

**ZENGİNLEŞTİRİLMİŞ GLİSİRİZİN EKSTRESİ ELDESİ VE
SAFLAŞTIRILMASI**

BORA KARAGÜL

DOKTORA TEZİ

DOĞAL, BİTKİSEL VE KOZMETİK ÜRÜNLER ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

PROF. DR. HALİL İBRAHİM UĞRAŞ

DÜZCE, 2023

T.C.
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

ZENGİNLEŞTİRİLMİŞ GLİSİRİZİN EKSTRESİ ELDESİ VE SAFLAŞTIRILMASI

Bora KARAGÜL tarafından hazırlanan tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından Düzce Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Doğal, Bitkisel ve Kozmetik Ürünler Anabilim Dalı'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Halil İbrahim UĞRAŞ
Düzce Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Halil İbrahim UĞRAŞ
Düzce Üniversitesi

Prof. Dr. Ertuğrul KAYA
Düzce Üniversitesi

Prof. Dr. Haydar GÖKSU
Düzce Üniversitesi

Prof. Dr. Turgut KILIÇ
Balıkesir Üniversitesi

Doç. Dr. Sibel BAYIL OĞUZKAN
Gaziantep Üniversitesi

Tez Savunma Tarihi: 03/04/2023

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

03 Nisan 2023

Bora KARAGÜL

TEŞEKKÜR

Lisansüstü öğrenimimde ve bu tezin hazırlanmasında gösterdiği her türlü destek ve yardımdan dolayı çok değerli hocam saygıdeğer Prof. Dr. Halil İbrahim UĞRAŞ' a en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca değerli katkılarını esirgemeyen Prof. Dr. Ertuğrul KAYA ve Prof. Dr. Haydar GÖKSU' ya şükranlarımı sunarım.

Bu çalışma boyunca yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen sevgili eşim Pınar KARAGÜL' e ve aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması, YÖK 100/2000 Doktora Projesi kapsamında Lisansüstü Enstitüsü Doğal, Bitkisel ve Kozmetik Ürünler Anabilim Dalında gerçekleştirilmiştir. Düzce Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Destek Programı kapsamında BAP-2021.05.03.1242 numaralı proje ile destekleyen Düzce Üniversitesi'ne teşekkür ederim.

03 Nisan 2023

Bora KARAGÜL

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ŞEKİL LİSTESİ	vii
ÇİZELGE LİSTESİ	ix
KISALTMALAR.....	x
SİMGELER	xi
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiii
EXTENDED ABSTRACT	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. LİTERATÜR ÖZETİ	5
1.2. KROMATOĞRAFI VE EKSTRAKSİYON.....	9
1.3. FLASH (FLAŞ) KROMATOĞRAFI	10
1.4. GLİSİRİZİN (GLİSİRİZİK ASİT) VE KULLANIMI	12
2. MATERYAL VE YÖNTEM	15
2.1. EKSTRAKSİYON DENEMELERİ	15
2.1.1. Asidik Ortam Ekstraksiyonu	16
2.1.2. Bazik Ortam Ekstraksiyonu.....	16
2.1.3. Etanol Ekstraksiyonu.....	17
2.1.4. Ultrasonik Destekli Etanol Ekstraksiyon.....	17
2.1.5. Hekzan İle Ön Yıkama ve Silika 60 Adsorbanı Uygulaması.....	17
2.1.6. Hekzan İle Ön Yıkama ve Aktif Karbon Adsorbanı Uygulaması	17
2.1.7. Hekzan İle Ön Yıkama ve Ultra Kaolin Adsorbanı Uygulaması.....	18
2.1.8. Hekzan İle Ön Yıkama ve Etanol Ekstraksiyonu	18
2.1.9. Etanol Ekstraksiyonu (Refluks).....	18
2.1.10. Saf Su / Etanol (70:30) Ekstraksiyonu	18
2.1.11. Saf Su / Etanol (70:30) Ekstraksiyonu (Refluks).....	19
2.1.12. Metanol / Etanol / Saf Su (70:20:10) Ekstraksiyonu.....	19
2.2. GELİŞTİRİLMİŞ EKSTRAKSİYON METODU	19
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	23
3.1. HPLC ANALİZ METODU	23
3.1.1. HPLC Standart Kalibrasyon Grafiği	23
3.1.2. Ekstraksiyon Denemeleri HPLC Sonuçları	25
3.1.2.1. Asidik Ortam Ekstraksiyonu.....	25
3.1.2.2. Bazik Ortam Ekstraksiyonu.....	26
3.1.2.3. Etanol Ekstraksiyonu	27
3.1.2.4. Ultrasonik Destekli Etanol Ekstraksiyonu	28
3.1.2.5. Hekzan ile Ön Yıkama Ve Silika 60 Adsorbanı Uygulaması (H-Si60)	29
3.1.2.6. Hekzan ile Ön Yıkama Ve Aktif Karbon Adsorbanı Uygulaması (H-Aktif)	30
3.1.2.7. Hekzan ile Ön Yıkama Ve Ultra Kaolin Adsorbanı Uygulaması (H-Ultra)	31
3.1.2.8. Hekzan ile Ön Yıkama Ve Etanol Ekstraksiyonu Uygulaması (H-Etanol).....	32
3.1.2.9. Etanol Ekstraksiyonu (Refluks).....	33

