m x 0,25 mm x 0,25 µm, %5 fenil polisiloksan), kolonda gerçekleştirilmiştir. Sıcaklık programı 50 °C de 1 dakika bekletilir. 3 °C/dk ısıtma hızıyla 160 °C ye çıkarılır, burada 3 dakika bekletildikten sonra 5 °C/dk ısıtma hızıyla 250 °C'ye çıkarılır ve burada 10 dakika bekletilir. Enjeksiyon sıcaklığı 240 °C ve split10 modunda çalışılmıştır. Analizlerde helyum taşıyıcı gaz olarak kullanıldı ve akış hızı 1,0 mL dk⁻¹ olarak belirlendi. GC-MS analizlerinde enjeksiyon işlemi bir otosampler yardımıyla yapılmıştır. Her bir bileşen, kütle spektrumlarının Wiley07 ve NIST(2005) kütüphanesinden yararlanılarak karşılaştırma ve C₉-C₂₀ n- alkanlar kullanılarak Kovat İndislerinde hesaplanmasıyla tanımlanmıştır.

2.2.9. Kovat İndislerinin Hesaplanması

İsotermal olmayan Kovats İndisi (sıcaklık programı için Van den Dool ve Kratz'ın eşitliği kullanılarak) hesaplanmıştır [14] (Eşitlik 1).

$$I_x = 100n + 100(t_x - t_n) / (t_{n+1} - t_n) \quad (1)$$

Eşitlikte, I_x; "X" kimyasal bileşeni için Kovat indisi, t_n ve t_{n+1}, kimyasal bileşik "X" ten hemen önce ve sonra ayrılan referans n-alkan hidrokarbonlarının alıkonma sürelerini

göstermektedir. Formülde tx ise “X” bileşiğinin alıkonma süresidir.

2.2.10. DPPH Yöntemi

DPPH yöntemi, antioksidanların kararlı bir organik azot radikali olan DPPH (1,1- difenil-2pikrilhidrazil) radikalini giderici etkilerini ölçmeye dayalı bir yöntemdir. Bu radikal hidrojen donörlerle etkileştiğinde hidrazine indirgenir. Kırmızı renkli DPPH radikali 515 nm’de maksimum absorpsiyon verir. DPPH çözeltisine antioksidanın ilave edilmesiyle absorbansta düşüş meydana gelir ve antioksidanların varlığıyla radikalın rengi kırmızıdan sarıya döner. Bu yöntem antioksidanların radikal giderici kabiliyetlerini değerlendiren kolay ve geçerli bir yöntem olarak bilinmektedir [15].

Miliauskas ve arkadaşları tarafından bildirilen DPPH metodunda laboratuvarımızda çok az değişiklik yapılarak kullanılmıştır. Değişik konsantrasyonlarda (2,5 mg ekstrakt/ml metil alkol; 1:5; 1:10 oranında seyreltilmiş) 100 mikrolitre ekstrakta, 3,9 ml metanolde çözülmüş 0,06 mM DPPH çözeltisi eklendi. Örnekler çalkalandıktan sonra oda koşullarında karanlıkta 20 dakika bekletildi ve 517 nm’de absorban ölçülmüştür. % DPPH radikal temizleme aktivitesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır (Eşitlik 2).

$$\% \text{ İnhibisyon} = \left[\frac{\text{Kontrol Absorbans} - \text{Örnek Absorbans}}{\text{Kontrol Absorbans}} \right] \times 100 \quad (2)$$

%50 radikal temizleme aktivitesine karşılık gelen derişim (%50 inhibisyon) I_{50} olarak ifade edilmiştir [16].

2.2.11. CUPRAC(Cupric Reducing Antioxidant Capacity; Cu(II) İyonu İndirgen Antioksidan Kapasitesi) Yöntemi ile Toplam Antioksidan Aktivite Ölçülmesi

Çözeltilerin Hazırlanması: 10^{-2} M Bakır(II)klorür çözeltisi, 0,4262 g $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 250 ml suda çözülerek hazırlanmıştır. pH 7,0 Amonyum asetat tampon çözeltisi, 19,27 g NH_4Ac 250 ml suda çözülerek hazırlanmıştır. $7,5 \times 10^{-3}$ M Neokuprin

çözeltisi, 0,039 g Neokuprin 25 ml %96’lık etil alkolde çözülerek hazırlanmıştır.

CUPRAC Yöntemi: Test tüpüne Bakır(II) Klorür çözeltisi, Neokuprin çözeltisi ve NH_4AC tampon çözeltisinden 1’er ml eklendi. Antioksidan örnek çözeltisinden (2,5 mg/ml) (veya standart çözeltiden) 0,1ml eklendikten sonra 1ml H_2O eklenerek toplam hacim 4,1 ml’ye tamamlandı. 1 saat sonra 450 nm’de köre karşı absorban ölçümleri kaydedilmiştir. Standart (trolloks) kalibrasyon eğrisi konsantrasyona karşı absorban olarak çizilmiştir ve sonuçlar eşdeğer trolloks olarak ifade edilmiştir [17].

