



**T. C.
SİVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KURKUMİN'İN GIDA VE TAKVİYE EDİCİ ÜRÜNLERDEN
DOĞRU VE SEÇİCİ ÖZÜTLENMESİ İÇİN DENEYSEL
TASARIM İLE YEŞİL ÇÖZÜCÜLERİN HAZIRLANMASI VE
UYGULANMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Özlem ABLAK
(20229209017)**

**Kimya Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Nail ALTUNAY**

**SİVAS
TEMMUZ, 2024**

Özlem ABLAK'ın hazırladığı ve “**Kurkumin’in gıda ve takviye edici ürünlerden doğru ve seçici özütlenmesi için deneysel tasarım ile yeşil çözücülerin hazırlanması ve uygulanması**” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **KİMYA ANA BİLİM DALI**’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı: **Prof. Dr. Nail ALTUNAY**
Sivas Cumhuriyet Üniversitesi

Jüri Üyeleri: **Prof. Dr. Mustafa TÜZEN**
Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi

Prof. Dr. Adil ELİK
Sivas Cumhuriyet Üniversitesi

Bu tez, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Nevcihan GÜRSOY
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 20.08.2014 tarihli ve 7 sayılı kararı ile kabul edilen Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzu (Yönerge)'nda belirtilen kurallara uygun olarak hazırlanmıştır.





Bütün hakları saklıdır.
Kaynak göstermek koşuluyla alıntı ve gönderme yapılabilir.

© Özlem ABLAK, 2024

Desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli eşim Onur ABLAK'a ve kıymetli çocuklarıma...

ETİK

Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tez Yazım Kılavuzu(Yönerge)'nda belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- ✓ Bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- ✓ Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- ✓ Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere, bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu ve atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- ✓ Bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- ✓ Tezin herhangi bir bölümünü, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi veya bir başka üniversitede, bir başka tez çalışması olarak sunmadığımı; beyan ederim.

12.07.2024

Özlem ABLAK

KATKI BELİRTME VE TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca çok değerli katkılarını benden hiçbir zaman esirgemeyen, çalışma azmi ve başarılarıyla benim için önemli bir rol modeli olan saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Nail ALTUNAY'a saygılarımı sunar, çok teşekkür ederim.

Bilimsel çalışmalara başladığım ilk günden beri, bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösterdiği gibi, aynı zamanda sunduğu manevi destekle büyük bir motivasyon kaynağı olan kıymetli hocam Sayın Prof. Dr. Adil ELİK' e saygılarımı sunar, teşekkürü borç bilirim.

Tüm çalışmalarım boyunca, manevi desteğini bana her zaman hissettiren, emeklerini esirgemeyen ve bu yolda beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan değerli arkadaşım ve kıymetli hocam Arş. Gör. Seçkin FESLİYAN'a çok teşekkür ederim.

Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Komisyonu'na F-2024-703 kodlu proje kapsamında sağladıkları mali destekten dolayı teşekkür ederim.

ÖZET

KURKUMİN'İN GIDA VE TAKVİYE EDİCİ ÜRÜNLERDEN DOĞRU VE SEÇİCİ ÖZÜTLENMESİ İÇİN DENEYSEL TASARIM İLE YEŞİL ÇÖZÜCÜLERİN HAZIRLANMASI VE UYGULANMASI

Özlem ABLAK

Yüksek Lisans Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Nail ALTUNAY

2024, 42+xiii sayfa

Bu tez çalışmasında, spektrofotometrik tayin (UV-Vis) öncesinde dağıtıcı sıvı-sıvı mikro ekstraksiyon (DLLME) yöntemiyle kurkuminin hızlı, güvenilir ve basit ekstraksiyonu için manyetik iyonik sıvılar (MIL'ler), derin ötektik çözücüler, SUPRAS ve yüzey aktif madde dahil olmak üzere farklı ekstraksiyon çözücülerinin kullanımı araştırıldı. Ön deneyler sonucunda, farklı matriksleri içeren örneklerden kurkuminin ekstraksiyonu için uygun ekstraksiyon çözücüsü olarak $[\text{Co}(\text{C}_8\text{IM})_4^{2+}]_2[\text{Cl}^-]$ MIL seçildi. DLLME yöntemine etki eden temel faktörlerin optimizasyonu merkezi kompozit tasarımı (CCD) ile gerçekleştirildi. Örnek çözeltide $[\text{Co}(\text{C}_8\text{IM})_4^{2+}]_2[\text{Cl}^-]$ MIL'nin etkili dağılımı, yörüngesel çalkalama (OS) ile sağlandı. CCD modelleme sonrasında OS-MIL-DLLME yöntemi, model çözelti için $0,15 \text{ ng mL}^{-1}$ tespit limitiyle $0,5\text{--}225 \text{ ng mL}^{-1}$ aralığında doğrusallık sağladı. OS-MIL-DLLME yöntemi 135 zenginleştirme faktörü ile %7,6 matriks etkisi gösterdi. OS-MIL-DLLME yönteminin seçicilik, sağlamlık, gün içi/günler arası kesinlik ve geri kazanım testi gibi doğrulama parametreleri detaylı olarak incelendi. Yöntemin yeşil analitik ölçeği, analitik yeşillik hesaplama aracı (AGREE) kullanılarak belirlendi. Referans yöntemle birlikte gıdalara ve bitkisel takviye ürünlerine OS-MIL-DLLME yöntemi uygulanarak nicel geri kazanımlar ve istatistiksel olarak güvenilir sonuçlar elde edildi.

ABSTRACT

PREPARATION AND APPLICATION OF GREEN SOLVENTS WITH EXPERIMENTAL DESIGN FOR THE ACCURATE AND SELECTIVE EXTRACTION OF CURCUMINE FROM FOOD AND SUPPLEMENTS

Özlem ABLAK

Master's Thesis

Department of Chemistry

Advisor: Prof. Dr. Adil ELİK

2024, 42+xiii pages

In this thesis, different extraction solvents including magnetic ionic liquids (MILs), deep eutectic solvents, SUPRAS and surfactant were investigated for the fast, reliable and simple extraction of curcumin in the dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) method prior to UV-Vis spectrophotometric analysis. As a result of preliminary experiments, $[\text{Co}(\text{C}_8\text{IM})_4^{2+}]_2[\text{Cl}^-]$ MIL was selected as the appropriate extraction solvent for curcumin extraction from samples containing different matrices. Optimization of essential factors in the DLLME method was carried out with central composite design (CCD). Effective dispersion of the $[\text{Co}(\text{C}_8\text{IM})_4^{2+}]_2[\text{Cl}^-]$ MIL in the sample solution was achieved by orbital shaking (OS). After the CCD modelling, the OS-MIL-DLLME method provided linearity in the range of 0.5-225 ng mL⁻¹ with a detection limit of 0.15 ng mL⁻¹ for the model solution. The OS-MIL-DLLME method exhibited a matrix effect of 7.6% with an enrichment factor of 135. Validation parameters of the OS-MIL-DLLME method such as selectivity, robustness, intraday/interday precision and recovery test were investigated in detail. The green analytical profile of the method improved was determined using the Analytical Greenness Calculator tool (AGREE). The OS-MIL-DLLME method was applied to the foods and herbal supplement products together with the reference method, and quantitative recoveries and statistically reliable results were obtained.

İÇİNDEKİLER

KATKI BELİRTME VE TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1 Kurkumin	1
1.1.1 Kurkuminin genel özellikleri	1
1.1.2 Kimyasal yapısı	1
1.1.3 Biyokimyasal veriler.....	2
1.1.4 Antioksidan aktivite.....	3
1.1.5 Emilim, dağılım, metabolizma ve atılım	4
1.1.6 Toksikolojik veriler ve kabul edilebilir günlük alım	4
1.2 Eser analiz.....	6
1.3 Numune hazırlama yöntemleri	7
1.4 Örnek hazırlamada kullanılan yeşil çözücüler	7
1.5 Optimizasyon ve deney tasarımı.....	9
1.6 Geri kazanım ve analitik parametrelerin hesaplanması.....	10
2. MATERYAL VE METOT	12
2.1 Cihazlar	12
2.2 Reaktifler ve çözücüler.....	12
2.3 Örnek toplama ve hazırlama	13
2.4 Ekstraksiyon çözücülerinin hazırlanması.....	13
2.4.1.Yüzey aktif maddeler.....	13
2.4.2.SUPRAS hazırlanması.....	13
2.4.3.DES hazırlanması.....	14
2.4.4.MIL hazırlanması.....	14
2.5 Deneyel tasarım	14
2.6 OS-MIL-DLLME Yöntemi	15
3. BULGULAR.....	17
3.1 Ön denemeler.....	17
3.1.1. Farklı ekstraksiyon çözücülerinin karşılaştırılması.....	17
3.1.2. Karşılaştırma türünün seçimi.....	18
3.1.3. Geri ekstraksiyon çözücüsünün seçimi.....	19

3.2 CCD modelleme	20
3.2.1. ANOVA verileri.....	21
3.2.2. Yüzey yanıt grafikleri.....	24
3.2.3. Optimum koşulların özeti.....	26
3.3 Yöntemin analitik özellikleri.....	27
3.3.1. Analitik performans.....	27
3.3.2. Sağlamlık.....	28
3.3.3. Seçicilik.....	29
3.3.4. Gün içi/günler arası deneyler.....	30
3.3.5. Geri kazanım testleri.....	30
3.3.6. Gerçek numunelerin analizi.....	31
3.4 Analitik verilerin karşılaştırılması.....	33
3.5 Geliştirilen yöntemin yeşil profili	35
4. SONUÇLAR.....	36
KAYNAKLAR	37
ÖZGEÇMİŞ.....	43

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1	Kurkumin'in kimyasal yapısı (a) ve keto-enol tautomerizmi (b).....	2
Şekil 1.2	Kurkumin molekülündeki önemli fonksiyonel kısımlar: 1,3-keto-enol grubu (A), o-metoksi ve fenolik gruplar (B) ve çift bağlar (C).....	3
Şekil 2.1	Kurkumin derişimine bağı UV spektrumu.....	16
Şekil 2.2	OS-MIL-DLLME yönteminin şematik gösterimi.....	16
Şekil 3.1	Ekstraksiyon çözücüsünün kurkumin geri kazanımı üzerine etkisi.....	18
Şekil 3.2	Karıştırma türünün kurkumin geri kazanımına etkisi.....	19
Şekil 3.3	Geri ekstraksiyon çözücü türünün kurkuminin ekstraksiyon geri kazanımına etkisi.....	20
Şekil 3.4	CCD'den elde edilen sonuçların güvenilirliği.....	23
Şekil 3.5	(a-c) Kurkuminin CCD yüzey yanıt grafikleri: (a) pH-MIL-1 miktarı (mg); (b)geri ekstraksiyon çözücüsünün hacmi (µL)-MIL-1 miktarı (mg); (c) yörüngesel çalkalama süresi (dk)- MIL-1 miktarı (mg).....	26
Şekil 3.6	Temel faktörlerin optimum değerleri ve bu değerler için kurkuminin tahmini geri kazanım yüzdesi.....	27
Şekil 3.7	Geliştirilen yöntemin AGREE puanı.....	35

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1	Kurkuminin bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri.....	2
Çizelge 1.2	Çeşitli ürünlerde kurkuminin izin verilen ve raporlanan maksimum seviyeleri.....	5
Çizelge 2.1	OS-MIL-DLLME yöntemini etkileyen önemli faktörlerin optimizasyonu için kurulan CCD modelinin özeti.....	15
Çizelge 3.1	CCD’de yer alan deney sayısı ve kurkuminin ekstraksiyon geri kazanımı.....	21
Çizelge 3.2	OS-MIL-DLLME yönteminde CCD’ nin uyum özeti.....	22
Çizelge 3.3	CCD modelleme için faktörlerin ANOVA sonuçları.....	23
Çizelge 3.4	Farklı kalibrasyon çözeltileri için OS-MIL-DLLME yönteminin analitik performansı.....	28
Çizelge 3.5	Optimum koşullardaki küçük farklılıkların OS-MIL-DLLME yönteminin sağlamlılığı üzerindeki etkisi.....	28
Çizelge 3.6	Farklı türlerin varlığında kurkuminin (40 ng mL ⁻¹) için OS-MIL-DLLME yöntemin seçiciliği.....	29
Çizelge 3.7	OS-MIL-DLLME yönteminin gün içi ve günler arası deneyleri.....	30
Çizelge 3.8	OS-MIL-DLLME yönteminin gerçek numuneler üzerindeki geri kazanım sonuçları.....	31
Çizelge 3.9	Gerçek örneklerin OS-MIL-DLLME yöntemi ve referans yöntemle analizi....	32
Çizelge 3.10	OS-MIL-DLLME yönteminin analitik verilerinin diğer yöntemlerle karşılaştırılması.....	34

KISALTMALAR DİZİNİ

AB	: Avrupa Birliği
IUPAC	: Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
CAS	: Kimyasal Kısaltmalar Servisi
JECFA	: Gıda Katkı Maddeleri Uzman Komitesi
ADI	: Kabul Edilebilir Günlük Alım Değeri
UV-Vis	: Ultraviyole Görünür
LPME	: Sıvı Faz Mikroekstraksiyonu
DES	: Derin Ötektik Çözücü
MIL	: Manyetik İyonik Sıvı
HBA	: Hidrojen Bağ Alıcı
HBD	: Hidrojen Bağ Verici
CCD	: Merkezi Kompozit Tasarımı
LOD	: Seçme Limiti
LOQ	: Tayin Limiti
HIV1	: İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
DLLME	: Dağıtıcı Sıvı-sıvı Mikroekstraksiyonu
ELLME	: Emülsifikasyon Sıvı-sıvı Mikroekstraksiyonu
SPME	: Katı Faz Mikroekstraksiyonu
CPME	: Bulutlanma Noktası Mikroekstraksiyonu
SUPRAS	: Supramoleküler Çözücüler
EF	: Zenginleştirme Faktörü
BSS	: Bağlı Standart Sapma
OS	: Yörüngesel çalkalama
LR	: Doğrusal Aralık
ER	: Ekstraksiyon Geri Kazanım
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
CTAB	: Setiltrimetilamonyum Bromür
BBD	: Box-Behnken Tasarımı
Triton X-114	: Polietilen Glikol Tert-Oktil Fenil Eter
PONPE 7.5	: Polioksietilen (7.5) Nonil Fenil Eter
TBAB	: Tetrabutilamonyum Bromür
ACN	: Asetonitril
THF	: Tetrahidrofuran
MeOH	: Metanol
(C₈IM)₄	: N-butylimidazol
[P_{6,6,6,14}⁺][Cl⁻]	: Triheksil Fosfonyum Klorür
[N₄₄₄₄][Br]	: Tetra-n-butilamonyum Bromür
DecA	: Dekanoik Asit
LacA	: Laktik Asit

1. GİRİŞ

Canlı yaşamında beslenme önemli bir yere sahiptir. Beslenme ihtiyacını karşılamamanın ana unsuru ise çeşitli gıda maddelerinin tüketimidir. Doğru gıda maddesinin tüketimi doğru beslenmenin ve sağlıklı bir yaşamın temelini oluşturmaktadır. Bu açıdan bakıldığında, gıda maddelerinin bileşiminin incelenmesinin sağlık, üretim ve tüketim gibi birçok alanla doğrudan ilgili olduğu görülecektir. Kurkumin, farklı gıda maddelerinin içeriğinde kendiliğinden yer aldığı gibi birçok gıda katkı maddesinde de destekleyici bileşen olarak bulunmaktadır. Bu bağlamda farklı işlevlere sahip olan kurkuminin çeşitli ürün gruplarındaki bileşiminin aydınlatılması bahsi geçen alanlarla ilgili süreçlere ışık tutacaktır.