3.1.2.10. Saf Su / Etanol (70:30) Ekstraksiyonu	34
3.1.2.11. Saf Su / Etanol (70:30) Ekstraksiyonu (Reflüks)	35
3.1.2.12. Metanol/ Etanol/ Saf Su (70:20:10) Ekstraksiyonu	36
3.2. FLASH KROMATOĞRAFI İLE SAFLAŞTIRMA METODU	42
3.2.1. Flash Kromatografi Sonuçları	43
3.3. TLC UYGULAMASI.....	47
3.4. LC-MS/MS İLE KÜTLE TAYİNİ.....	48
3.5. SİTOKSİSİTE ÇALIŞMA SONUÇLARI	53
3.6. NMR SONUÇLARI.....	58
4. SONUÇ	60
5. KAYNAKLAR.....	63
ÖZGEÇMİŞ.....	67



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1.1. Meyan bitkisi ve meyan kökü.....	1
Şekil 1.2. Flash kromatografi genel diyagramı.....	11
Şekil 1.3. Flash kromatografi cihazı.....	11
Şekil 1.4. Glisirizin molekülünün kimyasal yapısı.....	12
Şekil 1.5. Glisiretinik asit kimyasal yapısı.....	12
Şekil 1.6. Glisirizin ve türevlerinin kimyasal yapıları a) 18 α -glisirizin b) 18 β -glisirizin c) 18 α -glisiretinik asit d) 18 β -glisiretinik asit e) glisirizin amonyum tuzu.....	13
Şekil 2.1. Meyan kökü ekstraksiyonu ve saflaştırma basamakları.....	20
Şekil 2.2. Glisirizin amonyum tuzunun flash kromatografi ile zenginleştirilmesi.....	21
Şekil 2.3. Ekstraksiyon çalışmalarının basamakları.....	21
Şekil 2.4. Saflaştırma çalışmalarının basamakları.....	22
Şekil 2.5. Flash kromatografi ile saflaştırma basamakları.....	22
Şekil 3.1. Standart çözeltilerin HPLC kromatogramı.....	24
Şekil 3.2. Glisirizin standardının a) UV spektrumu b) pik saflığı.....	24
Şekil 3.3. Asidik ortam ekstraksiyonu (siyah) ve standart HPLC kromatogramı (pembe).....	25
Şekil 3.4. Asidik ortam ekstraksiyonun a) UV spektrumu b) pik saflığı.....	25
Şekil 3.5. Bazik ortam ekstraksiyonu (siyah) ve standart HPLC kromatogramı (pembe).....	26
Şekil 3.6. Bazik ortam ekstraksiyonun a) UV spektrumu b) pik saflığı.....	26
Şekil 3.7. Etanol ekstraksiyonu (siyah) ve standart HPLC kromatogramı (pembe).....	27
Şekil 3.8. Etanol ekstraksiyonun a) UV spektrumu b) pik saflığı.....	27
Şekil 3.9. Ultrasonik destekli etanol ekstraksiyonu (siyah) ve standart HPLC kromatogramı (pembe).....	28
Şekil 3.10. Ultrasonik destekli etanol ekstraksiyonun a) UV spektrumu b) pik saflığı.....	28
Şekil 3.11. H-Si60 kodlu deneme (siyah) ve standart HPLC kromatogramı (pembe).....	29
Şekil 3.12. H-Si60 kodlu deneme ekstraksiyonun a) UV spektrumu b) pik saflığı.....	29
Şekil 3.13. H-aktif kodlu deneme (siyah) ve standart HPLC kromatogramı (pembe).....	30
Şekil 3.14. H-aktif kodlu deneme ekstraksiyonun a) UV spektrumu b) pik saflığı.....	30
Şekil 3.15. H-ultra kodlu deneme (siyah) ve standart HPLC kromatogramı (pembe).....	31
Şekil 3.16. H-ultra kodlu deneme ekstraksiyonun a) UV spektrumu b) pik saflığı.....	31
Şekil 3.17. H-etanol kodlu deneme (siyah) ve standart HPLC kromatogramı (pembe).....	32
Şekil 3.18. H-etanol kodlu deneme ekstraksiyonun a) UV spektrumu b) pik saflığı.....	32
Şekil 3.19. Etanol ekstraksiyonu refluks (siyah) ve standart HPLC kromatogramı (pembe).....	33
Şekil 3.20. Etanol ekstraksiyonu refluks a) UV spektrumu b) pik saflığı.....	33
Şekil 3.21. Saf su / etanol ekstraksiyonu (70:30) (siyah) ve standart HPLC kromatogramı (pembe).....	34
Şekil 3.22. Saf su / etanol ekstraksiyonun (70:30) a) UV spektrumu b) pik saflığı.....	34
Şekil 3.23. Saf su / etanol (70:30) refluks ekstraksiyonu (siyah) ve standart HPLC kromatogramı (pembe).....	35
Şekil 3.24. Saf su / etanol (70:30) refluks ekstraksiyonu a) UV spektrumu b) pik saflığı.....	35