2.2.12. Folin Ciocalteu Yöntemi ile Toplam Fenol İçerik Tayini (FOLIN)

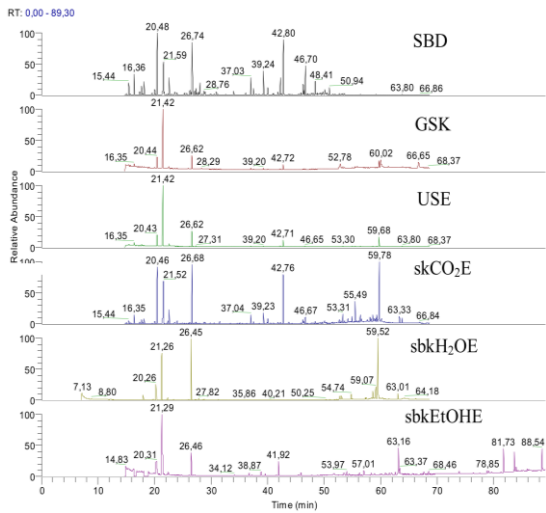
1 ml 1:10 seyreltilmiş Folin-Ciocalteu reaktifi üzerine 100 mikrolitre (2,5 mg/ml) ekstrakt eklendi. 4 dakika sonra 800 mikrolitre sodyum karbonat çözeltisi (75 g/L) eklendi. 2 saat oda koşullarında bekletildikten sonra 765 nm’de absorbanları ölçülmüştür. Standart kalibrasyon eğrisi gallik asit (0-500 mg/L) kullanılarak çizilmiştir. Sonuçlar eşdeğer gallik asit olarak ifade edilmiştir [18-19].

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada tıbbi aromatik bitkilerden biri olan yıllık pelinotunun (*Artemisia annua* L.) kimyasal kompozisyonu ve antioksidan aktivitesi üzerine ekstraksiyon metotlarının etkisi incelenmiştir.

Sub ve süperkritik akışkan ekstraksiyonunda kullanılan koşullar, temel bileşenlerin yüksek göreceli bolluğuna göre belirlenmiş olup, Çizelge 3’de özetlenmiştir. SBD ve sbkH_2OE yöntemleri ile hazırlanan uçucu yağlar ile GSK, USE, skCO_2E ve sbkEtOHE yöntemleri ile hazırlanan ekstraktların ekstraksiyon verimleri Çizelge 2’de verilmiştir. Yukarıda anılan yöntemlerle elde edilen ekstraktların organik bileşenleri Çizelge 3’de verilmiştir. Çizelgelerde de göreceli miktarı %0,1’den az olan bileşenlere yer verilmemiştir. Ekstraktlara ait GC-MS kromatogramları ise Şekil 4’de verilmiştir.

Yıllık Pelinotunun (*Artemisia annua* L.) Kimyasal Kompozisyonu ve Antioksidan Kapasitesinin Belirlenmesinde Sub ve Süperkritik Akışkanların Etkisi



Şekil 4. Yıllık pelinotunun SBD, GSK, USE, skCO₂E, sbkH₂OE ve sbkEtOHE ekstraksiyon yöntemleriyle, elde edilen uçucu yağların kromato gramları

Ekstraksiyon metoduna göre ekstraksiyon verimleri değerlendirildiğinde; sbkEtOH yöntemiyle hazırlanan ekstraktın en yüksek ekstrakt verimine (%18,1) sahip olduğu gözlenmiştir (Çizelge 2).

Çizelge 2. Yıllık Pelinotunun ekstraksiyon metoduna göre hazırlanan ekstraktlarının ekstraksiyon verimleri

Yöntem	Yıllık pelinotu % Verim (w/w)
sbkH ₂ OE	1,2
skCO ₂ E	6,5
sbkEtOH	18,1
SBD	2,5
GSK	7,1
USE	6,9

3.1. Yıllık Pelinotu ile Yapılan Ekstraksiyonlar

Yıllık Pelinotundan GSK, USE, skCO₂E, ve sbkEtOHE yöntemleri ile elde edilen ekstraktlar ve SBD, sbkH₂OE ile hazırlanan uçucu yağın GC-MS analiz sonuçları Çizelge 3'de ve GC-MS kromatogramları ise Şekil 4'de verilmiştir. sbkH₂OE ile ekstraksiyon sırasında en etkin çalışma koşullarının 125 °C sıcaklık, 80 atm basınç

ve dakikada 2 ml akış hızı olduğu belirlenmiştir (Çizelge 1). Yıllık pelinotudan sbkH₂OE ile elde edilen uçucu yağın verimi %1,2 w/w'dir ve GC-MS analizinde ise 133 sinyal tespit edilmiştir (Çizelge 2 ve 3).

sbkH₂OE ile hazırlanan uçucu yağda temel bileşenler sırasıyla bisiklik seskiterpen olan arteannuin b (artemisin) (%25,5), bisiklik monoterpen olan kamfor (%20,1), düzensiz bir monoterpen olan artemisya keton (%17,2), bir bisiklik monoterpen eter olan 1,8- sineol (%5,5) ve bir seskiterpen lakton olan qinghaosu (%2,1)'dur. sbkH₂OE yöntemiyle hazırlanan uçucu yağın %0,2'sini monoterpen bileşikleri, %45,3'ünü oksijenli monoterpen bileşikleri ve %36,5'ini oksijenli seskiterpen bileşiklerinin oluşturduğu belirlenmiştir.