1.1.Kurkumin

1.1.1.Kurkuminin genel özellikleri

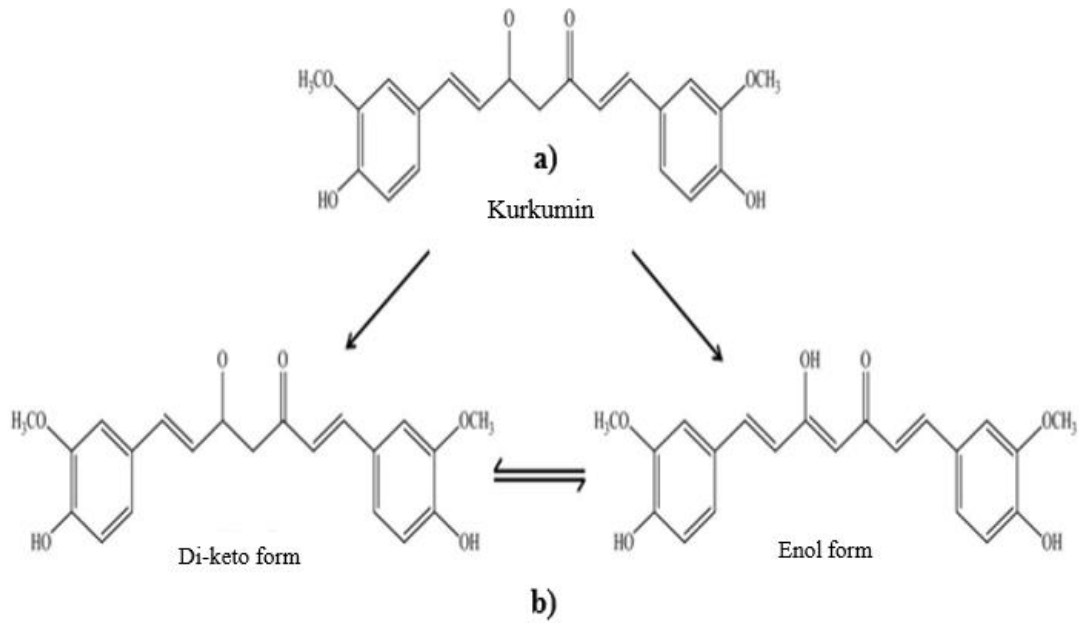
Kurkuminin keşfi yaklaşık iki asır öncesine dayanmaktadır. Vogel ve Pelletier bu keşfi yaptıklarında kurkumini “sarı renk veren madde” olarak tanımladılar. Asya'nın güney ve güneybatı bölgelerinde yetişen zerdeçalın (*Curcuma longa*) sahip olduğu sarı renk kurkuminden ileri gelmektedir [1]. Zerdeçalın yanı sıra hardal ve köri de içerdiği kurkumin kaynaklı sarı renktedir. Sıklıkla baharat olarak kullanılan kurkumin, sahip olduğu renk tonu dolayısıyla gıda ve kozmetik ürünlerinde renklendirici olarak da kullanılmaktadır [2]. Renklendirici olarak kullanılan kurkumin “Natural yellow 3 (E-100)” olarak adlandırıldı [3].

1.1.2. Kimyasal yapısı

IUPAC’a göre (1,7-bis-(4-hidroksi-3-metoksifenil)-1,6-heptadien-3,5-dion) veya diferüloilmetan olarak adlandırılan kurkuminin molekül formülü $C_{21}H_{20}O_6$ ve mol kütlesi $368,38 \text{ g mol}^{-1}$ dir. Yapısındaki β -diketon sebebiyle diketo/keto-enol tautomerizmi gösterir. Çözücü polaritesi, pH ve sıcaklık gibi parametreler kurkuminin keto-enol dengesini etkilemektedir. Kurkuminin enol-keto tautomerlerinin oranı farmakolojik aktivitesine etki ettiği için oldukça önemlidir [3-5]. Kurkuminin kimyasal yapısı ve enol-keto tautomerizmi sırasıyla Şekil 1.1’de verildi.

Çizelge 1.1 Kurkuminin bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri [6]

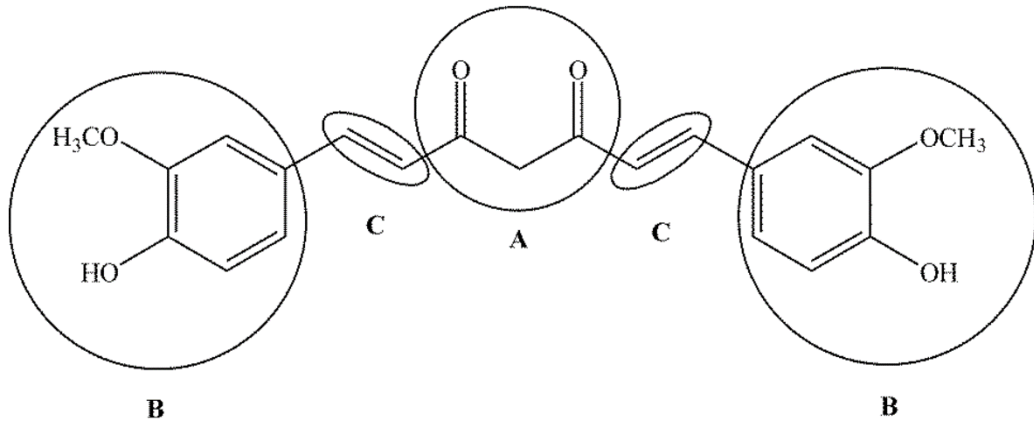
Çözünürlük	Çözünür: etanol, asetik asit, aseton Çözünmez: su, eter
Yoğunluk	0,9343 14,4°C’de
Fiziksel tanımlama	Sarı-turuncu kristal tuz
Erime noktası	183 °C
Kimyasal sınıfı	Biyolojik ajanlar: bitki yağları ve ekstraktları
Uv spektrumu	Etanolde 426 nm maksimum
pH	8,08-8,75



Şekil 1.1 Kurkumin’in kimyasal yapısı (a) ve keto-enol tautomerizmi (b) [7]

1.1.3. Biyokimyasal veriler

Kurkumin, bir polifenol olup diarilheptanoid grubunun bir üyesidir. Yapısında bir enol kısmı ve 1,3-diketon grubu ile konjuge özellikte yedi karbonlu bir hidrokarbon zincirine bağlı metoksi ve orto konumunda bir fenolik OH grubu ile simetrik olan iki aromatik halka içermektedir [8]. Kurkuminin içerdiği önemli fonksiyonel kısımlar Şekil 1.2’de görülmektedir.



Şekil 1.2 Kurkumin molekülündeki önemli fonksiyonel kısımlar: 1,3-keto-enol grubu (A), o-metoksi ve fenolik gruplar (B) ve çift bağlar (C) [3]

Yapısındaki aromatik halkalar kurkumine hidrofobik özellik sağlarken α,β -doymamış β -diketo gruplar moleküle esneklik kazandırmaktadır. Bu molekül yapısı kurkumin molekülünün farklı biyomoleküllere bağlanmasını mümkün kılmaktadır. β -dikarbonil grubunun hidrojen bağı oluşturması ve molekülün içerdiği fenolik hidroksil ve de metoksi grubu kalıntılarının farklı metal ve ametallerle tepkimeye girmesiyle önemli biyolojik tepkimeler gerçekleşmektedir. Kurkumin, inflamatuvar moleküller, protein redüktaz, ksantin oksidaz, insan bağışıklık yetmezliği virüsü (HIV1) integrası, HIV1 proteazı, deoksiribo nükleik asit (DNA), histon asetil transferaz, taşıyıcı proteinler gibi birçok sinyal biyomoleküle doğrudan bağlanabilmektedir [9]. Kurkuminin taşıyıcı proteinlere bağlanabilmesi oldukça önemlidir; bu yeteneği sayesinde çözünürlüğü ve biyoyararlanımı artmaktadır.

1.1.4. Antioksidan aktivite

İnsan vücudunun endojen sistemlerinde çeşitli fiziksel ve kimyasal olaylar sonucu reaktif oksijen ve reaktif azot türleri üretilir. Bunlar DNA'yı, lipitleri ve proteinleri değiştirebilmektedir, yaşlanma ve çeşitli hastalığa sebebiyet vermektedir. Kurkumin önemli bir antioksidandır. Yapısındaki fenolik gruplardan hidrojen vermesi onu fenolik antioksidan yapar. Kurkuminin antioksidan özelliği yapısındaki metoksi ve fenoksi grupları ve karbon-karbon çift bağı gibi farklı fonksiyonel grupların mevcudiyetinden ileri gelmektedir [3]. Yapılan bir çalışmada [10], sıçanların beyin, karaciğer ve böbreklerinde stres kaynaklı oksidatif hasarın oluşumunun kurkumin tarafından önlendiği tespit edildi. Kurkuminin yapısındaki

diketo grubu geçiş metallerle elatlar oluşturup metal toksisitesini azaltabildiği gibi oluşan metal kompleksleri antioksidan aktivite sergileyebilir [11]. Kurkumin H₂O₂, HO•, ROO• gibi küçük oksidatif molekülleri etkisizleştirme kapasitesi oldukça yüksektir. Hücre sitoplazmasındaki reaktif oksijen türlerine karşı yüksek koruyuculuğa sahiptir [12]. Niki ve çalışma arkadaşları farklı kurkumin analogları sentezlemiş ve bunların antioksidan aktivitelerini incelemişlerdir [13]. Heptadion bağlantısının merkezinde yer alan CH₂ grubundan transfer edilen H atomunun ve fenolik OH grubunun antioksidan etkide önemli bir rol oynadığını belirtmişlerdir.

1.1.5. Emilim, dağıtım, metabolizma ve atılım

150-200 g erkek sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada, sıçanlara 400 mg kurkumin %0,1'lik Tween 20 zeltisiyle süspansiyon halinde verildi. Verilen dozun %40'luk kısmı beş günlük bir süreçte dışkıyla atılırken %60'ının emildiği varsayıldı. İdrarda kurkumine rastlanamazken kan, karaciğer ve böbrekte ihmal edilebilir düzeyde kurkumin bulundu[14]. İnsanlar zerindeki bir çalışmada, ileri düzey kolorektal kanseri 15 hastaya dört ay boyunca her gün 26, 72, 108, 144 ve 180 mg kurkumine eşdeğer dozlarda Curcuma z verildi. Tedaviden sonra plazmada, idrarda kurkumin veya türevleri tespit edilmezken tüm hastaların dışkısında kurkumin bulundu. 180 mg/gün miktarıyla dozlanan hastanın dışkısında kurkumin sülfat tespit edildi. Yazarlar bu durumun kurkuminin bağırsaklardaki biyotransformasyonunun sonucu olabileceğini öne sürdü [15].

1.1.6. Toksikolojik veriler ve kabul edilebilir günlük alım

Yapılan bir çalışmada [16], kurkuminin 10-50 µM derişimlerde in vitro olarak insan lenfositlerinde ve mide mukoza hücrelerinde DNA hasarını tetiklediği ve ayrıca bir mutajen ve kanserojen olduğu bilinen altı değerlikli krom iyonuyla birleştiği bildirildi. Başka bir çalışma da DNA hasarının in hamsteri yumurtalık hücrelerinde de gerçekleştiğini bildirmektedir [17]. On albino sıanla yapılan çalışmada altı gün boyunca günlük olarak arap zamlı içinde %2'lik süspansiyon halinde 50 ve 100 mg/kg vücut ağırlığı oranında kurkumin oral yolla verildi. Sonuçta yüksek dozda mide erozyonu rapor edildi [18]. Farklı bir çalışmada yer alan sıçanların sentetik diyetine %0,3, %1,0 ve %10 seviyelerinde zerdeçal ve % 0,1, 0,5, 1,0 ve % 2,0 seviyelerinde kurkumin dahil edildi. Bu çalışmada gıda verimliliğinde azalma

gözlenirken, büyüme, albümin, globülin, total serum proteini ve kolesterol açısından bir değişiklik gözlemlenmedi [19].

Yapılan çalışmalar ışığında Gıda Katkı Maddeleri Ortak FAO/WHO Uzman Komitesi tarafından 50-320 mg/kg vücut ağırlığı/gün değerinde herhangi bir yan etki izlenmeyen düzey dikkate alınarak, 3 mg/kg vücut ağırlığı/günlük bir kabul edilebilir günlük alım değeri (ADI) kurkumin için belirlendi. Ayrıca normal diyetten kurkumin alımının ADI değerinin %7'sinden daha azına tekabül ettiği kaydedildi [20]. Avrupa Parlamentosu ve Konsey Direktifi 94/36/EC'ye göre içeceklerde ve gıda maddelerinde izin verilen maksimum kurkumin seviyeleri ve aynı örnek gruplarında rapor edilen maksimum kurkumin seviyeleri Çizelge 1.2'de verildi.

Çizelge 1.2 Çeşitli ürünlerde kurkuminin izin verilen ve raporlanan maksimum seviyeleri [20]

Örnek grubu	İzin verilen maksimum seviye (mg L ⁻¹)	Raporlanan maksimum seviye (mg L ⁻¹)
Alkolsüz aromalı içecekler	100	100
Amerikano, acı soda, sıvı gıda takviyeleri	100	100
Alkollü içecekler	200	-*
Aromalı şaraplar, şarap bazlı içecekler	200	200
Sosis, ezme, sebzeli yahni	20	2,5
Çorbalar	50	35
İşlenmiş peynir, füme balık, kabuklu hayvan ezmesi	100	100
Atıştırmalık ürünler	200	75

*İlgili endüstri tarafından kullanım rapor edilmemiştir.

1.2. Eser Analiz

Kimyasal türlerin eser analizi, gıda güvenliği, biyomedikal çalışmalar ve çevresel numunelerde miktar tayini gibi birçok alanda oldukça önem arz etmektedir. Eser analiz çalışmaları genelde numune alma, numune ön işlemleri, analitlerin ayrılması ardından nitel ve nicel tayin adımlarından oluşmaktadır. Doğru metot seçimi, analitik süreci takip eden diğer çalışmalara da doğru bir temel oluşturmakta ve bu çalışmaların güvenilirliğine katkı sağlamaktadır [21]. Kurkuminin çeşitli örnek matrislerinde eser seviyelerde bulunması göz önünde bulundurulduğunda, eser analiz kapsamında uygun bir yöntem seçimi analitik sürecin önemli bir parçası olmaktadır.

Kurkumin özellikle sahip olduğu antioksidan etki sebebiyle birçok araştırmaya konu oldu. Çeşitli ürün grubunda yer almasının temel sebebi sağladığı çeşitli avantajlar olsa da referans aldığımız çalışmalardan da görüleceği üzere sağlık açısından olumsuz etkileri de rapor edildi. Bu olumsuz etkileri sebebiyle kurkumin alımına ilişkin bazı kısıtlamalar getirildi. Bu kısıtlamalar ve olumsuz etkiler kurkuminin farklı örnek gruplarından doğru ve seçici analitik tayinini gerekli kılmaktadır. Yapılacak doğru ve seçici analitik tayin çalışmalarıyla kurkuminin alımına ilişkin gerekli kontroller sağlanabilir ve doğru bir tüketim bilinci oluşturulabilir.

Literatürde kurkuminin farklı örneklerden tayini amacıyla kullanılmış farklı analitik teknikler yer almaktadır: akıllı telefon dijital görüntü kolorimetresi [22], UV dedektörlü yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC-UV) [23], ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometrisi [24], sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometrisi [25], voltametri [26]. Bu tekniklerin duyarlılığı ve seçiciliği yüksek olmasına rağmen bakım ve işletme maliyetlerinin yüksek olması, uzman kullanıcı gerektirmesi ve uygulama zorluğu gibi dezavantajları bulunmaktadır. Özellikle düşük gelirli ülkelerdeki çoğu araştırma laboratuvarında bu cihazlar maliyetleri sebebiyle yer almamaktadır. Mor ötesi-görünür bölge spektrofotometrisi (UV-Vis spektrofotometrisi) en sık kullanılan, basit ve ucuz bir tekniktir. UV-Vis spektrofotometrisi, düşük maliyeti ve kullanım kolaylığı ile diğer yöntemlerden ayrılmaktadır [27]. Bu özelliklere dayanarak UV-Vis

spektrofotometrisi kurkumin analizinde yaygın olarak kullanılan tekniklerden biridir [28-30].