Şekil 3.25. Metanol/etanol/saf su (70:20:10) ekstraksiyonu (siyah) ve standart HPLC kromatogramı (pembe).....	36
Şekil 3.26. Metanol/etanol/saf su (70:20:10) ekstraksiyonu a) UV spektrumu b) pik saflığı.....	36
Şekil 3.27. Ekstraksiyon çalışmalarındaki glisirizin miktarları ve pik saflığının grafiği.	38
Şekil 3.28. Aseton fazı (mavi), asetone ile ön yıkama sonrası ekstrakt (pembe) ve standart (siyah) HPLC kromatogramı.	39
Şekil 3.29. Biyokömür uygulaması (pembe) ve standart (siyah) HPLC kromatogramı.	40
Şekil 3.30. Refluks ekstraksiyonu (pembe) ve etanol ekstraksiyonu (siyah) HPLC kromatogramı.	40
Şekil 3.31. Flash kromatografi datası.	44
Şekil 3.32. Genel tarama spektrumu.....	44
Şekil 3.33. 8 numaralı fraksiyona ait HPLC kromatogramı.	45
Şekil 3.34. 8 numaralı fraksiyon (siyah) ve glisirizin standardına ait HPLC kromatogramı (pembe).....	46
Şekil 3.35. 8 numaralı fraksiyonun a) UV spektrum b) pik saflığı.....	46
Şekil 3.36. Flash kromatografi ile saflaştırılan ürünün HPLC kromatogramı.....	46
Şekil 3.37. a) Glisirizin amonyum tuzu b) Liyofilize ürün hali.....	47
Şekil 3.38. TLC uygulaması sonucu 1) Glisirizin standardı 2) Glisirizin amonyum tuzu 3) Glisirizin etanol ana ekstrakt.....	48
Şekil 3.39. Glisirizin standardı(GLY-STD) LC-MS/MS kütle tarama spektrumu.....	49
Şekil 3.40. Glisirizin amonyum tuzu (GLY-1) LC-MS/MS kütle tarama spektrumu. ...	50
Şekil 3.41. Flash kromatografi ile saflaştırılmış glisirizin amonyum tuzunun(GLY-2) LC-MS/MS kütle tarama spektrumu.....	51
Şekil 3.42. Glisirizin molekülünün parçalanma iyonların yapıları ve kütleleri.....	52
Şekil 3.43. GLY-1 numunesine ait % canlılık grafiği.....	54
Şekil 3.44. GLY-2 numunesine ait % canlılık grafiği.	55
Şekil 3.45. GLY-STD numunesine ait % canlılık grafiği.....	56
Şekil 3.46. GLY-3 numunesine ait % canlılık grafiği.	57
Şekil 3.47. GLY-AT'ın NMR spektrumu.....	58

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa No

Çizelge 1.1. Meyan kökünün içerdiği başlıca aktif bileşikler.....	2
Çizelge 2.1. Gerçekleştirilen ekstraksiyon denemeleri.....	16
Çizelge 3.1. HPLC analiz metodu.	23
Çizelge 3.2. Asidik ortam ekstraksiyonun sonuçları.	25
Çizelge 3.3. Bazik ortam ekstraksiyonun sonuçları.....	26
Çizelge 3.4. Etanol ekstraksiyonun sonuçları.....	27
Çizelge 3.5. Ultrasonik destekli etanol ekstraksiyonun sonuçları.	28
Çizelge 3.6. H-Si60 kodlu deneme ekstraksiyonun sonuçları.	29
Çizelge 3.7. H-aktif kodlu deneme ekstraksiyonun sonuçları.	30
Çizelge 3.8. H-ultra kodlu deneme ekstraksiyonun sonuçları.	31
Çizelge 3.9. H-etanol kodlu deneme ekstraksiyonun sonuçları.....	32
Çizelge 3.10. Etanol ekstraksiyonu refluksun sonuçları.....	33
Çizelge 3.11. Saf su / etanol ekstraksiyonun (70:30) sonuçları.....	34
Çizelge 3.12. Saf su / etanol (70:30) refluks ekstraksiyonun sonuçları.....	35
Çizelge 3.13. Metanol/etanol/saf su (70:20:10) ekstraksiyonun sonuçları.....	36
Çizelge 3.14. Ekstraksiyon sonuçları.....	38
Çizelge 3.15. Flash kromatografi metot denemeleri.....	42
Çizelge 3.16. Flash kromatografi metodu.....	43
Çizelge 3.17. Flash kromatografi ile toplanan fraksiyonlar.....	45
Çizelge 3.18. 8 numaralı fraksiyonun analiz sonuçları.....	45
Çizelge 3.19. Glisirizinin molekülün iyon kütleleri.	48
Çizelge 3.20. GLY-1 numunesine ait canlılık verileri.....	53
Çizelge 3.21. GLY-2 numunesine ait canlılık verileri.....	54
Çizelge 3.22. GLY-STD numunesine ait canlılık verileri.	55
Çizelge 3.23. GLY-3 numunesine ait canlılık verileri.....	56