Yıllık pelinotunun skCO₂E ile ekstraksiyonunda en uygun çalışma koşullarının 40 °C sıcaklık ve 300 atm basınç olduğu belirlenmiştir Çizelge 1. Bu koşullarda elde edilen ekstraktın verimi %6,5'dir ve GC-MS analizinde ise 262 sinyal tespit edilmiştir (Çizelge 2 ve 3). skCO₂E ile hazırlanan uçucu yağda temel bileşenler sırasıyla artemisya keton (%11,7), arteannuin b (artemisin) (%11,6), kamfor (%11,0), 1,8- sineol (%8,5), bisiklik seskiterpen olan β-selinen (%7,6), çok yönlü seskiterpen olan karyofillen (%1,6) ve bisiklik monoterpen olan kamfen (%1,6)'dir. skCO₂E yöntemiyle hazırlanan uçucu yağın %4,7'sini monoterpen bileşikleri, %37,7'sini oksijenli monoterpen bileşikleri %13,2'sini seskiterpen bileşikleri ve %17,4'sini oksijenli seskiterpen bileşiklerinin oluşturduğu belirlenmiştir.

sbkEtOHE ile yıllık pelinotundan elde edilen ekstraktın verimi %18,1 w/w'dir ve bu verim 125 °C sıcaklık ve 80 atm basınç uygulandığında gözlenmiştir (Çizelge 1). GC-MS analiz sonuçlarına göre 79 sinyal tespit edilmiştir (Çizelge 2 ve 3). sbkEtOHE ile hazırlanan ekstraktta temel bileşenler sırasıyla artemisya keton (%28,5), arteannuin b (artemisin) (%8,2), 1,8-sineol (%7,6), kamfor (%7,5), 31 karbonlu düz zincirli alkan olan hentriakontan (%7,9), 30 karbonlu dallanmış alkan olan squalen (%6,4), 30 karbonlu düz zincirli alkan olan triakontan (%6,1)

ve β -selinen (%3,3)'dir. sbkEtOHE yöntemiyle hazırlanan uçucu yağın %0,4'ünü monoterpen bileşikleri, %45,3'ünü oksijenli monoterpen bileşikleri %6,0'ını seskiterpen bileşikleri, %13,8'ini oksijenli seskiterpen bileşikleri ve %20,4'ünü uzun zincirli hidrokarbon bileşiklerinin oluşturduğu belirlenmiştir.

SBD ile yıllık pelinotundan elde edilen uçucu yağın verimi %2,5 w/w'dir ve GC-MS kromatogramında 234 sinyal tespit edilmiştir (Çizelge 1,2 ve 3). SBD ile hazırlanan uçucu yağda temel bileşenler sırasıyla kamfor (%13,2), artemisya keton (% 11,4), 1,8-sineol (%10,2), β -selinen (%9,4), karyofillen (%3,3) ve karyofillen oksit (3,8) olarak saptanmıştır. SBD yöntemiyle hazırlanan uçucu yağın %8,6'sını monoterpen bileşikleri, %47,3'ünü oksijenli monoterpen bileşikleri, %21,1'ini seskiterpen bileşikleri ve %12,7'sini oksijenli seskiterpen bileşiklerinin oluşturduğu belirlenmiştir.

GSK ile yıllık pelinotundan elde edilen ekstraktın verimi %7,1 w/w'dir ve GC-MS kromatogramında 62 sinyal belirlenmiştir (Çizelge 1, 2 ve 3). GSK

yöntemiyle hazırlanan uçucu yağda temel bileşenler sırasıyla artemisya keton (%43,7), kamfor (%9,9), 1,8-sineol (%7,1), arteannuin b (artemisin) (%5,6), β -selinen (%4,3), kamfen (%1,9) ve karyofillen (%1,3) olarak bulunmuştur. GSK yöntemiyle hazırlanan uçucu yağın %5,1'ini monoterpen bileşikleri, %63,6'sını oksijenli monoterpen bileşikleri, %7,6'sını seskiterpen bileşikleri ve %9,3'ünü oksijenli seskiterpen bileşiklerinin oluşturduğu belirlenmiştir.

USE ile yıllık pelinotundan elde edilen ekstraktın verimi %6,9 w/w'dir ve GC-MS analizinde ise 75 sinyal tespit edilmiştir (Çizelge 2 ve 3). USE ile hazırlanan uçucu yağda temel bileşenler sırasıyla artemisya keton (%42,6), kamfor (%12,2), 1,8-sineol (%9,0), arteannuin b (artemisin) (%6,8), β -selinen (%5,2) kamfen (%2,5) ve karyofillen (%1,2)'dir. USE yöntemiyle hazırlanan uçucu yağın %7,2'sini monoterpen bileşikleri, %67,6'sını oksijenli monoterpen bileşikleri %8,3'ünü seskiterpen bileşikleri ve %10,9'unu oksijenli seskiterpen bileşiklerinin oluşturduğu belirlenmiştir.