1.3. Numune Hazırlama Yöntemleri

Numune hazırlama yöntemleri, karmaşık numune matrislerinde eser miktarlarda yer alan analitin tayini için oldukça önemlidir. Numune matrisinin kompleks yapısı ve düşük analit miktarları analitik cihazın performansını da etkilemektedir. Ayırma ve zenginleştirme yöntemleri seçici ve duyarlı analitik tayinler için sıklıkla kullanılmaktadır. Özellikle klasik ekstraksiyon tekniklerinin yüksek miktarlarda organik çözücü gerektirmesi ve işleme alınan numune miktarlarının yüksek olması mikroekstraksiyon tekniklerini ilgi çekici kılmaktadır. Mikroekstraksiyon teknikleri, adından da anlaşılacağı üzere düşük (mikrolitre) seviyelerde çözücü ve numune miktarlarının kullanılması ve prosedürde yer alan çözücülerin çevreci, düşük toksisiteli ve düşük maliyetli olması gibi avantajlara sahiptir. Klasik ekstraksiyon yöntemlerinden daha basit olan bu teknikler enerjiden ve maliyetten de tasarruf sağlar [31, 32]. Mikroekstraksiyon teknikleri genel olarak katı ve sıvı faza dayalı teknikler olmak üzere iki başlık altında toplanmaktadır. Son zamanlarda literatürde kurkuminin ekstraksiyonu için emülsifikasyon sıvı-sıvı mikro ekstraksiyonu (ELLME) [33], katı faz mikroekstraksiyonu (SPME) [34], dağıtıcı sıvı-sıvı mikroekstraksiyonu (DLLME) [35], bulutlanma noktası mikroekstraksiyonu (CPME) [36] gibi farklı mikroekstraksiyon teknikleri kullanılmaktadır. DLLME, ekstraksiyon çözücüsü ve dağıtıcı çözücünün sulu numuneye hızlı bir şekilde enjekte edilmesine dayanmaktadır. Çözücünün dağılmasıyla hedef analitin teması artar ve hızlı bir ekstraksiyon kinetiği sağlanır. Sonuçta yüksek ekstraksiyon geri kazanımı ve zenginleştirme faktörü elde edilir. Aynı zamanda bu prosedür düşük maliyetli ve basittir [37, 38]. Bu tez kapsamında yapılan çalışmalarda, sağladığı çeşitli avantajlar göz önünde bulundurularak kurkuminin mikroekstraksiyonu için DLLME tekniği kullanıldı.

1.4. Örnek Hazırlamada Kullanılan Yeşil Çözücüler

DLLME’de ekstraksiyon verimini etkileyen en önemli faktörlerden biri kullanılan çözücü türüdür. Uygun çözücünün seçilmesiyle analit ve çözücü molekülleri arasındaki etkileşim artarak etkin kütle transferini sağlamaktadır. Ayrıca kullanılan çözücü türü yöntemin yeşil profilini, maliyet-etkinliğini ve analitik özelliklerini belirlemektedir. Mikroekstraksiyon tekniklerinde birçok yeşil çözücü

kullanılmaktadır. Bu çözücüler, düşük toksisiteli, biyobozunur, düşük maliyetli, ayarlanabilir ve üstün çözme yetenekleriyle oldukça dikkat çekmektedir. Bu pozitif özelliklerden faydalanmak için birçok araştırmacı DLLME’de manyetik iyonik sıvılar (MIL) [39], sürfaktanlar [40], derin ötektik çözücüler (DES) [41], supramoleküler çözücüler (SUPRAS) [42] gibi farklı mikroekstraksiyon çözücüsü kullanmaktadır. MIL; iyonik sıvıların manyetik özellik kazanmış halidir. Sahip oldukları manyetik duyarlılık yüksek spinli geçiş metallerinden kaynaklanmaktadır. İhmal edilebilir buhar basıncı ve termal kararlılığın yanı sıra bu çözücü grubu, ekstraksiyon fazının ek bir ayırma aşamasına gerek olmadan dışarıdan uygulanan bir manyetik alan yardımıyla ayrılmasına olanak tanımaktadır. Bu enerji ve maliyetten tasarruf anlamına gelmektedir. Sürfaktanlar; Hem hidrofilik hem de hidrofobik olma özelliğini bulunduran molekülleri (miseller) ihtiva eden çözücülerdir. Düşük maliyetli olup çok sayıda analitle etkileşebilme özelliğine sahiptir. Sodyum dodesil sülfat (SDS) ve setiltrimetilamonyum bromür (CTAB) bu gruba aittir. DES; Derin ötektik çözücüler hidrojen bağı alıcısı (HBA, kuaterner amonyum tuzları) ve hidrojen bağı vericisi (HBD, aminler, alkoller, karboksilik asitler) olarak adlandırılan bileşenlerinin belirli bir sıcaklıkta, uygun bir molar oranda karıştırılmasıyla elde edilmektedirler. Kolay hazırlanış, maliyet etkinliği, düşük toksisite ve biyobozunurluk gibi özelliklere sahiptir. SUPRAS; Amfifillerin kendi kendine birleşmesiyle oluşturdukları nano yapıları sıvılardır. Uçucu ve alevlenebilir olmayan bu çözücü grubu ayarlanabilir özellikte ve düşük maliyetlidir. Alkoller ve karboksilik asitler SUPRAS elde etmede sıklıkla kullanılmaktadır. Deneysel çalışmalar kapsamında, kurkuminin seçici ve verimli ekstraksiyonu için bahsi geçen çözücü gruplarının etkinliği test edilmiştir.

Analit ve çözücü moleküllerinin temasını artırmak için ultrasonik ses dalgalarının enerjisinden, girdap ve karıştırma etkisinden faydalanılmaktadır. Bu tarz fiziksel etkileşimler analit ve çözücü moleküllerinin kinetik enerjisini artırarak birbirleri arasında gerçekleşen teması kolaylaştırmaktadır. Böylelikle kütle transferinin artışıyla iyi bir ekstraksiyon verimi elde edilmektedir. Bu tez kapsamında yapılan deneysel çalışmalarda, kurkuminin ekstraksiyon verimini artırmak için yörüngesel çalkalayıcıdan faydalanıldı.

1.5. Optimizasyon ve Deney Tasarımı

Optimizasyon, analitik süreç içerisinde uygulanması gereken en önemli aşamalardan biridir. Sonuçların güvenilirliğinin ve tekrarlanabilirliğinin sağlanmasında önemli olduğu gibi, analitik yöntemin geçerli olması için de gereklidir. Yöntemin optimize edilmesi, en iyi analitik sinyalin elde edilmesi için gerekli koşulların en uygun hale getirilmesidir. Analitik kimyada optimizasyon için farklı yaklaşımlar dikkate alınmaktadır. En yaygın olan yaklaşım ise her deneyde yalnızca bir değişkenin değiştirilip diğer değişkenlerin sabit tutulduğu tek değişkenli optimizasyon yaklaşımıdır. Bu yaklaşım her bir değişkenin diğer değişkenler üzerine olan etkisini, karesel etkileşimleri dikkate almaktadır. Gerçekte ise tüm değişkenlerin birbiri üzerine etkisi söz konusudur. Bu eksikğin yanında tek değişkenli yaklaşımda yapılacak deney sayısı oldukça fazladır. Bu durumda işleme alınacak numune sayısı, kullanılan kimyasalların miktarları ve tüketilen enerji miktarı artar. Bu dezavantajları ortadan kaldırmak çok değişkenli optimizasyon stratejisinin kullanılmasıyla mümkündür. Yanıt yüzeyi metodolojisi bu amaçla sıklıkla kullanılmaktadır [43]. Bu yöntemde model, deneysel değişkenlere bağlı tahminler yapar. Tahminler ise çok terimli bir denklem kullanılarak tanımlanmaktadır. Yanıt yüzeyi metodolojisinin uygulanması için ilk olarak ön deneylerin yorumlanmasıyla bağımsız değişkenler belirlenmelidir. Daha sonra uygun bir deney tasarım yöntemi seçilerek model tarafından belirlenen deneyler yapılır. Bu deneyler kapsamında elde edilen veriler çok terimli bir denklem tarafından işlenmektedir. Sonuç olarak ise değişkenlerin optimum seviyeleri belirlenir. Burada, seçilecek deney tasarım yöntemi de oldukça önemlidir. Birden fazla değişkenin üç seviyeli olarak incelendiği Box-Behnken Tasarımı (BBD), Merkezi Kompozit Tasarımı (CCD) ve Doehlert Tasarımı gibi deney tasarım yöntemleri araştırmacılar tarafından sıklıkla kullanılmaktadır [44]. Bu yöntemler arasında seçim yapılırken deney sayısı ve deneysel faktörlerin seviyelerinin sayısı dikkate alınır. CCD basit oluşuyla oldukça kullanışlıdır. CCD’de tam veya isteğe bağlı olarak etkileşim türlerinin seçilmesiyle fraksiyonlu faktöriyel tasarım yapmak mümkündür. Ayrıca CCD faktörlerin seviyeleri için merkez bir nokta ve deneysel noktaların merkezden uzak olduğu ek bir tasarım belirler ve bunu α ile tanımlar. CCD modelinde yer alan tüm faktörler $-\alpha, -1, 0, +1, +\alpha$ olmak üzere beş seviyede incelenmektedir [45].

Bu tez çalışmasında kurkuminin ekstraksiyonunda önemli değişkenlerin seçimi ve bu değişkenlerin seviyeleri belirlendikten sonra optimize edilmesi için CCD'nin özelliklerinden faydalanıldı.

Bu mevcut tez çalışması, spektrofotometrik tayini öncesinde çeşitli gıdalarda ve bitkisel takviye ürünlerinde kurkuminin ekstraksiyonu için farklı ekstraksiyon çözücülerinin (DES'ler, MIL'ler, SUPRAS'lar ve yüzey aktif maddeler) kullanılabilirliğini araştırmaya odaklanmaktadır. CCD modellemeye dayalı çalışmalar sonucunda bu numunelerdeki kurkumin tayini için seçici, hızlı ve yeşil yörünge çalkalayıcı destekli manyetik iyonik sıvı bazlı dağıtıcı sıvı-sıvı mikroekstraksiyonu (OS-MIL-DLLME) yöntemi geliştirildi. MIL ve yörünge çalkalama sırasıyla ekstraksiyon çözücüsü ve dispersiyon aracı olarak kullanıldı. Yöntemin analitik yeşili AGREE aracı kullanılarak 0,77 olarak hesaplandı ve bu değer yeşilliği doğruladı. OS-MIL-DLLME yöntemi kurkumin için eser düzeyde LOD ve LOQ sağladı. Mevcut yöntem, kurkumin analizi için farklı ekstraksiyon çözücülerinin eş zamanlı olarak araştırıldığı ilk çalışmadır.

1.6. Geri Kazanım ve Analitik Parametrelerin Hesaplanması

Doğruluk: Bir yöntemin doğruluğu, yöntemin uygulanmasıyla elde edilen sonuçların gerçek veya gerçek kabul edilen değerini ifade eder. Geri kazanım yüzdesi, analitik yöntemin doğruluğunu tanımlamak için kullanılmaktadır. Aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır;

$$Geri\ Kazanım, \% = \frac{C_{bulunan}}{C_{eklenen}} \times 100$$

Burada, $C_{eklenen}$ ekstraksiyon öncesinde model çözeltiye eklenen kurkum derişimini, $C_{bulunan}$ ise önerilen yöntem uygulandıktan sonra tespit edilen kurkumin derişimini ifade etmektedir.

Kesinlik: Aynı yolla elde edilen tekrarlı sonuçların birbirlerine yakınlığını göstermektedir. Bir analitik yöntemin kesinliği ifade etmek için bağıl standart sapma (BSS) hesaplanır. Genel olarak BSS'nin %5'ten daha küçük olması istenmektedir. BSS aşağıdaki eşitlikten hesaplanmıştır;

$$BSS, \% = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

Eşitlikte yer alan s , analitik veri setinin standart sapması, $\bar{x}$ ise bu veri setinin ortalamasıdır.

Zenginleştirme Faktörü (EF): Analit derişiminin geliştirilen yöntemin uygulanmasıyla kaç kat arttırıldığını belirtmektedir. EF, aşağıdaki eşitlikten hesaplanmıştır.

$$EF = \frac{C_{ölçüm\ fazı}}{C_{başlangıç}}$$

Verilen eşitlikte $C_{ölçüm\ fazı}$, ekstraksiyon sonrası ölçüm fazındaki analitin derişimini, $C_{başlangıç}$ ise analitin başlangıç çözeltisindeki derişimidir.

Korelasyon Katsayısı: Analit derişimi ve buna karşılık elde edilen analitik sinyalin birbirleriyle doğru orantılı olup olmadığını belirtir. Korelasyon katsayısı (R^2) doğrusallığı belirtmektedir.

Çalışma Aralığı: Kalibrasyon eğrisinde analitin tayin edilebilen en küçük derişimi ve doğrusallıktan sapma meydana gelen derişim aralığını kapsamaktadır.

Seçme Sınırı (LOD): Analitin kantitatif sınırlar içerisine girmeyen en düşük derişimi olup aşağıdaki eşitlikten hesaplanmıştır.

$$LOD = \frac{3s_{kör}}{m}$$

Eşitlikte yer alan $s_{kör}$ kör (boş) çözeltinin standart sapması iken m ise kalibrasyon eğrisinin eğimidir.

Tayin Sınırı (LOQ): Analitin belirli bir doğruluk ve kesinlikle tayin edilebildiği en düşük derişimidir. Aşağıdaki eşitlikten hesaplanmıştır.

$$LOQ = \frac{10s_{kör}}{m}$$

Duyarlılık: Analitik yöntemin duyarlılığı, analitin derişiminde meydana gelen küçük değişimlerin analitik sinyaldeki değişimin büyüklüğü olarak ifade edilir.

Matriks etkisi: Farklı türlerin varlığında analit için analitik yöntemin seçiciliğini ifade etmek için kullanılır. Bu faktör aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır

$$\text{Matriks etkisi} = \left[\frac{m_1}{m_2} \right] \times 100$$

Burada m_1 model çözeltilerin kalibrasyon eğrisinin eğimi, m_2 ise matriks uyumlu kalibrasyon çözeltilerinin eğimidir.

Doğrusal Aralık (LR): Kalibrasyon eğrisinde tayin edilebilecek en düşük derişim ve doğrusallıktan sapma görülen derişim aralığını kapsar.

2. MATERYAL VE METOT

Bu tez kapsamında yapılan deneysel çalışmalarda kullanılan cihazlar, kimyasallar ve kullanılan yönteme ilişkin tüm bilgiler bu kısımda detaylı olarak açıklandı.

2.1. Cihazlar

Farklı örneklerden kurkuminin ekstrakte edilmesi için geliştirilen OS-MIL-DLLME yönteminde kullanılan cihazlar aşağıda listelendi. MIL'lerin ve derin ötektik çözücülerin hazırlanması için sıcaklık kontrollü ve değişken frekanslı bir ultrasonik banyo (SK5210LHC modeli,  in) kullanıldı. Ekstraksiyon   zeltilerinin pH ayarı, dijital bir pH metre (Selecta 2001 Sartorius, Kuzey Amerika) kullanılarak sağlandı. Faz ayırımının ardından nihai çözeltideki kurkumin miktarı, bir UV-Vis spektrofotometre (UV-1800, Shimadzu, Japonya) kullanılarak belirlendi. MIL'nin sulu çözeltiden ayrılması, güçlü bir NdFeB mıknatısı (60 mm x 10 mm x 5 mm) kullanılarak gerçekleştirildi. Ekstraksiyon çözücüsünün sulu çözeltide etkili dağılımı yörüngesel bir  alkalayıcı (Multi Bio RS-24, BioSan, Berlin, Almanya) ile elde edildi. Deney suyu bir Milli-Q sistemi (ICW-3000, Merck, Darmstadt, Almanya) kullanılarak sağlandı. Numunelerin  n işleminde Soxhlet cihazı (SZF-06A, Jinglong Instruments, Shanghai,  in) kullanıldı.