KISALTMALAR

CO ₂	Karbondioksit
COVID	Koronavirüs
dk	Dakika
DNA	Deoksiribo nükleik asit
ELSD	Evaporatif ışıık saçılma dedektörü
FT-IR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrometresi
g	Gram
GA	Glisiretinik asit
GC	Gaz kromatografisi
GLY	Glisirizin
GLY-AT	Glisirizin amonyum tuzu
H ₂ SO ₄	Sülfirik asit
HCl	Hidroklorik asit
HILIC-SPE	Hidrofilik etkileşim kromatografisi
HIV	İnsan bağışıklık yetmezliği virüsü
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
kg	Kilogram
L	Litre
LC-MS/MS	Sıvı kromatografisi kütle spektrometresi
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
NMR	Nükleer manyetik rezonans
ODS	Oktadesilsiloksan
ppm	Milyonda bir birim
PTFE	Politetrafloroetilen
RNA	Ribonükleik asit
RSD	Bağıl Standart Sapma
SARS	Ağır akut solunum yolu yetersizliği sendromu
TAS	Toplam antioksidan seviyesi
TOS	Toplam oksidan seviyesi
TLC	İnce tabaka kromatografisi
TÜİK	Türkiye istatistik kurumu
UDE	Ultrasonik destekli ekstraksiyon
UV	Ultraviyole
WHO	Dünya sağıık örgütü
YÖK	Yükseköğretim kurulu

SİMGELER

α	Alfa
AU	Angström birimi
β	Beta
\$	Dolar
v/v	Hacimce yüzde
w/v	Hacimde ağırlıkça yüzde
μm	Mikrometre
mV	Milivolt
M	Molarite
Nm	Nanometre
N	Normalite
pH	Potansiyel hidrojen
R^2	Regresyon katsayısı
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
$\pm$	Standart sapma
%	Yüzde
yy	Yüzyıl

ÖZET

ZENGİNLEŞTİRİLMİŞ GLİSİRİZİN EKSTRESİ ELDESİ VE SAFLAŞTIRILMASI

Bora KARAGÜL

Düzce Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Doğal, Bitkisel ve Kozmetik Ürünler Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Halil İbrahim UĞRAŞ

Nisan 2023, 63 sayfa

Glisirizin, meyan kökü bitkisinin en önemli etken maddesidir. Bu tez çalışması glisirizin eldesi ve saflaştırılması için metot geliştirilmesi üzerinedir. Bu kapsamda meyan kökü bitkisinden elde edilen ekstraktlar için ekstraksiyon metodu belirlenmiş ve ardışık saflaştırma basamaklarından sonra flash kromatografi cihazı ile fraksiyonlarına ayrılması gerçekleştirilmiştir. Meyan kökü ekstraksiyonlarında en etkin değerlerin alkol/su karışımlarında olduğu tespit edilmiştir. Tercih edilen alkol çözücüler etanol ve metanol'dur. Ekstraksiyon işlemlerini sırasıyla adsorban uygulaması ve asidik-bazik ortamda çöktürme işlemleri uygulanarak glisirizinin amonyum tuzu formunda eldesi sağlanmıştır. Flash kromatografi işlemleri uygulanarak saflaştırma basamakları gerçekleştirilmiş olup zenginleştirilmiş glisirizin amonyum tuzu elde edilmiştir. Elde edilen glisirizin amonyum tuzu (amonyum glisirizat) yapı tayini için LC-MS-MS, HPLC ve NMR analizleri gerçekleştirilmiştir. Ayrıca glisirizin amonyum tuzunun sitotoksikite çalışmaları gerçekleştirilmiş ve ticari standart ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen ürünün toksisite göstermediği saptanmıştır.

Anahtar Sözcükler:, Glisirizin, Ekstraksiyon, Flash kromatografi, Meyan kökü, Saflaştırma.