Çizelge 3. Yıllık pelinotunun (*Artemisia annua* L.) ekstraksiyon metoduna göre kimyasal kompozisyonu

KI	Bileşen	Göreceli Dağılım (%)					
		sbkH ₂ O/E	skCO ₂ E	sbkEtOHE	SBD	GSK	USE
934	α -thujen	...	0,5	...	0,3
941	α -pinen	---	0,6	---	1,8	1,0	1,3
957	kamfen	---	1,6	---	2,9	2,0	2,5
973	Sabinen	---	0,3	---	0,5	0,7	0,8
980	β -pinen	---	0,7	---	1,3	0,7	1,1
983	β -mirsen	---	0,2	---	0,3	0,2	0,3
986	yomogi alkol	1,6	0,7	---	2,0	0,6	0,8
1016	α -humulen	...	0,1	---	0,3	---	0,2
1029	p-simen	0,2	0,6	0,4	1,1	0,3	0,5
1034	dl-limonen	---	---	---	0,1	---	0,1
1042	1,8-sineol	5,5	8,5	7,6	10,2	7,1	9,0
1072	artemisya keton	17,2	11,7	28,5	11,4	43,7	42,6
1073	γ -terpinen	---	0,2	---	---	0,2	0,4
1093	trans-sabinene hidrat	---	0,4	0,2	0,2	0,4	0,3
1098	3,3,6-trimetil-1,5-heptadien-4-ol	0,9	2,0	1,1	2,3	1,6	1,8
1119	E-farnesen epoksit	0,2	0,2	---	0,4	---	0,2
1128	5-isopropyl-2-metilbisiklo[3.1.0]hexan-	...	0,6	0,2	0,3	0,3	0,4
1146	2-metil-3-penten-1-ol	0,1	0,2

Yıllık Pelinotunun (*Artemisia annua* L.) Kimyasal Kompozisyonu ve Antioksidan Kapasitesinin Belirlenmesinde Sub ve Süperkritik Akışkanların Etkisi

Çizelge 3 (devam)

1155	α -kamfolenal	---	0,1	---	0,4	---	---
1162	2-metil-6-metilen-1,7-oktadien-3-on	...	0,1	...	0,3
1173	pinokarveol	0,3	0,4	---	0,9	---	0,2
1178	2,6-dimetil-1,5,7-oktatrien-3-ol	...	0,1	...	0,3
1183	kamphor	20,1	11,0	7,5	13,2	9,9	12,2
1189	cis-verbenol	---	0,2	---	0,5	---	---
1195	2(10)-pinen-3-on	0,2	0,3	---	0,7	0,2	0,3
1200	p-menth-1-en-8-ol	0,1	0,2	---	0,3	---	---
1205	borneol	---	0,13	---	0,6	---	---
1211	p-menth-1-en-4-ol	0,5	0,2	---	1,5	---	0,1
1227	linalil propionat	0,2	0,5	---	1,0	---	0,2
1232	mirtenal	0,2	0,2	---	0,3	---	0,2
1268	cis-karveol	...	0,2	...	0,2
1355	C ₁₀ H ₂₀ O	...	0,1	0,2
1386	eugenol	0,1	---	---	0,3	---	---
1405	α-kopaen	---	1,2	0,5	2,1	0,9	0,9
1413	benzil 2-metilbutanoat	---	0,4	0,2	1,1	0,3	0,4
1432	β -kopaen-4 α -ol	0,1	0,2
1447	karyofillen	---	1,6	---	3,3	1,3	1,2
1463	β -farnesen	---	0,8	0,5	1,3	0,4	0,5
1482	α -karyofillene	---	0,1	---	0,2	---	---
1496	α -himakalen	---	0,3	0,3	0,6	---	---
1508	germakren-d	---	0,4	0,7	2,4	0,7	0,6
1523	β-selinen	---	7,6	3,3	9,4	4,3	5,2
1548	δ -kadinen	---	0,4	---	0,2	---	---
1555	C ₁₅ H ₂₄ O	...	0,1	...	0,1
1564	C ₁₄ H ₂₂ O	...	0,1	0,1	0,1
1604	C ₁₅ H ₂₄	...	0,1	...	0,3
1611	tanımlanamadı	...	0,7	...	2,0	0,2	0,2
1612	C ₁₅ H ₂₄ O	...	0,6	0,2	0,2
1618	karyofillen oksit	---	0,9	---	3,8	0,7	0,6
1634	α -bisabolen epoxide	---	0,2	---	0,6	---	---
1645	kubenol	---	0,6	0,8	1,9	---	0,2
1672	C ₁₅ H ₂₄ O	0,1	0,5	0,9	1,0	0,1	0,2
1678	isoaromadendren	0,1	0,2	1,0	0,4	---	---
1721	C ₁₅ H ₂₄ O	1,2	1,2	---	0,2	0,8	0,8
1724	C ₁₄ H ₂₂ O	0,3	0,4	1,1	0,2	0,2	0,1
1751	arteannuik asit	0,2	0,2	---	---	---	---
1754	C ₁₅ H ₂₆ O ₂	0,1	0,1	0,5	---	---	---
1756	tanımlanamadı	1,6	0,7	0,1	---	0,3	0,3
1772	C ₁₅ H ₂₄ O	0,3	0,2	---	---	---	---
1778	tanımlanamadı	0,2	2,6	0,2	---	0,8	0,7
1797	sedran-8-13-diol	0,2	0,9	0,2	---	0,3	0,3
1800	C ₁₅ H ₂₄ O	...	0,4	---	---	0,3	0,3
1827	tanımlanamadı	0,7	0,3	0,2	---	---	---
1838	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	0,3	0,5	0,5	---	0,2	0,2
1850	iso-velleral	0,6	1,0	0,6	---	0,3	0,3
1857	tanımlanamadı	3,2	0,7	---	---	---	---

Çizelge 3 (devam)