2.2. Reaktifler ve   z c ler

Ekstraksiyon aşamasında reaktiflerden ve solüsyonlardan kaynaklanan kontaminasyonu önlemek için analitik saflıkta kimyasallar kullanıldı ve başka bir saflaştırma işlemi uygulanmadı. Kurkumin reaktifi (saflık %98>) Sigma'dan (St. Louis, MO. ABD) satın alındı. 200 mg L⁻¹ stok çözeltisi uygun miktarda etanol (Merck, Darmstadt, Almanya) içerisinde çözülerek hazırlandı ve karanlıkta saklandı. Kurkuminin ekstraksiyon çözeltileri, stok çözeltinin sıralı seyreltilmesiyle elde edildi. Ekstraksiyon   zeltilerinin pH'ı sitrat, borat, ftalat ve asetat gibi tampon çözeltiler kullanılarak ayarlandı. Etanol, metanol (Sigma, MeOH), asetonitril (Merck, ACN), kloroform (Merck), tetrahidrofuran (Sigma, THF) ve n-oktanol (Merck) geri ekstraksiyon çözücüleri olarak araştırıldı. N-butilimidazol (C₈IM)₄ (Sigma, saflık %99>), CoCl₂·6H₂O (Merck, saflık %98), triheksil (tetradecyl) fosfonyum klorür [P_{6,6,6,14}⁺][Cl⁻] (Merck, saflık %95) ve manganez(II) klorür tetrahidrat (MnCl₂·4H₂O) (Merck, saflık %98>) MIL'leri hazırlamak için kullanıldı. Polioksietilen (7,5) nonilfenil eter (PONPE 7,5, saflık %96>) ve polietilen glikol tert-oktil fenil eter

(Triton X-114, saflık %96>) Sigma'dan satın alındı. Tetra-n-butilamonyum bromür ([N₄₄₄₄]Br) (Sigma, saflık %98>), dekanolik asit (DecA) (Merck, saflık %99,5>), L-Mentol (Merck, saflık %99>) ve Laktik asit (LacA) (Merck, saflık %98,5>) derin ötektik çözücüler (DES'ler) hazırlamak için kullanıldı. SUPRAS'ları hazırlamak için Heptanol (Merck, saflık %99,5>), THF, sodyum dodesil sülfat (SDS) (Merck, saflık %98>) ve tetrabutilamonyum bromür (TBAB) (Merck, saflık %99>) kullanıldı.

2.3. Örnek Toplama ve Hazırlama

Bu araştırmada Sivas'taki yerel pazarlardan ve aktarlardan aromatik gıda takviyesi, bitkisel gıda takviyesi, zerdeçal tozu, zerdeçal ekstraktı, zerdeçal yağı, seylan çayı, bitkisel karışım macunu, zerdeçal içeren bitki çayı, siyah çay, yeşil çay, tarçın ve köri gibi gerçek örnekler toplandı. Numunelerin hazırlanması daha önce bildirdiğimiz makaleye göre hazırlandı [46]. Numunelerin ön işleme tabi tutulması aşağıdaki deneysel adımları içerir. İlk olarak toplanan katı numuneler laboratuvar karıştırıcısı kullanılarak toz haline getirildi. Bu adımın ardından toz numuneler (10 g) ve sıvı numuneler (10 mL) dikkatlice tartılarak 30 mL metanol içeren volumetrik şişelere döküldü. Daha sonra balon jojeler Soxhlet cihazına yerleştirildi. Berrak bir çözelti elde edilene kadar sıralı ekstraksiyon yapıldı. Ortaya çıkan berrak çözelti, oda sıcaklığına kadar soğutuldu ve 0,45 µm'lik bir membran filtreden süzüldü. Son aşamada filtrelenen çözeltiye OS-MIL-DLLME yöntemi uygulandı.

2.4. Ekstraksiyon çözücülerinin hazırlanması

Gerçek örneklerden kurkuminin ekstraksiyonu için yüzey aktif maddeler, DES'ler, SUPRAS ve MIL'ler araştırıldı.

2.4.1. Yüzey aktif maddeler

Yüzey aktif maddeler olarak TritonX-114 ve PONPE 7,5 kullanıldı. Yüzey aktif maddenin %5,0'lık (ağırlık/hacim) çözeltileri, bunların 5 gramının 100 mL su içinde çözülmesiyle hazırlandı.

2.4.2. SUPRAS hazırlanması

Bu çalışmada SUPRAS-1 (heptanol/THF/su) ve SUPRAS-2 (SDS/TBAB/su) aşağıdaki prosedüre göre hazırlandı. SUPRAS-1'i hazırlamak için 4 mL THF ve 6 mL su içeren test tüplerine 0,5 mL heptanol eklendi. SUPRAS-2'yi hazırlamak için 20 mg SDS ve 10 mL su içeren test tüplerine 1 mL TBAB eklendi. Elde edilen karışımlar daha sonra 5 dakika süreyle vortekslendi. Tüpler 4000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi

ve düşük yoğunluklu SUPRAS sulu çözelti üzerinde toplandı. SUPRAS'lar bir mikro şırınga ile çekildikten kurkuminin ekstraksiyonu açısından incelendi.

2.4.3. DES hazırlanması

DES hazırlamanın temeli, hidrojen bağı alıcısı (HBA) ve hidrojen bağı vericisi (HBD) olarak adlandırılan iki veya daha fazla bileşenin belirli bir molar oranda karıştırılması ve daha sonra elde edilen karışımın homojen bir çözelti elde edilinceye ısıtılmasına dayanmaktadır. DES-1, $[N_{4444}]Br$ ve DecA'nın 1:1 molar oranda karıştırılmasıyla hazırlandı. DES-2, L-Mentol ve LacA'nın 1:2 molar oranda karıştırılmasıyla hazırlandı.

2.4.4. MIL hazırlanması

$[Co(C_8IM)_4^{2+}]_2[Cl^-]$ MIL-1 için beherlere 16 mmol N-oktilimidazol ve 4 mmol $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ eklendi. Daha sonra beherler ısıtıcı tablaya yerleştirildi ve reaksiyonun gerçekleşmesi için bir gün boyunca $100^\circ C$ 'de karıştırılarak ısıtıldı. Elde edilen karışım daha sonra 10 mL metanol içerisinde çözüldü ve bir gün boyunca $60^\circ C$ 'de geri soğutucu altında ısıtıldı [47]. $[P_{6,6,6,14}]^{+2}[MnCl_4^{2-}]$ MIL-2 için, diklorometan içerisinde 10 mL $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (1 eşdeğer) ve 10 mL $[P_{6,6,6,14}]^+[Cl^-]$ (1 eşdeğer) bir kapta karıştırıldı. Daha sonra elde edilen karışım reaksiyonu tamamlamak için oda sıcaklığında bir gün boyunca manyetik karıştırıcı kullanılarak karıştırıldı. Son olarak, elde edilen karışımdaki diklorometan, döner bir buharlaştırıcı kullanılarak uzaklaştırıldı [48].

2.5. Deneysel Tasarım

OS-MIL-DLLME yöntemini etkileyen temel faktörlerin optimizasyonu merkezi kompozit tasarımı (CCD) ile gerçekleştirildi. Ön çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre temel faktörler MIL miktarı (X, mg), pH (Y), geri ekstraksiyon çözücü hacmi (Z, μL) ve orbital çalkalama süresi (T, dk) olarak belirlendi. X, Y, Z ve T sırasıyla 10–40 mg, 3,5–7,5 200–800 μL ve 10–90 dakika aralıklarında araştırıldı.

Ayrıca bir çalışma (başlangıç noktası $\pm \alpha$) alt ve üst limitlerde de gerçekleştirildi ve faktörlerin kapsamı araştırıldı. Temel faktörlerin kurkumin ekstraksiyonunu etkilemesi için CCD modellemesinin aşağıdaki ikinci dereceden denklem (denklem-1) ile uyumlu olması gerekir.

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{1 \leq i < j}^k \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (1)$$

Bu denklemde Y , kurkuminin ekstraksiyon geri kazanımını, X_i ve X_j bağımsız temel faktörleri ve β_0 , β_i , β_{ii} , β_{ij} sırasıyla temel faktörlerin doğrusal, ikili ve ikinci dereceden etkileşimlerini tanımlamaktadır. ε , artık değeri, yani deneysel sonuç ile tahmin edilen sonuç arasındaki farkı ifade eder. OS-MIL-DLLME yöntemi için kurulan CCD modelinin özeti Çizelge 2.1'de sunulmuştur.

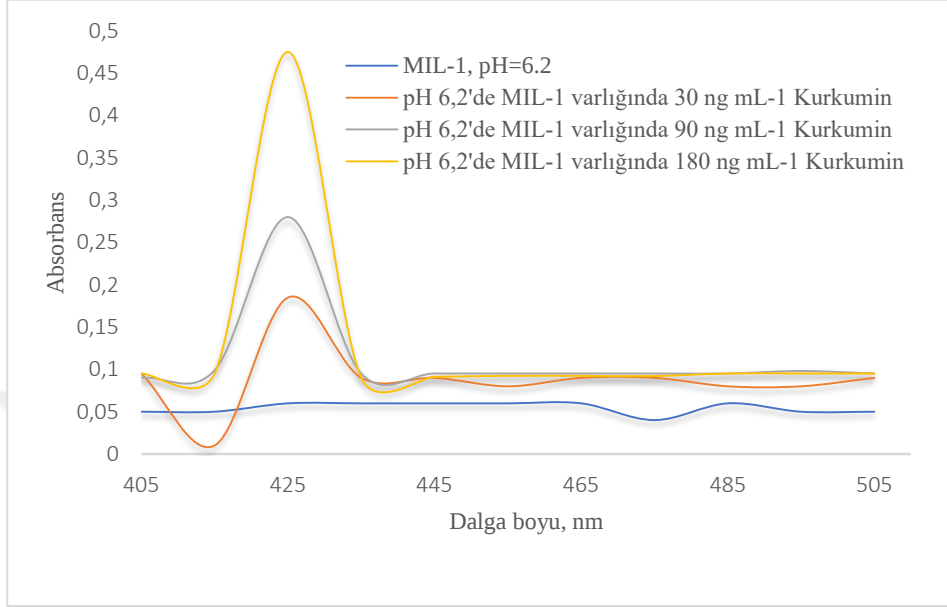
Çizelge 2.1 OS-MIL-DLLME yöntemini etkileyen önemli faktörlerin optimizasyonu için kurulan CCD modelinin özeti

Faktörler ve birimleri	Sembol	Seviyeler				
		-1	0	+1	$-\alpha$ (1.2)	$+\alpha$ (1.2)
MIL-1 miktarı, mg	X	10	25	40	7	13
pH	Y	3,5	5,5	7,5	3,1	7,9
Geri ekstraksiyon çözücüsünün hacmi, μL	Z	200	500	800	140	860
Yörüngesel çalkalama süresi, dk	T	10	50	90	02	98

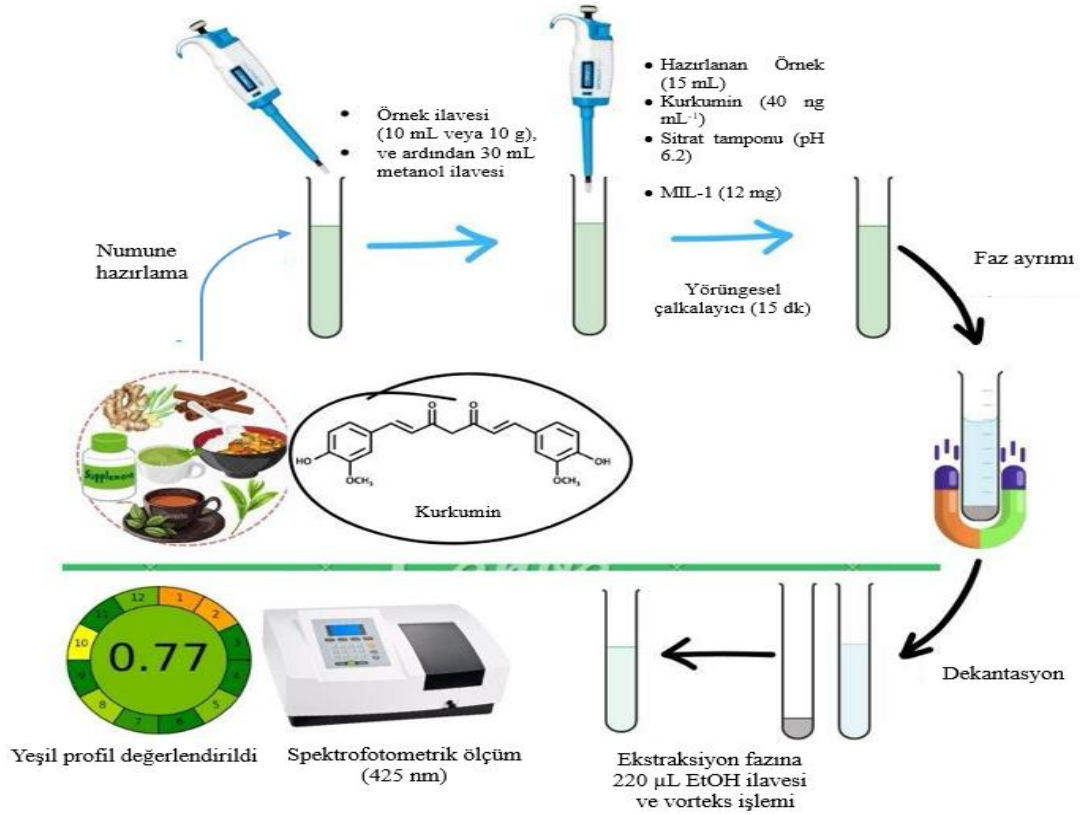
2.6. OS-MIL-DLLME yöntemi

Kurkuminin çeşitli gıdalardan ve bitkisel takviyelerden ekstraksiyonuna yönelik OS-MIL-DLLME yönteminin altı deneysel adımı bu kısımda özetlendi. Adım-1, 15 mL örnek çözelti, 40 ng mL⁻¹ kurkumin içeren konik tüplere döküldü. Adım-2, ekstraksiyon çözeltisinin pH'ı, 0,1 mol L⁻¹ sitrat tampon çözeltisi kullanılarak 6,2'ye ayarlandı. Adım-3, elde edilen çözeltiye 12 mg MIL-1 (ekstraksiyon çözücüsü olarak) ilave edildi. Eklenen MIL-1'in numune çözeltisi içinde tamamen dağıldığından emin olmak için tüpler 15 dakika boyunca bir yörüngesel çalkalayıcı kullanılarak karıştırıldı. Kurkumin daha sonra MIL-1 tarafından absorbe edildi. Adım-4: Dışarıdan güçlü bir NdFeB mıknatısı tüplerin kenarına tutularak MIL fazına geçen kurkumin örnek çözeltiden ayrılarak MIL ile birlikte güçlü mıknatıs üzerinde toplandı. Adım-5, sulu çözelti boşaltıldı ve kurkuminin MIL fazından geri ekstraksiyonu için ekstraksiyon fazına 220 μL Etanol ilave edildi ve 10 saniye

boyunca vorteks uygulandı. Adım-6, mıknatıs tekrar tüplerin kenarına tutuldu ve MIL fazı kurkumin çözeltisinden ayrıldı. Kurkumin çözeltisi mikro küvetlere aktarıldı ve 425 nm'de spektrofotometrik ölçümler yapıldı. Ekstraksiyon koşulları altında kurkumin için elde edilen UV spektrumu Şekil 2.1'de gösterilmektedir



Şekil 2.1 Kurkumin derişimine bağı UV spektrumu



Şekil 2.2 OS-MIL-DLLME yönteminin şematik gösterimi

3. BULGULAR

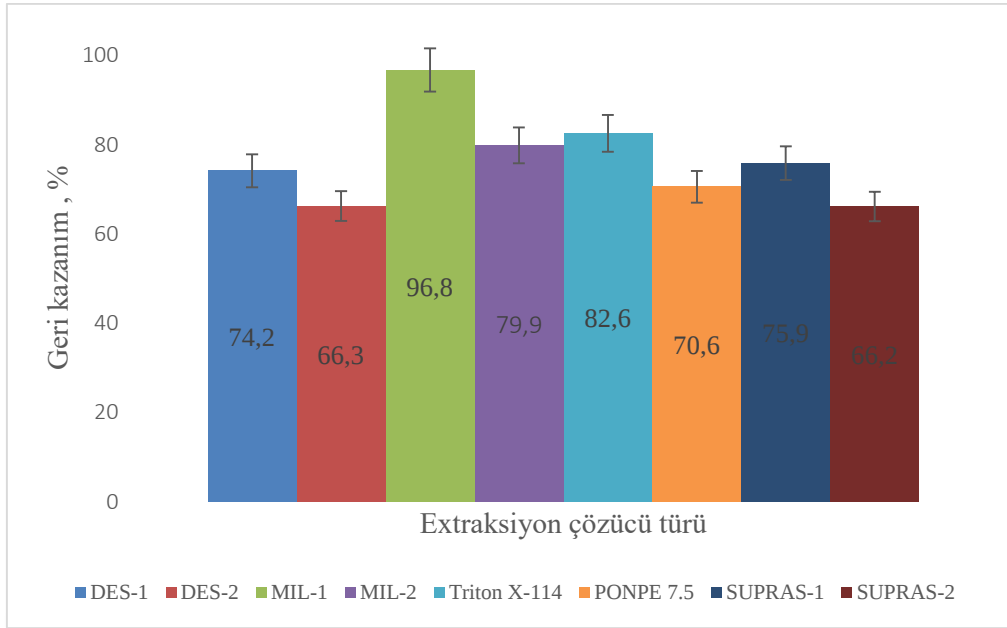
3.1 Ön Denemeler

CCD modellemeyden önce kurkumin ekstraksiyonunu etkileyen temel faktörleri belirlemek için bazı ön deneyler yapıldı. Ön deneyler ekstraksiyon çözücüsünün seçimini, karıştırma tipinin seçimini ve geri ekstraksiyon çözücüsünün seçimini içermektedir.