ABSTRACT

EXTRACTION AND PURIFICATION OF ENRICHED GLYCYRRHIZIN EXTRACT

Bora KARAGUL

Duzce University

Graduate Education Institute, Department of Natural, Herbal and Cosmetic Products

Doctoral Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Halil Ibrahim UGRAS

Nisan 2023, 63 pages

Glycyrrhizin is the most important active ingredient of the licorice root plant. This thesis is on the development of a method for the extraction and purification of glycyrrhizin. In this context, an extraction method was determined for the extracts obtained from the licorice root plant and the fractions were separated by flash chromatography after sequential purification steps. It has been determined that the most effective values in licorice root extractions are in alcohol/water mixtures. Preferably are ethanol and methanol. Glycyrrhizin was obtained in the form of ammonium salt by applying the extraction processes, respectively, the adsorbent application and the precipitation in acidic-basic medium. Purification steps were carried out using flash chromatography, and enriched glycyrrhizin ammonium salt was obtained. The structure of the obtained glycyrrhizin ammonium salt (ammonium glycyrrhizate) was determined by LC-MS-MS, HPLC, and NMR analyses. In addition, cytotoxicity studies of glycyrrhizin ammonium salt were performed and compared with the commercial standard. It was determined that the obtained product didn't show toxicity.

Keywords: Glycyrrhizin, Extraction, Flash chromatography, Licorice, Purification.

EXTENDED ABSTRACT

EXTRACTION AND PURIFICATION OF ENRICHED GLYCYRRHIZIN EXTRACT

Bora KARAGUL

Duzce University

Graduate Education Institute, Department of Natural, Herbal and Cosmetic Products

Doctoral Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Halil Ibrahim UGRAS

April 2023, 63 pages

1. INTRODUCTION

"Liquorice" (also spelled "licorice") refers to the plant *Glycyrrhiza glabra* and its root, which is commonly used as a flavoring in candy, beverages, and other food products. It is also used in traditional medicine for its anti-inflammatory and soothing properties. Liquorice root contains glycyrrhizin, a compound that gives it its characteristic sweet flavor, and has been used for thousands of years in cultures around the world for its various medicinal properties. Pharmacological properties of liquorice include;

- **Anti-inflammatory:** Liquorice contains glycyrrhizin, a compound with anti-inflammatory properties that can help reduce inflammation in the body.
- **Antiviral:** Glycyrrhizin in liquorice has also been shown to have antiviral activity, particularly against certain types of viruses, such as herpes simplex virus.
- **Antioxidant:** Liquorice contains various antioxidants, including flavonoids and phenolic compounds, which can help protect the body from oxidative stress and damage caused by free radicals.
- **Immunomodulatory:** Liquorice has been shown to have immunomodulatory effects, meaning it can help regulate and modulate the immune system in the body.
- **Hepatoprotective:** Liquorice has been shown to have hepatoprotective properties, meaning it can help protect the liver from damage caused by toxins or disease.
- **Anti-ulcer:** Liquorice has been traditionally used for its anti-ulcer properties and has been shown to help protect the stomach lining from damage caused by excess acid and other factors.

- Anti-allergic: Liquorice has been shown to have anti-allergic properties and can help reduce symptoms of allergies, such as itching, swelling, and inflammation.

There are several methods for extracting the active compounds from liquorice root. Some common extraction methods include:

- Water extraction: This is a simple method that involves boiling the liquorice root in water and then filtering the solution to remove any solids. The resulting liquid can be used as a tea or as a base for other products.
- Ethanol extraction: Ethanol is a common solvent used for extracting compounds from plant materials. The liquorice root is soaked in ethanol for a period of time to extract the desired compounds. The ethanol is then evaporated to leave behind a concentrated extract.
- Super critical fluid extraction (SFE): SFE is a newer extraction method that uses a super critical fluid, such as carbon dioxide, as a solvent to extract the active compounds from the liquorice root. This method is more efficient and environmentally friendly than other methods.
- Steam distillation: This method involves heating the liquorice root with steam to extract the volatile compounds. The steam is then condensed to yield a liquid extract.
- Soxhlet extraction: This method involves repeatedly soaking the liquorice root in a solvent, such as ethanol, for several hours to extract the desired compounds. The solvent is then evaporated to leave behind a concentrated extract.

Different extraction methods may yield different levels and types of active compounds, and the choice of method often depends on the intended use of the extract. In our study, we developed a method on the purification and enrichment of glycyrrhizin from licorice root. Extraction and pre-purification of licorice root was carried out. It was then separated into fractions by flash chromatography. The glycyrrhizin ammonium salt was obtained. An innovative and easily applicable method has been developed.