1863	heneikosan	0,2	0,3	0,8	---	0,3	0,2
1867	deoksinghaosu	3,4	0,8	---	---	0,3	0,3
1877	arteannuin b (artemisin)	25,5	11,6	8,2	---	5,6	6,8
1885	tetrakosan	0,7	0,1	---	---	4,5	---
1945	Qinghaosu	2,1	---	---	---	---	---
1952	C ₁₄ H ₂₂ O ₂	...	1,1	---	---	0,4	0,4
1961	heptakosan						
2015	nonakosan	---	0,3	---	---	2,6	---
2102	squalen	---	---	6,4	---	---	---
2127	triakontan	---	---	6,1	---	---	---
2131	tanımlanamadı	---	---	1,2	---	---	---
2193	hentriacontan	---	---	7,7	---	---	---
TOPLAM GERİ KAZANIM		88,5	82,5	88	87,3	94,7	96,4

Çizelge 3'den de görüldüğü gibi yıllık pelinotundan elde edilen uçucu yağlarda belirlenen bileşenlerin göreceli dağılımı (%) seçilen ekstraksiyon metoduna göre farklılık göstermektedir.

Genel olarak α -tujen, α -pinen, kamfen, sabinen, β -pinen ve β -mirsen gibi monoterpen bileşiklerine sbkH₂O ve sbkEtOHE ekstraktlarında hiç rastlanmamıştır. Artemisya keton, kamfor, 1,8 sineol, β -selinen ve arteannuin b (artemisin) bileşikleri tüm yöntemlerde hazırlanan uçucu yağlarda belirlenmiştir. Ancak, artemisya keton göreceli olarak en fazla %43,7 ile GSK yönteminde gözlenirken, kamfor göreceli olarak en fazla (%20,1) sbkH₂O yönteminde, 1,8-sineol göreceli olarak en fazla (%10,2) SBD yönteminde, β -selinen göreceli olarak en fazla (%9,4) SBD yönteminde ve arteannuin b (artemisin) göreceli olarak en fazla (%25,5) sbkH₂O yönteminde gözlenmiştir.

Altı farklı ekstraksiyon ile yıllık pelinotundan elde edilen ekstraktlarda oksijenli monoterpen bileşikleri göreceli olarak en fazla USE ekstraksiyonunda elde edilirken, seskiterpen bileşikleri göreceli olarak en fazla SBD ekstraksiyonunda elde edilmiştir. Oksijenli seskiterpen bileşikleri ise göreceli olarak en fazla sbkH₂O yönteminde elde edilmiştir. Diğer yöntemlerden farklı olarak sbkEtOHE yönteminde uçucu yağların yanı sıra uzun zincirli hidrokarbonlar da elde edilmiştir.

Literatürde yer alan bir çalışmada yıllık pelinotunu hidrodestilasyon ekstraksiyonu ile ekstrakte etmişler. Ekstraksiyon sonucunda temel bileşenleri kamfor (%44,0), germakren (%16,0), trans-pinokarveol (%11,0), β -selinen (%9,0), β -karyofillen (%9,0) ve artemisya keton (%3,0) olarak belirlemişlerdir [11]. Literatürde yer alan bir diğer çalışmada Bulgaristan'da yetiştirilen yıllık pelinotunu hidrodestilasyon ekstraksiyonu ile ekstrakte etmişler. Ekstraksiyon sonucunda GC-MS analiz sonuçlarına göre temel bileşenleri α -karyofillen (%24,7), α -kuveben (%13,5), α -kopaen (%7,4), α -selinen (%8,2), artemisya keton (%8,5) ve kamfor (%3,6) olarak belirlemişlerdir [12].

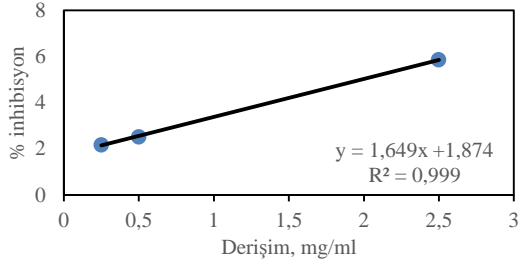
Literatürde yer alan çalışmalarda ve bizim çalışmamızdan elde edilen uçucu yağ bileşenleri aynı olmakla beraber göreceli dağılımları farklıdır. Bu da bitkilerin farklı coğrafyalardan yetiştirilmiş olmasından kaynaklanmaktadır.

3.1. Yıllık Pelinotundan Elde Edilen Uçucu Yağ ve Ekstraktların Antioksidan Aktiviteleri

3.1.1. DPPH Yöntemi

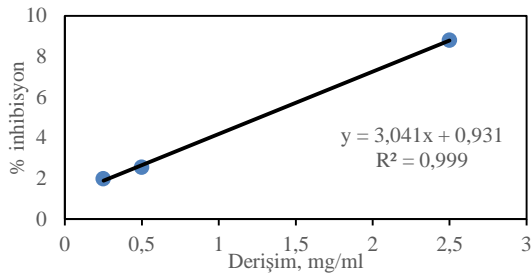
Yıllık pelinotunun su buharı destilasyonu ile ekstraksiyonu sonucu elde edilen ekstraktın DPPH yöntemi ile antioksidan aktivitesi ölçülmüştür. SBD ekstraksiyonu ile elde edilen ekstraktın, Şekil 5'de verilen grafikten, I₅₀ değeri 1167,2 mg bitki/ml olarak bulunmuştur.