3.1.1. Farklı ekstraksiyon çözücülerinin karşılaştırılması

DLLME yönteminde hedef analitin ayrılması ve zenginleştirilmesi ekstraksiyon çözücülerini kullanılarak gerçekleştirildi. Bu durum DLLME yönteminde ekstraksiyon çözücü seçiminin önemini artırmaktadır. Bu çalışmada sürfaktan, DES, MIL ve SUPRAS gibi farklı çözücülerin kurkumin ekstraksiyonuna etkisi test edildi. Her ekstraksiyon grubundan iki farklı ekstraksiyon çözücüsünün kullanımı araştırıldı. Dolayısıyla kurkumini ekstrakte etmek için sekiz farklı ekstraksiyon çözücüsü kullanıldı. Araştırılan ekstraksiyon çözücülerinin bileşimi ve hazırlanma koşulları Bölüm 2.4'te anlatıldı. DLLME çalışmalarında araştırılan ekstraksiyon çözücülerini örnek çözeltiye eşit miktarlarda eklendi. DLLME deneyleri sonucunda elde edilen kurkuminin ekstraksiyon geri kazanım yüzdeleri (E.R%) Şekil 3.1'de verildi.

En iyi faz ayrımı ve en yüksek ER% $[\text{Co}(\text{C}_8\text{IM})_4^{2+}]_2[\text{Cl}^-]$ MIL-1 varlığında elde edildi. MIL'nin varlığı, güçlü manyetik miknatısların kullanılmasıyla etkin bir faz ayrımının gerçekleşmesi ve harici bir ayırma prosedürü gerektirmemesi açısından oldukça avantajlıdır. Kurkumin için en düşük ER% DES (DES-1 için 74,2% ve DES-2 için 66,3%) varlığında gerçekleştirildi. Triton X-114 ve PONPE 7,5 yüzey aktif maddeleri kullanıldığında kurkuminin E.R%'si %70,6-82,6 aralığında olduğu görüldü. Ancak sürfaktanların kullanıldığı çalışmalarda sürfaktanların misellerini oluşturmak için 40°C'de 10 dakika sonikasyon uygulandı. Diğer ekstraksiyon çözücülerini karşılaştırıldığında yüzey aktif maddeler ekstra enerji ve zaman tüketen deneysel adımlar içermektedir. SUPRAS-1 ve SUPRAS-2 varlığında kurkuminin %E.R'si sırasıyla %75,9 ve %66,2 idi. Tüm çalışmalar birlikte değerlendirildiğinde, DLLME yönteminde MIL-1 sahip olduğu üstünlüklerden dolayı ekstraksiyon çözücüsü olarak seçildi.

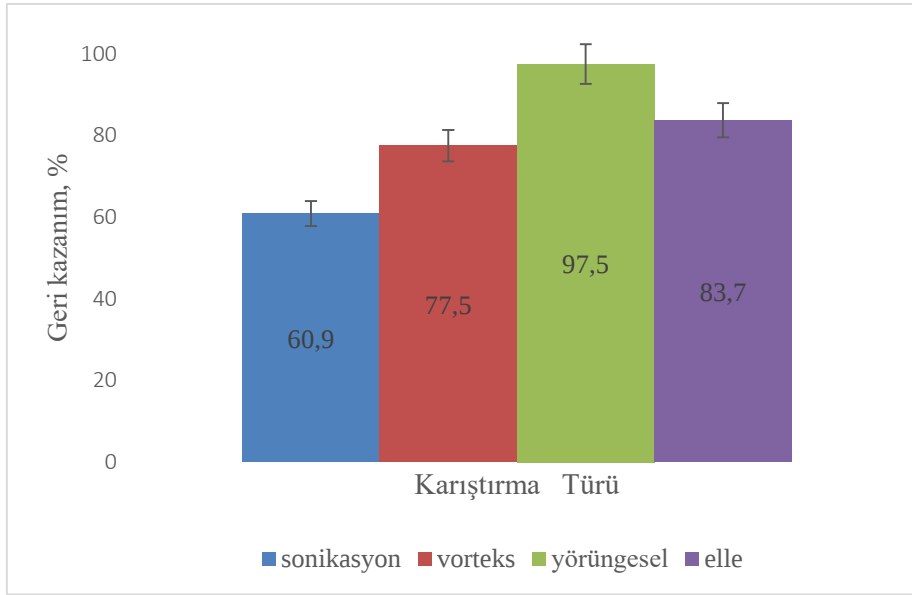


Şekil 3.1 Ekstraksiyon çözücüsünün kurkumin geri kazanımı üzerine etkisi

3.1.2. Karıştırma türünün seçimi

Etkili faz ayrımı ve dolayısıyla kabul edilebilir analitik sonuçlar sağlamak için ekstraksiyon çözücüsünün numune çözeltisine etkili bir şekilde dağıtılması gereklidir. Bu olguyu gerçekleştirmek için ısıtma, çalkalama ve mikrodalga fırın gibi fiziksel etkileşimler uygulanmaktadır. Bu çalışmada ekstraksiyon çözücüsünün manyetik özellikler içeren iyonik bir sıvı olması nedeniyle uygun bir karıştırma adımı ile etkin faz ayrımının sağlanması amaçlandı. Bu kapsamda örnek çözeltiye $[\text{Co}(\text{C}_8\text{IM})_4^{2+}]_2[\text{Cl}^-]$ MIL-1 eklendikten sonra sonikasyon, elle karıştırma, vorteks ve yörüngesel çalkalama uygulanarak kurkuminin E.R%'sine etkileri test edildi. Her karıştırma adımından elde edilen kurkuminin E.R yüzdesi Şekil 3.2'de verilmiştir.

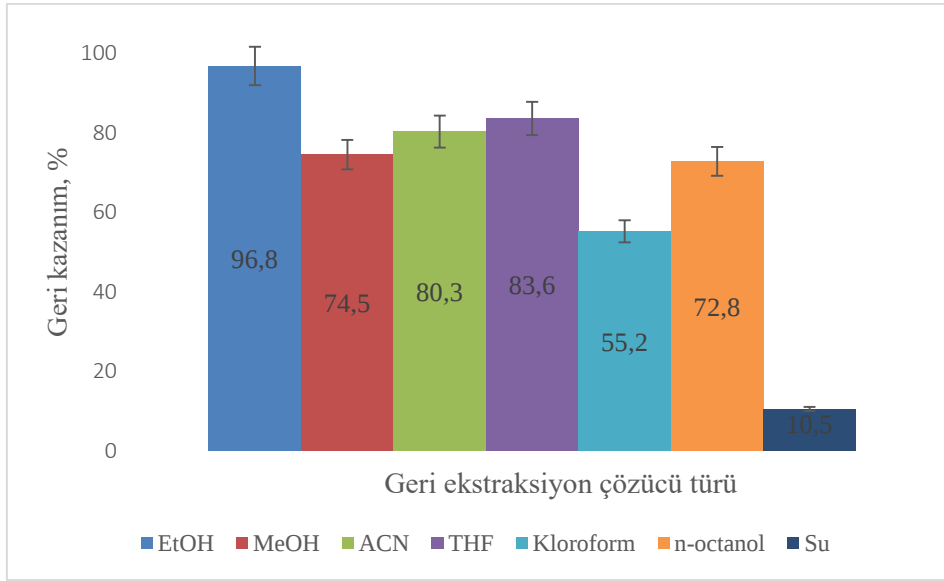
Karşılık gelen sonuçlar sonikasyon, yörüngesel çalkalama, vorteks ve elle karıştırma için kurkuminin yüzde E.R'si sırasıyla %50,9, %97,5, %75,5 ve %83,7'dir. Bu sonuçlara dayanarak, sonraki çalışmalarda $[\text{Co}(\text{C}_8\text{IM})_4^{2+}]_2[\text{Cl}^-]$ MIL-1'in örnek çözeltide etkili bir şekilde dağılmasını sağlamak için yörüngesel çalkalama uygulandı.



Şekil 3.2 Karıştırma türünün kurkumin geri kazanımına etkisi

3.1.3. Geri ekstraksiyon çözücüsünün seçimi

Kurkumin içeren $[\text{Co}(\text{C}_8\text{IM})_4^{2+}]_2[\text{Cl}^-]$ MIL-1 güçlü bir mıknatıs kullanılarak örnek çözeltiden ayrıldıktan sonra, $[\text{Co}(\text{C}_8\text{IM})_4^{2+}]_2[\text{Cl}^-]$ MIL-1 içerisinde bir çok miktarda kabarcık oluştu. Bu durum spektrofotometrik ölçümde ışının kırılması, saçılması gibi istenmeyen olaylara sebebiyet verdiği için hatalı absorbands değerleri ölçülür. Bu sorunların üstesinden gelmek için kurkuminin $[\text{Co}(\text{C}_8\text{IM})_4^{2+}]_2[\text{Cl}^-]$ MIL-1'den geri ekstraksiyonu gereklidir. Bu amaçla, $[\text{Co}(\text{C}_8\text{IM})_4^{2+}]_2[\text{Cl}^-]$ MIL-1'e EtOH, MeOH, ACN, THF, kloroform, n-oktanol ve su gibi farklı geri ekstraksiyon çözücüleri ilave edildi ve bu çözücülerin kurkuminin ekstraksiyon geri kazanımına etkileri araştırıldı. Tüm çözücüler eşit hacimlerde ($150\mu\text{L}$) test edildi. Her ekstraksiyon çözücüsü için kurkuminin % E.R'si Şekil 3.3'te sunuldu. Kurkuminin en yüksek (%96,8) ve en düşük (%10,5) E.R %'si sırasıyla etanol ve su kullanılarak elde edildi. Su kullanıldığında, kurkuminin $[\text{Co}(\text{C}_8\text{IM})_4^{2+}][\text{Cl}^-]$ MIL-1'den nicel geri ekstraksiyonu gerçekleşmedi. Bu durum beklenen sonuca paraleldi. Eğer su kantitatif E.R%'yi sağlamış olsaydı, kurkuminin $[\text{Co}(\text{C}_8\text{IM})_4^{2+}]_2[\text{Cl}^-]$ MIL-1'e ekstraksiyonu DLLME çalışmasının ilk aşamasında gerçekleşmezdi. Elde edilen bu sonuçların ışığında, geri ekstraksiyon çözücüsü olarak etanol seçildi.



Şekil 3.3 Geri ekstraksiyon çözücü türünün kurkuminin ekstraksiyon geri kazanımına etkisi

3.2. CCD Modelleme

Ön deneyler sonucunda, MIL-1 miktarı, pH, geri ekstraksiyon çözücü hacmi ve yörüngesel çalkalama süresi gibi seçilmiş temel faktörlerin optimizasyonu için CCD modellenmesi oluşturuldu. CCD modellemenin ekstraksiyon deneyleri Çizelge 3.1’te verilmiştir. Ekstraksiyon deneyleri sonucunda kurkuminin E.R%'si CCD modellenmesine girildi ve istatistiksel değerlendirmeler aşağıdaki gibi yapıldı.

Çizelge 3.1 CCD’de yer alan deney sayısı ve kurkuminin ekstraksiyon geri kazanımı

Ekstraksiyon sayısı	X (mg)	Y	Z (µL)	T (dk)	E.R, % (Deneysel)	E.R, % (Tahmin)
1	-1	-1	-1	-1	90,10	90,33
2	1	-1	-1	1	84,20	84,58
3	+α	0	0	0	72,60	72,31
4	1	1	1	-1	83,60	83,49
5	0	0	0	0	74,60	75,44
6	0	0	0	0	75,90	75,44
7	0	0	+α	0	92,10	91,95
8	-1	-1	1	1	84,20	84,69
9	1	-1	1	-1	65,90	66,46
10	0	0	0	0	74,90	75,44
11	-1	-1	-1	1	86,30	85,78
12	-1	1	-1	1	73,50	73,54
13	0	+α	0	0	72,80	72,47
14	-1	1	1	-1	87,30	87,52
15	-α	0	0	0	75,10	75,45
16	0	0	0	0	75,90	75,44
17	0	0	-α	0	93,30	93,52
18	0	0	0	+α	75,10	75,04
19	0	0	0	-α	74,00	74,12
20	0	0	0	0	76,20	75,44
21	-1	1	1	1	81,10	80,92
22	1	1	-1	1	76,00	76,01
23	0	-α	0	0	69,20	69,59
24	1	-1	1	1	90,20	89,66
25	-1	1	-1	-1	95,30	95,22
26	1	1	-1	-1	84,90	85,01
27	1	-1	-1	-1	76,90	76,45
28	1	1	1	1	89,20	89,57
29	0	0	0	0	75,30	75,44
30	-1	-1	1	-1	74,80	74,16

3.2.1. ANOVA verileri

Faktörlere bağlı olarak elde edilen sonuçların güvenilirliği ve geçerliliği ANOVA analizi ile değerlendirildi. Öncelikle istatistiksel modellemede, faktörlerin doğrusal, ikili ve karesel etkileşimleri sonuçlara katkıda bulunduğu için bu faktörlerin sonuçlar üzerindeki etkisinin karesel olması istenmektedir. Çizelge 3.2, CCD modelinin doğrusal, 2FI, karesel ve kübik etkileşimler arasında karesel olduğunu gösterdi. Modelin anlamlı olabilmesi için p-değerinin 0,05’ten küçük olması gerekmektedir. Ayrıca belirsiz hataların bir ölçüsü olan Lack of fit p-değerinin 0,05’ten büyük olması gerekmektedir. Çünkü istatistiksel değerlendirmede belirsiz hataların sonuçlar üzerindeki etkisinin anlamsız olması gerekmektedir. Yöntemin kalite parametrelerinin (R^2 , düzeltilmiş- R^2 ve tahmin edilen- R^2) 1’e yakın olması, elde

edilen sonuçlar ile CCD modelinin öngördüğü değerler arasındaki yüksek korelasyonu gösterdi. Kalite parametrelerinin değerlendirilmesinde bir diğer ölçüt ise düzeltilmiş- R^2 ile tahmin edilen- R^2 arasındaki farkın 0,2'den küçük olmasıdır. Çizelge 3.2'deki sonuçlar, yukarıdaki açıklamalarla birlikte değerlendirildiğinde modelin ikinci dereceden uyum sağladığını desteklemektedir. R^2 değerlerinin kabul edilebilirliği, Şekil 3.4 'deki deneysel E.R% ile CCD 'nin öngördüğü E.R% arasındaki yüksek uyumla doğrulandı. Kurkumin ekstraksiyonu için CCD modellemesi ile optimize edilen OS-MIL-DLLME yöntemi, CCD'nin p-değerinin 0,05'ten küçük olması nedeniyle önemliydi. Ayrıca kurkumin ekstraksiyonu üzerindeki temel faktörlerin doğrusal, ikili ve karesel etkileşimlerinin p-değerleri de 0,05'ten küçük olması da dikkat çekicidir. Faktörlerin kurkumin ekstraksiyonu üzerindeki etkisi F-değerleri ile değerlendirilmektedir. F-değeri sayısal olarak arttıkça kurkumin ekstraksiyonuna katkısı da artar. Çizelge 3.3'deki sonuçlara göre kurkumin ekstraksiyonuna en çok katkıda bulunan doğrusal, ikili ve karesel etkileşimler sırasıyla X (F-değeri = 102,2), YT (F-değeri = 927,8) ve Z2 (F-değeri = 2364,7) oldu. Sonuç olarak, CCD modellemesi, aşağıdaki ikinci dereceden denkleme göre kurkuminin E.R% üzerindeki temel faktörlerin etkisini açıkladı.