2. MATERIAL AND METHODS

Various extraction studies of ground and dried licorice root were performed. All solvents used in the study are of HPLC grade purity. In order to determine the appropriate extraction method in the study;

1. Acidic medium
2. Basic medium
3. Ultrasonic extraction
4. Impurity removal with hexane
5. Hexane and adsorbent application
6. Double and triple solvent application
7. Extraction methods were applied in the reflux system and at room temperature and their effects were compared. The results obtained were evaluated by HPLC analysis and the most suitable extraction method was determined. Purification steps were carried out using flash chromatography, and enriched glycyrrhizin ammonium salt was obtained. The structure of the obtained glycyrrhizin ammonium salt (ammonium glycyrrhizate) was determined by LC-MS-MS, HPLC, and NMR analyses. In addition, cytotoxicity studies of glycyrrhizin ammonium salt were performed and compared with the commercial standard. It was determined that the obtained product didn't show toxicity.

3. RESULTS AND DISCUSSIONS

According to the results obtained, higher yields were obtained with the extraction methods containing alcohol and water. Biochar was used as an adsorbent application for the removal of impurities. Biochar needs to be thoroughly filtered. Glycyrrhizin ammonium was obtained as a solid by acidic and basic precipitation methods. Flash chromatography process was used to remove the impurity of the obtained glycyrrhizin solid. The fractions obtained by flash chromatography were evaporated and lyophilized with the appropriate solvent. Cytotoxicity studies of the salt we obtained were carried out and it was determined that it didn't have toxic value. As a result, licorice contains many impurities, including phenolic compounds and flavonoids. Therefore, sequential purification steps are required. The glycyrrhizin was obtained with an easy and applicable method.

4. CONCLUSION AND OUTLOOK

In recent years, traditional complementary and alternative medicine treatment applications have attracted attention. Herbal products usually consist of many active ingredients. These active compounds may interact during their use. It is necessary to determine the bioactive components of plant-derived products and to investigate the

interaction mechanisms. Natural herbal products are of great importance in traditional medicine. The active ingredients and quantities of these products must be clearly determined.

Within the scope of this thesis, various extractions and pre-treatments were carried out for the extraction and purification of glycyrrhizin from licorice root. It has been observed that reflux extraction, ultrasonic assisted extraction, adsorbent applications, extraction methods performed in acidic and alkaline medium affect the purity and concentration of glycyrrhizin. It has been determined that glycyrrhizin has abnormalities in peak shapes and contains impurities at different wavelengths. For optimum extraction conditions, it was determined that polar or nonpolar solvents should be used in the pre-washing process, preferably alcohol and water-containing solvents should be used as extraction solvents, and polar and nonpolar impurities should be removed by adsorbent application. Glycyrrhizin was obtained in salt form by acidic-basic precipitation. LC-MS/MS, HPLC and NMR techniques were used for structure and quantity determination. Molecular ion peaks $[M]^+$ and $[M]^-$ degradation products were detected in LC-MS/MS application. It was compared with the reference standard substance by HPLC analysis. As a result of purification of glycyrrhizin ammonium salt by flash chromatography, it was determined that the peak area was 83.37% and the peak purity was 1.00. The extraction yield of the obtained glycyrrhizin ammonium salt was 2.40%. This extraction yield may vary depending on the region where the licorice root used, storage conditions, type of licorice root, and harvest time.

1. GİRİŞ

Meyan kökü, taksonomik olarak Fabaceae (baklagiller) familyasına aittir ve *Glycyrrhiza* cinsinde sınıflandırılır. Meyan kökü, bitkisinden elde edilen bir bitki köküdür ve geleneksel tıpta uzun süredir kullanılmaktadır. *Glycyrrhiza glabra*, yaprak döken, çok yıllık bir bitkidir ve genellikle 1-1,5 metre yüksekliğe kadar büyüyebilir. Çok dallıdır ve dalları yatay bir şekilde yayılır. Gövde ve dalları genellikle tüysüzdür. Yaprakları çift tüylüdür, yaprak sayısı 9-17 arasında değişkenlik göstermektedir. Çiçekleri ufak, mavi-mor renklidir ve baklalıdır. Meyveleri 2-3 cm uzunluğunda, sarımsı-kahverengi renkte ve bakla şeklindedir. Meyan kökü kalın, düzgün ve lifli yapıdadır, köklerin rengi kahverengi ile siyah arasında değişkenlik göstermektedir [1].

Glycyrrhiza glabra, özellikle Orta Doğu, Akdeniz ve Asya'da yaygın olarak yetiştirilmektedir. Meyan kökü olarak bilinir. Tüm dünyada kültürü yapılmaktadır. Aynı zamanda ülkemizin en eski kültürü ve ihracatı yapılan bitkisel ürünlerinden sayılmaktadır. Güneydoğu Anadolu bölgesinde yaz aylarında meyan kökünden yapılmış içecekler tüketilmektedir. Meyan kökü, ilaç, tatlandırıcı ve gıda endüstrisinde kullanılmaktadır. Ayrıca, geleneksel tıpta da birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. Çeşitli sağlık yararları ile ilişkilendirilen meyan kökü, anti-inflamatuar, antioksidan, ödem çözücü ve öksürük kesici gibi özellikleri nedeniyle sıklıkla kullanılmaktadır [2]. Meyan bitkisi ve meyan kökü Şekil 1.1'de gösterilmiştir.