Yıllık Pelinotunun (*Artemisia annua* L.) Kimyasal Kompozisyonu ve Antioksidan Kapasitesinin Belirlenmesinde Sub ve Süperkritik Akışkanların Etkisi



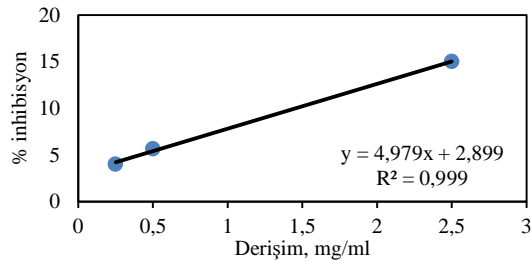
Şekil 5. Yıllık pelinotunun SBD ekstraksiyonu ile elde edilen ekstraktın derişim-% inhibisyon grafiği

Yıllık pelinotunun geri soğutucu altında çözücü ile kaynatma (GSK) sonucu elde edilen ekstraktın DPPH yöntemi ile antioksidan aktivitesi ölçüldüğünde, I_{50} değeri 227,3 mg bitki/ml olarak bulunmuştur (Şekil 6).



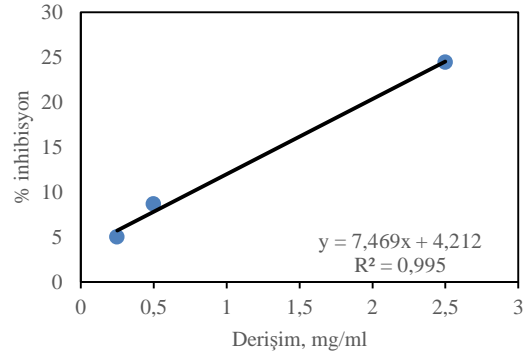
Şekil 6. Yıllık pelinotunun GSK ekstraksiyonu ile elde edilen ekstraktın derişim-% inhibisyon grafiği

Yıllık pelinotunun ultrasonik banyoda ekstraksiyonu (USE) sonucu elde edilen ekstraktın DPPH yöntemi ile antioksidan aktivitesi ölçüldüğünde (Şekil 7) I_{50} değeri 138,0 mg bitki/ml olarak bulunmuştur.



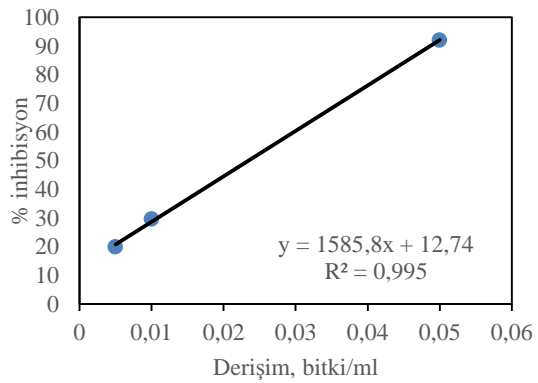
Şekil 7. Yıllık pelinotunun USE ekstraksiyonu ile elde edilen ekstraktın derişim-% inhibisyon grafiği

Sub kritik su ekstraksiyonu (sbkH₂O) sonucu elde edilen yıllık pelinotu ekstraktın I_{50} değeri 510,8 mg bitki/ml olarak bulunmuştur (Şekil 8).



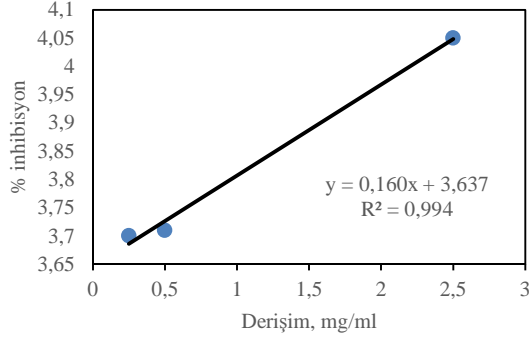
Şekil 8. Yıllık pelinotunun sbkH₂O yöntemi ile elde edilen ekstraktın derişim-% inhibisyon grafiği

Yıllık pelinotunun sub kritik etil alkol ekstraksiyonu (sbkEtO) sonucu elde edilen ekstraktın DPPH yöntemi ile antioksidan aktivitesi Şekil 9'da verilen grafikten, I_{50} değeri 24,4 mg bitki/ml olarak bulunmuştur.



Şekil 9. Yıllık pelinotunun sbkEtO yöntemi ile elde edilen ekstraktın derişim-% inhibisyon grafiği

Yıllık pelinotunun süper kritik CO₂ ekstraksiyonu (skCO₂) sonucu elde edilen ekstraktın DPPH yöntemi ile antioksidan aktivitesi ölçülmüştür. Şekil 10'da verilen grafikten, I_{50} değeri 4488,0 mg bitki/ml olarak bulunmuştur.



Şekil 10. Yıllık pelinotunun skCO₂E ekstraksiyonu ile elde edilen ekstraktın Derişim-% inhibisyon grafiği

Yöntem	I ₅₀ mg bitki/ml
sbkH ₂ OE	510,8
skCO ₂ E	4458,0
sbkEtOHE	24,4
SBD	1167,2
GSK	227,3
USE	138,0
BHT	1,55 mg BHT/ml

Çizelge 4. Yıllık pelinotunun altı farklı yöntemle elde edilen ekstraktlarının ve sentetik antioksidan BHT'nin DPPH yöntemi ile I₅₀ değerleri

Yıllık pelinotu için radikal temizleme aktivitesine göre yöntemleri büyükten küçüğe sıralayacak olursak sbkEtOHE>USE>GSK>sbkH₂OE > SBD >skCO₂E şeklinde sıralanmaktadır.