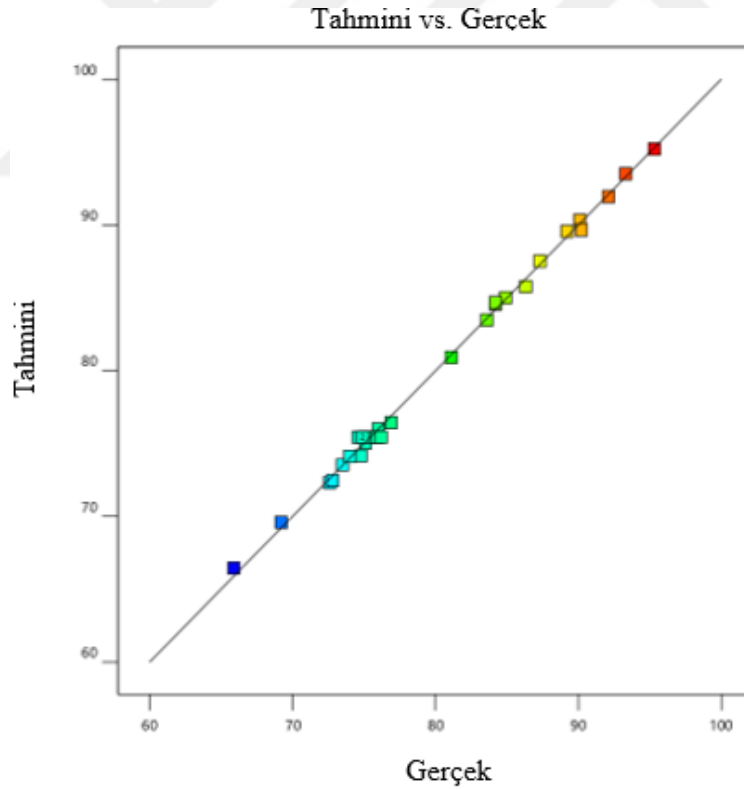
$$E.R, \% = 75,4 - 1,3X + 1,2Y - 0,65Z + 0,38T + 0,92XY + 1,5XZ + 3,2XT + 2,1YZ - 4,3 YT + 3,8ZT - 1,1X^2 - 3,1Y^2 + 12,1Z^2 - 0,59T^2$$

Çizelge 3.2 OS-MIL-DLLME yönteminde CCD' nin uyum özeti

Kaynak	Sıralı p-değeri	Lack of Fit p-değeri	Lack of Fit F-değeri	R^2	Düzeltilmiş R^2	Tahmini R^2
Doğrusal	0,8990	<0,0001	207,19	0,0404	0,1132	0,4586
2FI	0,0333	<0,0001	153,25	0,5026	0,2408	0,0012
Karesel	<0,0001	0,7198	0,6774	0,9973	0,9947	0,9873
Kübik	0,9429	0,2461	1,88	0,9980	0,9916	0,7937

Çizelge 3.3 CCD modelleme için faktörlerin ANOVA sonuçları

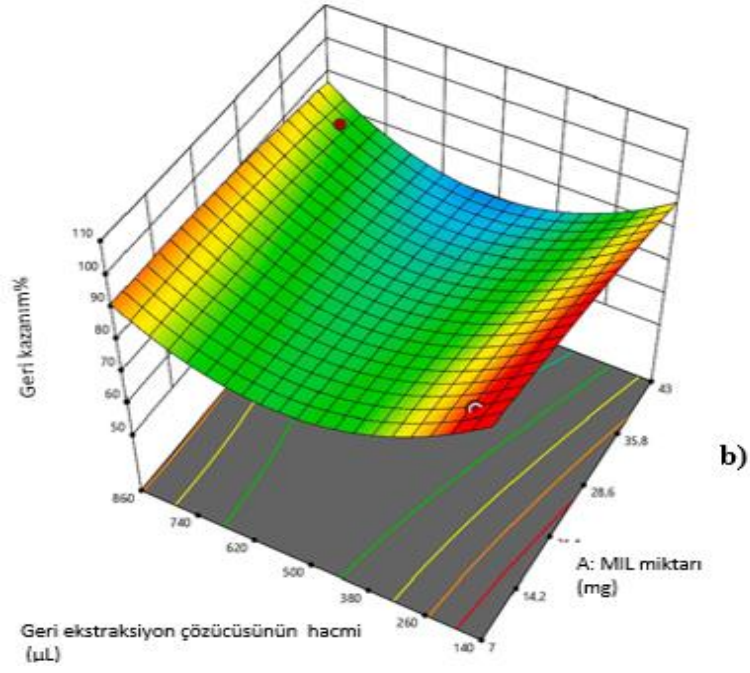
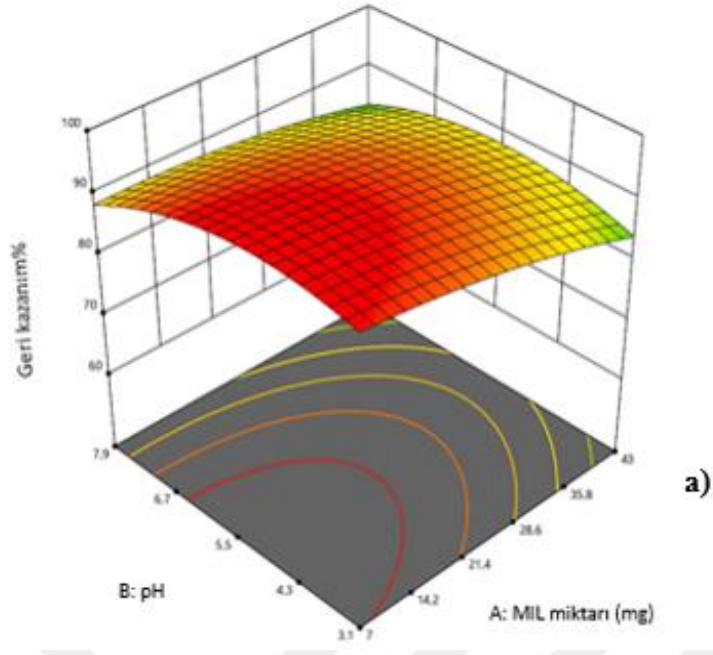
Kaynak	F-değeri	p-değeri
Model	392,3	< 0,0001
X-MIL miktarı	102,2	< 0,0001
Y-pH	85,7	< 0,0001
Z- Geri ekstraksiyon çözücü hacmi	25,5	0,0001
T-Yörüngesel çalkalama süresi	8,7	0,0098
XY	42,7	< 0,0001
XZ	120,6	< 0,0001
XT	508,3	< 0,0001
YZ	227,2	< 0,0001
YT	927,8	< 0,0001
ZT	718,9	< 0,0001
X ²	19,2	0,0005
Y ²	153,6	< 0,0001
Z ²	2364,7	< 0,0001
T ²	5,8	0,0294

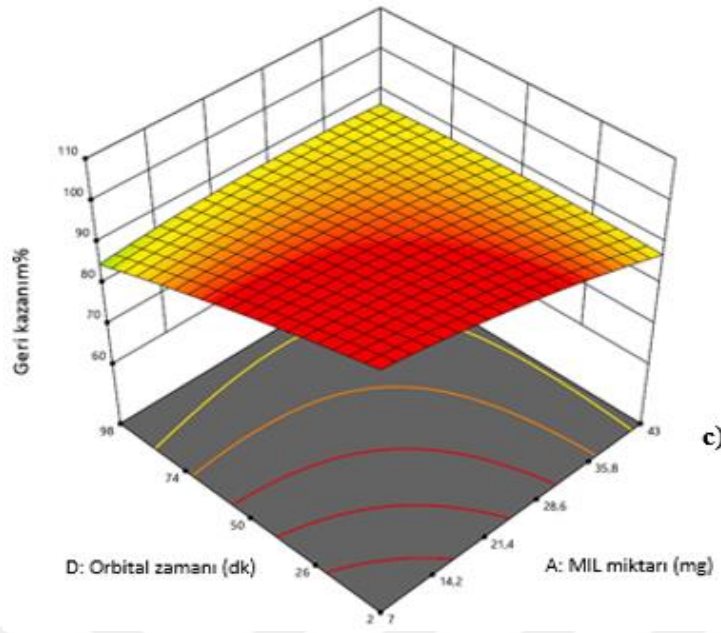


Şekil 3.4 CCD'den elde edilen sonuçların güvenilirliği

3.2.2. Yüzey yanıt grafikleri

Temel faktörlerin ikili etkileşimlerinin kurkuminin E.R%'si üzerindeki etkileri yüzey yanıt grafikleri çizilerek tartışıldı. pH ve MIL-1 miktarının kurkuminin E.R%'si üzerindeki etkisi Şekil 3.5 (a)'da verildi. Kurkuminin E.R%'si, MIL-1 miktarı 25 mg'ın üzerinde olduğunda hemen hemen tüm pH değerlerinde %80'in altındaydı. Öte yandan, MIL-1 miktarının 15 mg'ın altında olduğu durumlarda kurkuminin E.R%'si hemen hemen tüm pH'larda %90 civarındaydı. Bunun olası nedeni, MIL-1 miktarının artması nedeniyle son hacimdeki kurkumin konsantrasyonunun azalmasıdır. Geri ekstraksiyon çözücüsünün (EtOH) hacmi ile MIL-1 miktarı arasındaki etkileşimin kurkuminin E.R%'si üzerindeki etkisi Şekil 3.5 (b)'de sunuldu. Burada, EtOH, güçlü bir mıknaıtis kullanılarak sulu çözeltiden ayrılan MIL-1'den kurkumini elüe etmek için kullanıldı. Kurkuminin kantitatif E.R%'si, EtOH hacmi ve MIL-1 miktarı sırasıyla 140-280 µL ve 10-22 mg aralığında verildi. Şekil 3.5 (b)'deki sonuçlar, EtOH hacmi 250 µL'nin üzerinde olduğunda kurkuminin E.R%'sinin düşük veya yüksek MIL-1 miktarlarında azaldığını gösterdi. Bunun nedeni, elüent fazdaki kurkumin konsantrasyonunun EtOH hacmindeki artış nedeniyle azalmasıdır. Yörüngesel çalkalama süresi ve MIL-1 miktarının kurkuminin E.R%'si üzerindeki etkisi Şekil 3.5 (c)'de verildi. Yörüngesel çalkalama, numune çözeltisine eklenen MIL-1'in kurkumin ile etkileşimini artırmak ve buna bağlı olarak kurkuminin MIL fazına ekstraksiyonunu sağlamak için kullanıldı. Şekil 3.5 (c)'deki sonuçlar, kurkuminin kısa yörünge çalkalama sürelerinde (≤ 15 dakika) tüm MIL-1 miktarları için kantitatif olarak ekstrakte edildiğini gösterdi.

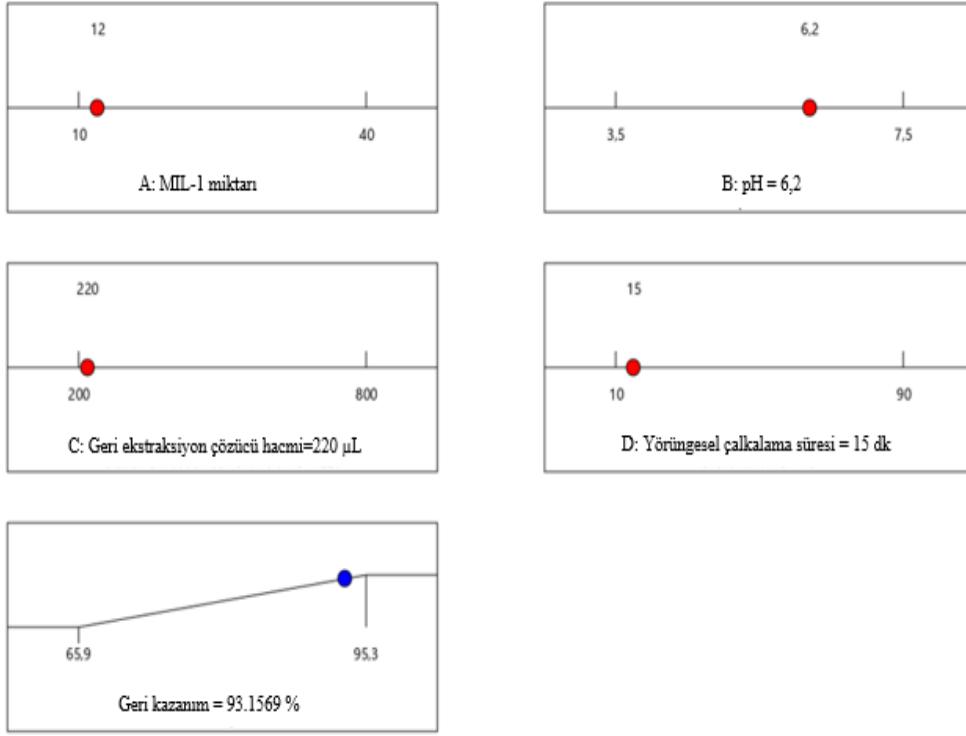




Şekil 3.5 (a-c) Kurkuminin CCD yüzey yanıt grafikleri: (a) pH-MIL-1 miktarı (mg);
(b) geri ekstraksiyon çözücüsünün hacmi (μ L)-MIL-1 miktarı (mg);
(c) yörüngesel(orbital) çalkalama süresi (dk)- MIL-1 miktarı (mg)

3.2.3. Optimum koşulların özeti

CCD modellemesi, %93,2 kurkumin geri kazanımı için MIL-1 miktarı, pH, EtOH hacmi ve yörüngesel çalkalama süresi dahil olmak üzere temel faktörlerin optimum değerlerini sırasıyla 12 mg, 6,2, 220 μ L ve 15 dakika olarak tahmin etti (Şekil 3.6). Bu temel faktör değerleri kullanılarak yapılan üç tekrarlı ekstraksiyon deneyinin sonucunda kurkuminin E.R%'si %92,8 olarak elde edildi. Bu sonuç, tahmini E.R% ile CCD'nin deneysel E.R%'si arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını gösterdi. Bu nedenlerden dolayı, bu koşullar sonraki çalışmalarda temel faktörler için optimum değerler olarak kullanıldı.



Şekil 3.6 Temel faktörlerin optimum değerleri ve bu değerler için kurkuminin tahmini geri kazanım yüzdesi

3.3. Yöntemin Analitik Özellikleri

3.3.1 Analitik performans

OS-MIL-DLLME yönteminin analitik performansı hem model çözeltiler hem de matris uyumlu çözeltiler için optimum koşullar altında belirlendi. Model çözeltilere yönelik yöntemin LR, LOD, LOQ ve EF'si sırasıyla $0,5\text{--}225\text{ ng mL}^{-1}$, $0,15\text{ ng mL}^{-1}$, $0,5\text{ ng mL}^{-1}$ ve 75 idi. 30 ng mL^{-1} kurkuminin beş tekrarlı ekstraksiyon çalışmasından elde edilen model çözeltiler için BSS ve ER sırasıyla %1,6 ve 98 ± 1 olarak bulundu. Matris uyumlu çözeltiler için OS-MIL-DLLME yönteminin LR, LOD, LOQ, EF, BSS ve ER'si sırasıyla $2\text{--}150\text{ ng mL}^{-1}$, $0,7\text{ ng mL}^{-1}$, $2,0\text{ ng mL}^{-1}$, 116, %1,9 ve 95 ± 3 'tür. Ayrıca yöntemin matris etkisi %7,6 olarak hesaplandı. Tüm Çizelge 3.4'te sunuldu.

Çizelge 3.4 Farklı kalibrasyon çözeltileri için OS-MIL-DLLME yönteminin analitik performansı

Kalibrasyon çözeltileri	LR, ng mL ⁻¹	R ²	LOD ng mL ⁻¹	LOQ ng mL ⁻¹	*BSS, %	EF	*ER, %	Matriks etkisi, %
Model çözelti	0.5-225	0.996	0.15	0.5	1.6	135	98±1	7.6
Matriks uyumlu	2-150	0.993	0.7	2.0	1.9	116	95±3	

* 30 ng mL⁻¹ kurkumin için, N=5

3.3.2. Sağlamlık

Sağlamlık, analitik yöntemde yapılan küçük değişikliklerin sonuçlar üzerindeki etkisini değerlendirmek için kullanılan bir doğrulama parametresidir. Bu çalışmada temel faktörlerin optimum değerlerinde küçük değişiklikler ($\pm 10\%$) yapılarak OS-MIL-DLLME yönteminin sağlamlığı araştırıldı. Sağlamlık çalışmalarının sonuçları Çizelge 3.5'te verildi. Kurkuminin geri kazanımı 93 ± 2 ila 97 ± 3 arasında değişti. Ek olarak en düşük ve en yüksek BSS'ler sırasıyla $1,4$ ve $2,2$ olarak hesaplandı. Bu sonuçlar, OS-MIL-DLLME yönteminin küçük değişikliklere karşı iyi bir direnç gösterdiğini ve dolayısıyla yüksek sağlamlığa sahip olduğunu gösterdi.