Meyan Bitkisi (*Glycyrrhiza glabra*)



Meyan Kökü

Şekil 1.1. Meyan bitkisi ve meyan kökü.

Meyan kökünün içerdği aktif bileşikler Çizelge 1.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 1.1. Meyan kökünün içerdği başlıca aktif bileşikler.

Yapı	Bileşikler
Saponinler	Glisirizin, glisiretinik asit, uralsaponin, licorice-saponin, glabasaponin
Flavonoidler	likuritin, isolikuritin, glabridin, glabrene, glabroneol ve glabrol
Steroller	Sitosterol, stigmasterol, kampesterol ve Ergosterol
Polisakkaritler	Arabinogalaktanlar, glukoronik asit, pentozanlar
Mineral ve Vitaminler	Potasyum, kalsiyum, magnezyum, sodyum, demir, A, B1, B2 ve C vitaminleri

Meyan kökü içerik olarak incelediğimizde %18’e kadar şeker içermektedir ve flavonoidler, amino asitler, esansiyel yağlar ve saponinleri içermektedir. İhtiva ettiği saponin grupları meyan köküne köpürme özelliği kazandırmaktadır. Meyan kökünü incelediğimiz zaman karşımıza çıkan en önemli saponin bileşiği olarak glisirizin (GLY) diğer bir adı ile glisirizik asit çıkmaktadır. Glisirizin, meyan kökünün ana aktif bileşenidir ve meyan kökü özütlerinin %5-25 arasında glisirizin içerdği belirtilmektedir. Meyan kökü özütlerinde bileşik içeriği ve oranları bitkinin yetiştiği bölge, hasat zamanı, depolama koşulları, işleme yöntemleri ve kullanılan çözücüler gibi birçok faktöre bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir. Glisirizin, meyan köküne karakteristik tat veren bir bileşiktir ve sakarozdan 50 kat daha fazla tatlılığa sahip olduğu belirtilmektedir. Meyan kökünün öksürük şurupları, içecek sektöründe, şekerleme, tütün gibi çeşitli ürünlerde de kullanımı söz konusudur. Sakarozdan 50 kat daha tatlı ve düşük kalorili olmasından dolayı şekerleme ürünlerinde tatlılığı arttırmak amaçlı tüketimi ve kullanımı yaygındır. Uzun süre ağızda tat olarak kaldığı da raporlarda geçmektedir [3].

Glisirizinin saflaştırılması ve ekstraksiyonu için literatür çalışmalarını incelediğimizde

karşımıza sıklıkla geleneksel ekstraksiyon metodu olarak; sıcak su ekstraksiyonu, alkali ortamda ekstraksiyon, sulu metanol ekstraksiyonu ve etanol ekstraksiyonu sıklıkla kullanılan ekstraksiyon solventleri olarak çıkmaktadır. Yenilikçi metotlar olarak son zamanlarda ultrasonik ekstraksiyon, mikrodalga ekstraksiyonu ve süperkritik CO₂ ekstraksiyonu çalışılmaktadır. Yüksek basınçta aşırı ısıtılmış su ekstraksiyonu çalışmaları da bu alanda gerçekleştirilmektedir. Bu ekstraksiyon yöntemleri özel koşullar ve cihaz altyapısı içermesinden dolayı yüksek maliyetlidir.

Meyan kökü, özellikle Çin geleneksel tıbbında sıklıkla kullanılan bir bitki olmasının yanı sıra popüler bir doğal besin takviyesi olarak karşımıza çıkmaktadır. Meyan kökünün başlıca yan etkilerine baktığımızda glisirizinin dozuna bağlı olarak hipertansiyona sebep olmaktadır. Meyan kökünün en önemli yan etkisi triterpenoidlerin kortizol benzeri yapıda olmalarından dolayı fenolik bileşenlerin ikili bir rol oynamasıdır. Meyan kökünde yer alan fenolik bileşenler meyan kökü ekstraktlarındaki glisirizinin biyoyararlanımı önemli derecede azaltır yapılan çalışmalarda glisirizinin safraya atılımını arttırdığı gözlemlenmiştir. Ayrıca fenolik bileşenlerin glisirizin hidrolizini bağırsaklarda azalttığı tespit edilmiştir. Bu durum, ekstrakttaki fenolik bileşikler ve triterpenoidlerin metabolik etkileşiminden kaynaklanmaktadır. Bu bileşikler arasındaki farmakokinetik ve metabolik etkileşimin belirlenmesi meyan kökü kullanımı açısından oldukça önemlidir. Bu durumda hamilelik sürecinde ve hipertansiyon hastalarının dikkatle kullanması gerektiği belirtilmiştir [4], [5]. Terapötik ajan olarak alerjik dermatiti ve kronik viral hepatit tedavilerinde kullanılmaktadır. Ayrıca iltihap önleyici, ülser önleyici ve antiviral aktivitelere sahip olduğu bilinmektedir. Japonya’da hepatit C’nin tedavisinde kullanılmaktadır. Ayrıca glisirizin emülsifiye ve jel oluşturucu özelliğinden dolayı gıda ve kozmetik alanında ve anti-viral etkisinden dolayı HIV-1, hepatit virüsleri A,B,C üzerine kullanılmaktadır [6]. Meyan kökünün glisirizin ve likuritinin gibi aktif bileşenlerinin, Korona enfeksiyonuna neden olan COVID-2 gibi virüslerin çoğalmasını önlediği bilinmektedir [7].