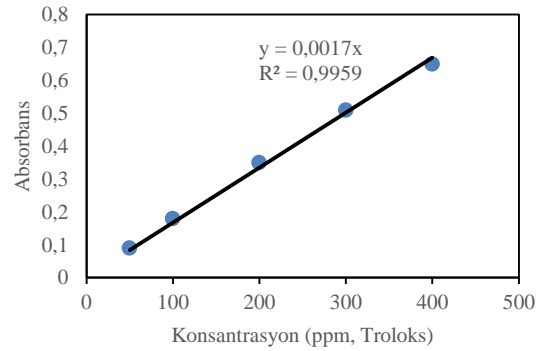
3.1.2. CUPRAC Yöntemi

Yıllık pelinotunun elde edilen altı farklı ekstraktlarının CUPRAC yöntemi ile toplam antioksidan aktiviteleri belirlenmiştir. Sonuçlar Şekil 11'de verilen kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak hesaplanmıştır. Elde edilen ekstraktların fenol içerikleri Çizelge 6'da gösterilmiştir. Çizelge 6'dan da görüleceği gibi sbkEtOHE yöntemiyle elde edilen ekstraktın diğer yöntemlerle elde edilen ekstraktlara göre yüksek fenol içeriğine sahip olduğu görülmektedir. Sonuçlar, CUPRAC yöntemi ve DPPH yöntemiyle elde edilen sonuçlarla benzerlik göstermektedir.

skCO₂E>sbkH₂OE>SBD şeklinde sıralanmaktadır. Sonuçlar DPPH yöntemiyle karşılaştırıldığında, benzer sonuçlar elde edildiği saptanmıştır.

Çizelge 5. Yıllık pelinotu ekstraktlarının CUPRAC yöntemi ile toplam antioksidan aktiviteleri

Yöntem	mg troloks/g bitki
sbkH ₂ OE	2,3
skCO ₂ E	3,2
sbkEtOHE	41,4
SBD	1,0
GSK	3,8
USE	7,9
BHT	1270,40 mg TR/g BHT



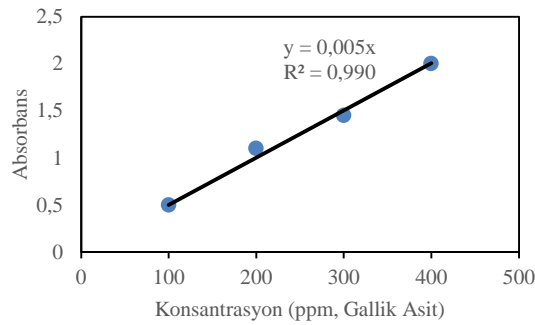
Şekil 11. Yıllık pelinotu ekstraktlarının CUPRAC yöntemiyle toplam antioksidan değerlerini belirlemek için standart troloks kalibrasyon eğrisi

3.1.3. Folin Ciocalteu Yöntemi (FOLIN)

Folin Ciocalteu yöntemi ile yıllık pelinotunun ekstraktlarının toplam fenol içerikleri belirlenmiştir. Sonuçlar Şekil 12'de verilen kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak hesaplanmıştır. Elde edilen ekstraktların fenol içerikleri Çizelge 6'da gösterilmiştir. Çizelge 6'dan da görüleceği gibi sbkEtOHE yöntemiyle elde edilen ekstraktın diğer yöntemlerle elde edilen ekstraktlara göre yüksek fenol içeriğine sahip olduğu görülmektedir. Sonuçlar, CUPRAC yöntemi ve DPPH yöntemiyle elde edilen sonuçlarla benzerlik göstermektedir.

Çizelge 6. Yıllık pelinotu ekstraktlarının Folin Ciocalteu yöntemi ile toplam fenol içeriklerinin belirlenmesi

Yöntem	mg GA/g bitki
sbkH ₂ OE	0,7
skCO ₂ E	0,9
sbkEtOHE	9,0
SBD	0,5
GSK	1,1
USE	2,6



Şekil 12. Yıllık pelinotu ekstraktlarının toplam fenol içeriklerinin belirlenmesi için standart gallik asit kalibrasyon eğrisi

4. SONUÇLAR

4.1. Sonuçlar ve Öneriler

i) sbkH₂OE yöntemiyle elde edilen ekstraktın uçucu yağ kalitesinin diğer yöntemlerle elde edilen yağlardan daha iyi olması, ekstraksiyonun hızlı bir şekilde tamamlanması, göreceli olarak düşük sıcaklıklarda çalışılarak, sıcaklıkla bozulan bileşenlerin kaybının önlenmesi, göreceli olarak düşük maliyetli olması, basit olması ve çevresel açıdan elverişli olması gibi özellikleri ile diğer yöntemlere güçlü alternatif bir yöntem olduğu belirlenmiştir. Antioksidan aktivitesi açısından değerlendirildiğinde sbkEtOHE ekstraksiyon metodunun güçlü bir yöntem olduğu görülmektedir. Bileşen konsantrasyonları ekstraksiyon metoduna göre değişiklik göstermesi nedeniyle; ekstraktın kullanım amacına uygun (gıda, kozmetik, ilaç vb.) bir ekstraksiyon metodunun

seçilebilmesinin mümkün olduğu belirlenmiştir.