Çizelge 3.5 Optimum koşullardaki küçük farklılıkların OS-MIL-DLLME yönteminin sağlamlığı üzerindeki etkisi

Faktörler	Optimum değer	Değişen değer ($\pm 10\%$)	BSS %	Geri kazanım %
MIL-1 miktarı, mg	12	14	2,2	94 ± 3
		10	2,1	95 ± 2
PH	6,2	6,8	1,6	97 ± 3
		5,6	1,4	97 ± 4
Geri ekstraksiyon çözücü hacmi, μ L	200	220	1,8	93 ± 2
		180	1,7	94 ± 2
Yörüngesel çalkalama süresi	15	16,5	2,0	95 ± 1
		13,5	1,9	96 ± 3

3.3.3. Seçicilik

Yöntemin farklı türlerdeki hedef analiti belirleme yeteneği seçicilik olarak ifade edilir. Bu kapsamda model çözeltilere farklı (anyon, katyon ve moleküler) türler eklendi ve daha sonra bu karışıma kurkumin analizi için OS-MIL-DLLME yöntemi uygulandı. Kurkuminin BSS'si ve geri kazanımı, kurkuminin analitik sinyalinde $\pm$ %5'lik bir değişikliğe neden olan eklenen türlerin konsantrasyonunun varlığında hesaplandı. Seçicilik çalışmasının sonuçları Çizelge 3.6' da sunulmaktadır. Kantitatif geri kazanımlar (%91,2–99,5) ve düşük BSS'ler (%1,2–1,9), optimum koşulların ve seçilen ekstraksiyon reaktiflerinin kurkumin için yüksek seçiciliğe sahip olduğunu gösterdi. Araştırılan türlerin 40 ng mL⁻¹ kurkumin için tolerans derişimleri 15 mg L⁻¹ ile 8000 mg L⁻¹ arasında değişmektedir.

Çizelge 3.6 Farklı türlerin varlığında kurkuminin (40 ng mL⁻¹) için OS-MIL-DLLME yönteminin seçiciliği

Türler	Derişim (mg L ⁻¹)	Geri kazanım %	BSS %
K(I)	8000	99,5	1,3
Na(I)	800	99,2	1,2
F(I)	400	98,4	1,7
SO ₄ (II)	400	98,6	1,6
Se(IV)	250	97,2	1,2
Ni(II)	250	97,1	1,3
Mn(II)	250	96,6	1,9
Zn(II)	175	96,2	1,6
Fe(III)	125	96,7	1,8
Askorbik asit	75	95,2	1,7
Rutin	75	94,0	1,3
Cu(II)	50	94,8	1,7
Gallik asit	50	93,9	1,5
Kuersetin	25	92,7	1,8
Melamin	15	91,2	1,5
Vanilin	15	91,6	1,9

3.3.4. Gün içi/günlerarası deneyler

Yöntemin kesinliği gün içi/günler arası çalışmalarla test edildi. Bu çalışmalarda matriks uyumlu çözeltilere üç farklı standart derişimlerde (10, 40 ve 120 ng mL⁻¹) kurkumin eklendi. Daha sonra gün içi çalışmada hazırlanan çözeltilere günde beş kez OS-MIL-DLLME yöntemi uygulandı. Günler arası çalışmada OS-MIL-DLLME yöntemi aynı çözeltilere art arda beş gün boyunca beş kez uygulandı. Bu çalışmalarda eklenen her kurkumin konsantrasyonu için BSS ve hata hesaplandı. Gün içi çalışmada BSS ve hata sırasıyla %1,4–1,9 ve %-1,5–2,2, günler arası çalışmalarda ise BSS ve hata sırasıyla %1,7–2,2 ve %2,9–4,3 aralığındaydı. Her iki çalışmada da BSS değerlerinin %5'in altında olması OS-MIL-DLLME yönteminin iyi bir hassasiyete sahip olduğunu destekledi. Ayrıntılı sonuçlar için lütfen Çizelge 3.7'ye bakınız.

Çizelge 3.7 OS-MIL-DLLME yönteminin gün içi ve günler arası deneyleri

Test	Eklenen ng mL ⁻¹	Hata, %	BSS, %
Gün içi (N=5)	10	-1.5	1.4
	40	-1.9	1.9
	120	-2.2	1.6
Günler arası (N=5x5)	10	-2.9	1.7
	40	-3.7	2.2
	120	-4.3	1.9

3.3.5. Geri kazanım testleri

OS-MIL-DLLME yönteminin doğruluğu geri kazanım testleri ile araştırıldı. Bu çalışmada, gıdalara ve bitkisel takviye ürünlerine kurkuminin standart çözeltileri (10 ve 80 ng mL⁻¹) ilave edildi. Daha sonra elde edilen karışıma OS-MIL-DLLME yöntemi uygulanarak eklenen kurkumin derişimlerinin geri kazanım değerleri hesaplandı. Elde edilen geri kazanım sonuçları Çizelge 3.8'de verildi. Kompleks matriks içeren gıda ve bitkisel ürünlerde kurkuminin geri kazanımı %90 ± 5 ila %98 ± 3 arasında değişmektedir. Kantitatif geri kazanım, OS-MIL-DLLME yönteminin doğruluğunu ortaya koymaktadır.

Çizelge 3.8 OS-MIL-DLLME yönteminin gerçek numuneler üzerindeki geri kazanım sonuçları

Örnekler	Eklenen, ng mL ⁻¹	Geri kazanım, %
Aromatik gıda takviyesi	10	94 ±3
	80	96 ±4
Bitkisel gıda takviyesi	10	97 ±2
	80	98±3
Zerdeçal tozu	10	92 ±4
	80	95 ±2
Zerdeçal özü	10	91 ±3
	80	93 ±4
Zerdeçal yağı	10	94 ±3
	80	97 ±2
Bitkisel karışım macunu	10	90 ±5
	80	93 ±4
Zerdeçal içeren bitki çayı	10	94 ±3
	80	97 ±1
Siyah çay	10	90 ±5
	80	92 ±4
Yeşil çay	10	93 ±4

3.3.6. Gerçek numunelerin analizi

Kapsamlı doğrulama parametrelerinin doğrulanması tamamlandıktan sonra Bölüm 2.3'teki prosedüre göre hazırlanan gerçek örneklerle OS-MIL-DLLME yöntemi uygulandı. OS-MIL-DLLME yöntemi ile elde edilen sonuçların güvenilirliğinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi amacıyla hazırlanan örnekler referans yöntemle eş zamanlı olarak analiz edildi [49]. Referans yöntemi aşağıdaki deneysel adımları içerir. Öncelikle 3×10^{-6} mol L⁻¹ kurkumin içeren 10 mL örnek çözelti 50 mL konik tüplere aktarıldı. Daha sonra numune çözeltisinin pH'ı 3'e ayarlandı ve elde edilen karışıma 300 µL sikloheksilamin ve 3 g sodyum klorür ilave edildi. Elde edilen karışım 3 dakika vortekslendikten ve 10 dakika santrifüj edildikten sonra ekstraksiyon fazı bir şırınga kullanılarak sulu fazdan ayrıldı. Son aşamada ekstraksiyon fazının hacmi metil alkol ile 500 µL'ye tamamlandı ve çözelti UV-vis spektrofotometre (500 nm'de) kullanılarak analiz edildi. Her iki yöntemden elde edilen sonuçlar Çizelge 3.9'da sunuldu. Sonuçların istatistiksel değerlendirilmesinde t-testi kullanıldı. Dört serbestlik derecesi için %95 güven seviyesinde istatistiksel t değeri 2,78'dir. Her iki yöntemden elde edilen analitik sonuçlar ve standart sapmalar

kullanılarak hesaplanan t-deneysel değerin (t-exp), istatistiksel t-değerinden küçük olması, sonuçlar arasında anlamlı bir fark olmadığını göstermektedir. Örneklerin analizinden elde edilen t-exp değerleri 0,92 ile 1,62 arasında değişmektedir. Bu değerler OS-MIL-DLLME yöntemiyle elde edilen sonuçların güvenilirliğini desteklemektedir. Gıda ve bitkisel takviye ürünlerindeki kurkumin seviyeleri $4,8 \pm 0,7 \mu\text{g g}^{-1}$ (köri) ile $145,2 \pm 7,8 \mu\text{g g}^{-1}$ (zerdeçal tozu) arasında değişmektedir. Elde edilen veriler OS-MIL-DLLME yönteminin karmaşık matrislere başarıyla uygulanabileceğini gösterdi.

Çizelge 3.9 Gerçek örneklerin OS-MIL-DLLME yöntemi ve referans yöntemle analizi (N=5, p=0,05, t-tablo=2,78).

Örnekler	Geliştirilen yöntem, $\mu\text{g g}^{-1}$	Referans yöntemi, $\mu\text{g g}^{-1}$	t-exp
Zerdeçal tozu	$145,2 \pm 7,8$	$140,4 \pm 7,6$	1,38
Zerdeçal özü	$105,7 \pm 4,8$	$108,1 \pm 5,2$	1,12
Zerdeçal yağı	$85,3 \pm 4,9$	$83,3 \pm 4,6$	0,92
Aromatik gıda takviyesi	$74,1 \pm 3,8$	$76,0 \pm 3,3$	1,19
Bitkisel gıda takviyesi	$66,3 \pm 3,1$	$64,7 \pm 3,8$	1,15
Zerdeçal içeren bitki çayı	$62,9 \pm 3,3$	$65,3 \pm 3,0$	1,62
Bitkisel karışım macunu	$34,7 \pm 2,4$	$36,0 \pm 2,2$	1,22
Seylan çayı	$28,9 \pm 2,5$	$27,8 \pm 2,5$	0,99
Yeşil çay	$21,5 \pm 1,7$	$20,9 \pm 1,9$	0,79
Siyah çay	$16,6 \pm 1,2$	$15,8 \pm 1,4$	1,49
Tarçın	$9,4 \pm 1,1$	$9,9 \pm 1,0$	1,02
Köri	$4,8 \pm 0,7$	$5,2 \pm 0,9$	1,28

3.4. Analitik verilerin karşılaştırılması

OS-MIL-DLLME yönteminin önemli analitik verileri literatürde bildirilen farklı mikroekstraksiyon yöntemleriyle karşılaştırıldı. Karşılaştırma sonuçları Çizelge 3.10'da sunuldu. Karşılaştırılan yöntemlerde ekstraksiyon çözücüsü olarak DES, SUPRAS ve iyonik sıvı, fiziksel karıştırma yöntemi olarak ise vorteks ve sonikasyon kullanıldı. Yöntemin doğrusal aralığı diğer yöntemlerle karşılaştırılabilir düzeyde bulundu. Karşılaştırılan yöntemlerin LOD'si $0,51 \text{ ng mL}^{-1}$ ile $2,86 \text{ ng mL}^{-1}$ aralığında değişmektedir. LOD sonuçları, OS-MIL-DLLME yönteminin LOD'sinin ($0,15 \text{ ng mL}^{-1}$) en düşük olduğunu gösterdi. Karşılaştırılan yöntemlerin EF'si 12,5-167 aralığındaydı. Bu bağlamda OS-MIL-DLLME yönteminin EF'si (75) tüm yöntemler arasında ikinci en yüksek değerdir. Karşılaştırılan yöntemlerin BSS'si %1,8 ile %8,5 aralığında değişmektedir. Bu sonuçlara göre OS-MIL-DLLME yönteminin BSS'sinin (%1,6) düşük olması dikkat çekicidir. Tüm bu sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde OS-MIL-DLLME yönteminin bildirilen yöntemlere göre daha iyi analitik veri sağladığı açıkça görülmektedir.

Çizelge 3.10 OS-MIL-DLLME yönteminin analitik verilerinin diğer yöntemlerle karşılaştırılması.

Analitik metod	Örnek	LR,ng mL ⁻¹	LOD, ng mL ⁻¹	EF	RSD, %	Ref.
¹ SS-HLPME/UV-Vis	Gıdalar	3-300	1,44	20	3,6	[49]
² VA-DES-ELLME/UV-Vis	Yiyecekler ve bitkisel çay örnekleri	9-920	2,86	12,5	1,8	[50]
³ UA-RAS-LPME/UV-Vis	Gıdalar	0,074-12,5	5,3	50	2,2	[51]
⁴ UA-IL-DLLME/UV-Vis	Gıdalar	0-5000	0,51	167	4,1	[52]
⁵ RS-DES/DLLME/UV-Vis	Su ve yiyecekler	35-500	10	40	6,4	[53]
⁶ SMS-LLME-SDIC	Gıdalar	0,6-25	0,9	-	8,5	[54]
OS-MIL-DLLME/UV-Vis	Gıdalar ve bitkisel takviye ürünleri	0,5-225	0,15	75	1,6	Bu çalışma

¹Tuz destekli homojen sıvı faz mikroekstraksiyonu, ²Vorteks destekli derin ötektik çözücü emülsifikasyon sıvı-sıvı mikroekstraksiyonu, ³Ultrasonik destekli kısıtlı erişimli supramoleküler çözücü bazlı sıvı faz mikroekstraksiyonu, ⁴Ultrason destekli iyonik sıvı-dağıtıcı sıvı-sıvı mikroekstraksiyonu, ⁵Yeniden kullanılabilir ve değiştirilebilir DES bazlı dağıtıcı sıvı-sıvı mikroekstraksiyonu, ⁶Akıllı telefon dijital görüntü kolorimetrisi ile takip edilen supramoleküler çözücü-sıvı-sıvı mikroekstraksiyonu.

3.5. Geliştirilen Yöntemin Yeşil Profili

OS-MIL-DLLME yönteminin yeşil profili, Analitik Yeşillik Metriği (AGREE) kullanılarak ölçüldü. AGREE bu ölçümde temel olarak 12 kriteri değerlendirmektedir. Bu kriterler kısaca şu şekildedir: (1) analitik tekniklerin doğrudan kullanılması, (2) numune miktarı ve sayısının azaltılması, (3) yerinde ölçümün yapılabilirliği, (4) analitik süreçlerin entegrasyonu, (5) yöntemin otomasyonu ve minyatürleştirilmesi. (6) türevlendirmenin önlenmesi, (7) analitik atık oluşumunun önlenmesi, (8) yöntem kapsamında çok sayıda analit ve parametrenin kullanılabilmesi, (9) kullanılan enerjinin en aza indirilmesi, (10) yenilenebilir kaynaklı reaktiflerin kullanılması, (11) toksik reaktiflerin azaltılması ve (12) operatör güvenliğinin sağlanması. OS-MIL-DLLME yönteminin ilgili kriterlere göre aldığı puanlar şu şekildedir; ilk kriter 0,3 puana, ikinci kriter 0,32 puana, beşinci kriter 0,75 puana, yedinci kriter 0,91 puana, sekizinci kriter 0,68 puana, onuncu kriter 0,5 puana ve on ikinci kriter 0,8 puana karşılık gelir. Ayrıca yöntem üçüncü, dördüncü, altıncı, dokuzuncu ve onbirinci kriterlerden 1 ile en yüksek puanı aldı. Bu on iki kriterin birlikte değerlendirilmesiyle elde edilen genel puan OS-MIL-DLLME yöntemi için 0,77'dir. Genel kabule göre “yeşillik” kriteri olarak genel puanın 0,60'ın üzerinde olması gerekmektedir. Bu bağlamda OS-MIL-DLLME yönteminin yeşil bir profile sahip olduğu aşikardır. AGREE sonuçları Şekil 3.7'de verildi.



Şekil 3.7 Geliştirilen yöntemin AGREE puanı

4 . SONUÇLAR

Bu tez çalışması, bitkisel gıda takviyesi, zerdeçal tozu, zerdeçal ekstraktı, zerdeçal yağı, bitkisel karışım macunu, seylan çayı, zerdeçal içeren bitkisel çay, siyah çay, yeşil çay, tarçın ve köriden kurkuminin seçici, hassas ve hızlı ekstraksiyonu için farklı çözücülerin araştırılmasına odaklanmaktadır. Yüzey aktif maddeler, DES, SUPRAS ve MIL'ler kurkumin için ekstraksiyon çözücüsü olarak test edildi. En iyi ekstraksiyon adımı, $[\text{Co}(\text{C}_8\text{IM})_4^{2+}]_2[\text{Cl}^-]$ MIL kullanılarak elde edildi. Ekstraksiyona etki eden temel faktörler merkezi kompozit tasarımı kullanılarak optimize edildi. Ekstraksiyon fazındaki kurkumin miktarı, 425 nm'de bir UV-Vis spektrofotometre kullanılarak belirlendi. Ekstraksiyon kapsamındaki dispersiyon işlemi yörüngesel çalkalama ile gerçekleştirildi. Kurkumin içeren MIL'in örnek çözeltiden ayrılması için güçlü bir mıknatıs kullanıldı. Yöntemin analitik özellikleri hem model çözeltiler hem de matriks uyumlu çözeltiler için ayrı ayrı incelendi. OS-MIL-DLLME yönteminin yeşil analitik profili AGREE aracı kullanılarak 0,77 olarak hesaplandı ve bu değer yöntemin yeşilliğini doğruladı. OS-MIL-DLLME yöntemi kurkumin için eser düzeyde LOD ve LOQ sundu. OS-MIL-DLLME yöntemi iyi bir doğrusallık ($0,5\text{--}225 \text{ ng mL}^{-1}$) ve iyi bir doğruluğun ($90 \pm \%5 - \%98 \pm \%3$ aralığında geri kazanımlar) yanı sıra düşük hassasiyet ($\text{BSS} \leq \%1,6$) sergiledi. Ayrıca geliştirilen OS-MIL-DLLME yöntemi, matriks türlerinin etkili bir şekilde ayrılması yoluyla yöntemin seçiciliğini önemli ölçüde arttırdı. Bu mevcut tez çalışması, kurkumin analizi için farklı ekstraksiyon çözücülerinin eş zamanlı olarak araştırıldığı ilk çalışmadır. OS-MIL-DLLME yöntemi, çeşitli numunelerdeki düşük kurkumin seviyelerinin ekstraksiyonu ve tayini için çeşitli örneklerle yüksek güvenilirlikle uygulanabilir.

KAYNAKLAR

- [1] **Gürmen, M.** (2019). Farklı örneklerde bulunan Kurkumin'in tuz destekli homojen sıvı faz mikroekstraksiyonu yöntemiyle ayrılması ve zenginleştirilmesi. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı* (Yüksek Lisans Tezi), 4s, Kayseri.
- [2] **Busquets, S., Carbó, N., Almendro, V., Quiles, M. T., López-Soriano, F. J., & Argilés, J. M.** (2001). Curcumin, a natural product present in turmeric, decreases tumor growth but does not behave as an anticachectic compound in a rat model. *Cancer letters*, 167(1), 33-38.
- [3] **Urošević, M., Nikolić, L., Gajić, I., Nikolić, V., Dinić, A., & Miljković, V.** (2022). Curcumin: Biological activities and modern pharmaceutical forms. *Antibiotics*, 11(2), 135.
- [4] **Nair, D. S., Krishnakumar, K., & Krishnan, B.** (2017). Pharmacological profile of curcumin: A review. *J. Bio Innovation*, 6(4), 533-541.
- [5] **Lestari, M. L., & Indrayanto, G.** (2014). Curcumin. Profiles of drug substances, excipients and related methodology, 39, 113-204.
- [6] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Curcumin>, alındığı tarih: 25.05.2024
- [7] **Lee, W. H., Loo, C. Y., Bebawy, M., Luk, F., Mason, R. S., & Rohanizadeh, R.** (2013). Curcumin and its derivatives: their application in neuropharmacology and neuroscience in the 21st century. *Current neuropharmacology*, 11(4), 338-378.
- [8] **Yang, H., Du, Z., Wang, W., Song, M., Sanidad, K., Sukamtoh, E., & Zhang, G.** (2017). Structure–activity relationship of curcumin: Role of the methoxy group in anti-inflammatory and anticolitis effects of curcumin. *Journal of agricultural and food chemistry*, 65(22), 4509-4515.
- [9] **Heger, M., van Golen, R. F., Broekgaarden, M., & Michel, M. C.** (2014). The molecular basis for the pharmacokinetics and pharmacodynamics of curcumin and its metabolites in relation to cancer. *Pharmacological reviews*, 66(1), 222-307.
- [10] **Samarghandian, S., Azimi-Nezhad, M., Farkhondeh, T., & Samini, F.** (2017). Anti-oxidative effects of curcumin on immobilization-induced oxidative stress in rat brain, liver and kidney. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 87, 223-229.

- [11] **Heger, M., van Golen, R. F., Broekgaarden, M., & Michel, M. C.** (2014). The molecular basis for the pharmacokinetics and pharmacodynamics of curcumin and its metabolites in relation to cancer. *Pharmacological reviews*, 66(1), 222-307.
- [12] **Chen, S., Wu, J., Tang, Q., Xu, C., Huang, Y., Huang, D., & Wang, S.** (2020). Nano-micelles based on hydroxyethyl starch-curcumin conjugates for improved stability, antioxidant and anticancer activity of curcumin. *Carbohydrate polymers*, 228, 115398.
- [13] **Jha, N. S., Mishra, S., Jha, S. K., & Surolia, A.** (2015). Antioxidant activity and electrochemical elucidation of the enigmatic redox behavior of curcumin and its structurally modified analogues. *Electrochimica Acta*, 151, 574-583.
- [14] **Ravindranath, V., & Chandrasekhara, N.** (1980). Absorption and tissue distribution of curcumin in rats. *Toxicology*, 16(3), 259-265.
- [15] **Sharma, R. A., McLelland, H. R., Hill, K. A., Ireson, C. R., Euden, S. A., Manson, M. M., ... & Steward, W. P.** (2001). Pharmacodynamic and pharmacokinetic study of oral Curcuma extract in patients with colorectal cancer. *Clinical Cancer Research*, 7(7), 1894-1900.
- [16] **Błasiak, J., Trzeciak, A., Małecka-Panas, E., Drzewoski, J., Iwanienko, T., Szumiel, I., & Wojewódzka, M.** (1999). DNA damage and repair in human lymphocytes and gastric mucosa cells exposed to chromium and curcumin. *Teratogenesis, carcinogenesis, and mutagenesis*, 19(1), 19-31.
- [17] **Greggi Antunes, L. M., Araújo, M. C. P., da Luz Dias, F., & Takahashi, C. S.** (1999). Modulatory effects of curcumin on the chromosomal damage induced by doxorubicin in Chinese hamster ovary cells. *Teratogenesis, carcinogenesis, and mutagenesis*, 19(1), 1-8.
- [18] **Gupta, B., & DN, P.** (1980). Mechanisms of curcumin induced gastric ulcer in rats.
- [19] **World Health Organization,** (1980). Central Food Technological Research Institute, Mysore, and National Institute of Nutrition, Hyderabad, India (1978), submitted to WHO by Chr. Hansens Lab., Copenhagen (as referred to by JECFA, 1982).
- [20] **EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS).** (2010). Scientific Opinion on the re-evaluation of curcumin (E 100) as a food additive. *EFSA journal*, 8(9), 1679.

- [21] **Jing, W., Wang, J., Kuipers, B., Bi, W., & Chen, D. D. Y.** (2021). Recent applications of graphene and graphene-based materials as sorbents in trace analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 137, 116212.
- [22] **Caleb, J., & Alshana, U.** (2021). Supramolecular solvent-liquid-liquid microextraction followed by smartphone digital image colorimetry for the determination of curcumin in food samples. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 21, 100424.
- [23] **Khorshidi, N., Rahimi, M., & Salimikia, I.** (2020). Application of aeration-assisted homogeneous liquid–liquid microextraction procedure using Box–Behnken design for determination of curcumin by HPLC. *Journal of separation science*, 43(13), 2513-2520.
- [24] **Yu, W., Wen, D., Cai, D., Zheng, J., Gan, H., Jiang, F., ... & Zhong, G.** (2019). Simultaneous determination of curcumin, tetrahydrocurcumin, quercetin, and paeoniflorin by UHPLC-MS/MS in rat plasma and its application to a pharmacokinetic study. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 172, 58-66.
- [25] **Yin, S. J., Wang, Y. L., Chen, H., Hu, G., Zheng, G. C., & Yang, F. Q.** (2020). Investigation on the Metabolism of Curcumin and Baicalein in Zebrafish by Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry Analysis. *Current Pharmaceutical Analysis*, 16(8), 1052-1058.
- [26] **Raril, C., Manjunatha, J. G., & Tigari, G.** (2020). Low-cost voltammetric sensor based on an anionic surfactant modified carbon nanocomposite material for the rapid determination of curcumin in natural food supplement. *Instrumentation Science & Technology*, 48(5), 561-582.
- [27] **Majumder, K. K., Sharma, J. B., Kumar, M., Bhatt, S., & Saini, V.** (2020). Development and validation of UV-Visible spectrophotometric method for the estimation of curcumin in bulk and pharmaceutical formulation. *Pharmacophores*, 10(1), 115-21.
- [28] **Kadam, P. V., Yadav, K. N., Bhingare, C. L., & Patil, M. J.** (2018). Standardization and quantification of curcumin from *Curcuma longa* extract using UV visible spectroscopy and HPLC. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(5), 1913-1918.
- [29] **Kadam, P. V., Bhingare, C. L., Nikam, R. Y., & Pawar, S. A.** (2013). Development and validation of UV Spectrophotometric method for the

- estimation of Curcumin in cream formulation. *Pharmaceutical methods*, 4(2), 43-45.
- [30] **Rapalli, V. K., Kaul, V., Gorantla, S., Waghule, T., Dubey, S. K., Pandey, M. M., & Singhvi, G.** (2020). UV Spectrophotometric method for characterization of curcumin loaded nanostructured lipid nanocarriers in simulated conditions: Method development, in-vitro and ex-vivo applications in topical delivery. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 224, 117392.
- [31] **Yücel, C.** (2022). Enrichment Of Residual Uv Filters In Environmental Samples By Microextraction Techniques Prior To Chromatographic Analysis. *Ege Üniversitesi Uygulamalı ve Doğa Bilimler Enstitüsü* (Doktora Tezi), 14s, İzmir.
- [32] **Armenta, S., Garrigues, S., Esteve-Turrillas, F. A., de la Guardia, M.** (2019). Green extraction techniques in green analytical chemistry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 116, 248-253.
- [33] **Altunay, N., Unal, Y., & Elik, A.** (2020). Towards green analysis of curcumin from tea, honey and spices: Extraction by deep eutectic solvent assisted emulsification liquid-liquid microextraction method based on response surface design. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 37(6), 869-881.
- [34] **Afshar Mogaddam, M. R., Jouyban, A., Nemati, M., Farajzadeh, M. A., & Marzi Khosrowshahi, E.** (2021). Application of curcumin as a green and new sorbent in deep eutectic solvent-based dispersive micro-solid phase extraction of several polycyclic aromatic hydrocarbons from honey samples prior to gas chromatography–mass spectrometry determination. *Journal of Separation Science*, 44(21), 4037-4047.
- [35] **Shokrollahi, A., & Hessampour, S.** (2021). Spectrophotometric Determination of Curcumin after Preconcentration by Ultrasonic Assisted Supramolecular Dispersive Liquid-liquid Microextraction based on Solidification of Floating Organic Drops using Taguchi Design Method. *Advanced Materials Letters*, 12(11), 1-8.
- [36] **Al-Nidawi, M., Ozalp, O., Alshana, U., & Soylak, M.** (2023). Synergistic cloud point microextraction prior to spectrophotometric determination of curcumin in food samples. *Analytical Letters*, 56(12), 1977-1988.

- [37] **Sajid, M.** (2022). Dispersive liquid-liquid microextraction: Evolution in design, application areas, and green aspects. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 152, 116636.
- [38] **Grau, J., Azorín, C., Benedé, J. L., Chisvert, A., & Salvador, A.** (2022). Use of green alternative solvents in dispersive liquid-liquid microextraction: A review. *Journal of Separation Science*, 45(1), 210-222.
- [39] **Abdelaziz, M.A., Mansour, F.R., Danielson, N.D.** (2021). A gadolinium-based magnetic ionic liquid for dispersive liquid-liquid microextraction, *Anal. Bioanal. Chem.* 413, 205–214.
- [40] **Yan, Q.T., Chen, M.C., Hsieh, M.M.** (2022). Ultrasensitive analysis of mirtazapine and its metabolites enantiomers in body fluids using ultrasound-enhanced and surfactant- assisted dispersive liquid-liquid microextraction followed by polymer-mediated stacking in capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 1678, 463328.
- [41] **Ragheb, E., Shamsipur, M., Jalali, F., Sadeghi, M., Babajani, N., Mafakheri, N.** (2021). Magnetic solid-phase extraction using metal-organic framework-based biosorbent followed by ligandless deep-eutectic solvent-ultrasounds-assisted dispersive liquid-liquid microextraction (DES-USA-DLLME) for preconcentration of mercury (II), *Microchem. J.* 166, 106209.
- [42] **Tuzen, M., Elik, A., Altunay, N.** (2021). Ultrasound-assisted supramolecular solvent dispersive liquid-liquid microextraction for preconcentration and determination of Cr (VI) in waters and total chromium in beverages and vegetables, *J. Mol. Liq.* 329 ,115556.
- [43] **Altunay, N.** (2021) Optimization of ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction of niacinamide in pharmaceutical and cosmetic samples using experimental design, *Microchem. J.* 170, 106659.
- [44] **Carabajal, M., Teglia, C.M., Cerutti, S., Culzoni, M.J., Goicoechea, H.J.** (2020). Applications of liquid-phase microextraction procedures to complex samples assisted by response surface methodology for optimization, *Microchem. J.* 152, 104436.
- [45] **Li, G., & Row, K. H.** (2019). Utilization of deep eutectic solvents in dispersive liquid-liquid micro-extraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 120, 115651

- [46] **Altunay, N., Elik, A., Gürkan, R.** (2020). Preparation and application of alcohol based deep eutectic solvents for extraction of curcumin in food samples prior to its spectrophotometric determination, *Food Chem.* 310, 125933.
- [47] **Trujillo-Rodríguez, M.J., Anderson, J.L.** (2019). In situ generation of hydrophobic magnetic ionic liquids in stir bar dispersive liquid-liquid microextraction coupled with headspace gas chromatography, *Talanta* 196 ,420–428.
- [48] **Yu, H., Merib, J., Anderson, J.L.** (2016). Faster dispersive liquid-liquid microextraction methods using magnetic ionic liquids as solvents, *J. Chromatogr. A* 1463
- [49] **Gürmen, K., Şahin, U., Yılmaz, E., Soylak, M., Şahan, S.** (2023). Determination of curcumin in food with homogenous liquid-phase microextraction preconcentration and spectrophotometric determination. *Analytical Letters*, 56(5), 807-815.
- [50] **Aydin, F., Yilmaz, E., Soylak, M.** (2018). Vortex assisted deep eutectic solvent (DES)-emulsification liquid-liquid microextraction of trace curcumin in food and herbal tea samples. *Food chemistry*, 243, 442-447.
- [51] **Menghwar, P., Yilmaz, E., Soylak, M.** (2018). Development of an ultrasonic-assisted restricted access supramolecular solvent-based liquid phase microextraction (UA-RAS-LPME) method for separation-preconcentration and UV-VIS spectrophotometric detection of curcumin. *Separation Science and Technology*, 53(16), 2612-2621.
- [52] **Unsal, Y.E., Tuzen, M., Soylak, M.** (2019). Ultrasound-assisted ionic liquid-dispersive liquid–liquid of curcumin in food samples microextraction and its spectrophotometric determination. *Journal of AOAC International*, 102(1), 217-221.
- [53] **Salamat, Q., Soylak, M.** (2024). Novel reusable and switchable deep eutectic solvent for extraction and determination of curcumin in water and food samples. *Talanta*, 269 ,125401.
- [54] **Caleb, J., Alshana, U.** (2021). Supramolecular solvent-liquid-liquid microextraction followed by smartphone digital image colorimetry for the determination of curcumin in food samples. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 21, 100424.