- ii) Ekstraksiyon metoduna göre farklılık gösteren bileşenler amaca göre ekstrakte edildikten sonra ayırma ve saflaştırma teknikleri ile saf olarak elde edilebilir ve karakterize edilebilir.
- iii) Sub ve süper kritik akışkan ekstraksiyon için belirlenen optimum koşullarda sürekli bir ekstraksiyon sistemi ile çalışılabilir.
- iv) Elde edilen ekstraktlara mikrokapsülleme uygulamaları çalışılabilir.
- v) sbkH₂OE ve SBD ile ekstraksiyonda uçucu yağ elde edildikten sonra kalan sulu kısımdaki bileşenleri belirleme çalışmaları sıvı kromatografisi ile (HPLC, LC-MS, vb.) yürütülebilir.

5. TEŞEKKÜR

Bu çalışmada Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Koordinasyonu Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje numarası: FEF2006D19). Bu çalışmada yıllık pelinotunu temin edilmesini sağlayan, Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Öğretim Üyelerinden sayın Prof. Dr. Saliha KIRICI'ya teşekkür ederiz.

6. KAYNAKLAR

1. Türk, M., 2010. Bazı Önemli Tıbbi Bitkilerin Kimyasal Kompozisyonu ve Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesinde Sub ve Süperkritik Akışkanların Etkisi, Ç.Ü. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
2. Altunkaya, A., Yıldırım, B., Ekici, K., Terzioğlu, Ö., 2014. Determining Essential Oil Composition, Antibacterial and Antioxidant Activity of Water Wormwood Extracts, GIDA, 39(1), 17-24.
3. Martinez-Correa, A.H., Bitencourt G., Raphaela, Kayano, A.V.A.C., Magalhães, M.P., Costa, T.M.F., Cabral, A.F., 2017. Integrated Extraction Process to Obtain Bioactive Extracts of *Artemisia Annu* L.

- Leaves Using Supercritical CO₂, Ethanol and Water, *Industrial Crops and Products*, 95, 535-542.
4. Chrastil, J., 1982. Solubility of Solids and Liquids in Supercritical Gases, *Journal of Physical Chemistry*, 86, 3016-3021.
 5. Giray, E. S., Kırıcı, S., Kaya, D. A., Türk, M., Sönmez, Ö., İnan, M., 2008. Comparing the Effect of Subcritical Water Extraction with Conventional Extraction Methods on the Chemical Composition of *Lavandula Stoechas*. *Talanta*, 74, 930-935.
 6. Özel, Z.M., Gogus, F., Lewis, C.A., 2003. Subcritical Water Extraction of Essential Oils from *Thymbra Spicata*, *Food Chemistry*, 82, 381-386.
 7. Gracia, G.L., Castro, L.D.M., 2000. Continuous Subcritical Water Extraction of Medicinal Plant Essential Oil: Comparison with Conventional Techniques, *Talanta*, 51, 1179-1185.
 8. Kubatova, A., Miller, J.D., Hawthorne, B.S., 2001. Comparison of Subcritical Water and Organic Solvents for Extracting Kava Lactones from Kava Root, *Journal of Chromatography A*, 923, 187-194.
 9. Wang, Y., Gao, Y., Ding, H., Liu, S., Han, X., Gui, J., Liu, D., 2017. Subcritical Ethanol Extraction of Flavonoids from *Moringa Oleifera* Leaf and Evaluation of Antioxidant Activity, *Food Chemistry*, 218, 152-158.
 10. Mohammadreza, R.V., 2008. Variation in the Essential Oil Composition of *Artemisia annua* L. of Different Growth Stages Cultivated in Iran, *Botany Research Journal*, 1(2), 33-35.
 11. Juteau, F., Masotti, V., Bessiere, M.J., Dherbomez, M., Viano, J., 2002. Antibacterial and Antioxidant Activities of *Artemisia Annua* Essential Oil, *Fitoterapia*, 73, 532-535.
 12. Tzenkova, R., Kamenarska, Z., Draganov, A., Atanassov, A., 2010. Composition of *Artemisia Annua* Essential Oil Obtained From Species Growing Wild In Bulgaria, *Biotechnol & Biotechnol. Eq.*, 24(2), 1833- 1835.
 13. Beney, P.J., Breuer, G.M., Jacobs, G.H., Zierath, D.L., Mollenhauer, P.J., Norton, K.K., 1996. Review, Evaluation, and Application of Solid Phase Extraction Methods, Hygienic Laboratory, University of Iowa, 102 Oakdale Campus, Iowa City, Iowa, 52242-500.
 14. <http://webbook.nist.gov/chemistry/gc-ri/>
 15. Sanchez, M. C., Larrauri, J.A., Saura, C.F., 1998. A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76, 270-276.
 16. Miliuskas, G., Venskutonis, R. P., Beek, van T.A., 2004. Screening of Radical Scavenging Activity of Some Medicinal and Aromatic Plant Extracts, *Food Chemistry*, 85, 231-237.
 17. Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, E.S., 2004. Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and E, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Method, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7970-7981.
 18. Singleton, V.L., Rossi, J.A., 1965. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents, *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.
 19. Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M., 1999. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent, *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
 20. Wong, M., Li, B.H., Cheng, K.W., Chen, F., 2006. A Systematic Survey of Antioxidant Activity of 30 Chinese Medicinal Plants Using the Ferric Reducing Antioxidant Power Assay, *Food Chemistry*, 97, 705-7011.