Son yıllarda modern tıbbın tedavi uygulamalarına destek amaçlı olarak geleneksel tamamlayıcı ve alternatif tıp tedavi uygulamaları ilgi görmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) dünya nüfusunun yaklaşık %60’ının sentez ürünü olan ilaçları tüketmediğini, %25’inin ise bitkisel kaynaklı olan ilaçlara güvendiğini ve bunları kullanmayı tercih ettiklerini belirtmiştir [8]. Bitkisel içerikli ürünler genellikle çok sayıda etken maddeden oluşmaktadır ve kullanım sırasında birbiriyle farmakolojik olarak etkileşime

girebilmektedir. Bu etkileşim mekanizmalarını açıklamak için bitki kökenli ürünlerin biyoaktif bileşenlerini tespit etmek ve etkileşim mekanizmalarını detaylıca araştırmak gerekmektedir.

Anti-inflamatuar, immün modölatör, antikanser, antioksidan ve antiviral, anti-ülser ve anti-alerjik aktiviteleri de dâhil olmak üzere olmak üzere glisirizin çeşitli farmakolojik ve biyolojik aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. Glisirizin ayrıca HIV ve ciddi akut solunum yolu sendromu (SARS) ile ilişkili koronavirüs dâhil olmak üzere çeşitli DNA ve RNA virüslerine karşı anti viral aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir. Bu nedenle, büyük miktarda meyankökü ve ekstreleri, dünya pazarında tatlandırıcı maddeler ve tıbbi malzemeler olarak bulunmaktadır. Tatlı tadı nedeniyle glisirizin dünya çapında doğal tatlandırıcı ve tatlandırıcı katkı maddesi olarak kullanılır. Karışımlarda öksürük ve balgam söktürücü olarak ve mide ilaçlarının formülasyonlarında aroma maddesi olarak kullanılmıştır [9]. Meyan kökü zayıf bir oral biyoyararlanıma sahiptir. Sağlıklı gönüllüler üzerinde gerçekleştirilen bir çalışmada glisirizin amonyum tuzu (GLY-AT) formunun biyoyararlanımı incelenmiş ve maksimum konsantrasyonlara 10 saat içerisinde ulaştığı meyan kökü ekstraktlarında ise bu sürenin 12 saat olduğu belirtilmiştir. Saflaştırılmış glisirizin doz miktarı 2 mg/kg/gün olarak önerilmiştir [10]. Diğer bir çalışmada ise açık etiketli, randomize, kontrollü bir çalışma (n = 50), normotansif gönüllülerde meyan kökü takviyesinin (glisirizin 290 ila 370 mg/gün) hemodinamik etkileri incelenmiştir. 2 hafta sonra, meyan kökü grubunda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında hücre dışı hacmin yanı sıra sistolik ve diyastolik kan basıncı (periferik ve merkezi) önemli ölçüde arttığı ve plazma aldosteron ve potasyum konsantrasyonlarını da önemli ölçüde azalma olduğu belirtilmiştir [11].

1.1. LİTERATÜR ÖZETİ

Meyan kökü üzerine literatür çalışmalarını incelediğimizde çeşitli tekniklerle ekstraksiyon yöntemleri mevcuttur. Bu yöntemlerden biri de yüksek basınçta aşırı ısıtılmış su ekstraksiyonu uygulamasıdır. Gerçekleştirilen bir çalışmada aşırı ısıtılmış su ekstraksiyonu ile ultrasonik ekstraksiyon ve soxhlet ekstraksiyon metodu kıyaslanmıştır. Glisirizin miktarı aşırı ısıtılmış su ekstraksiyonunda; 54,760 mg/g, ultrasonik ekstraksiyonda; 18,240 mg/g ve soxhlet ekstraksiyonunda; 28,760 mg/g olarak bulunmuştur. Ancak yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilen bu çalışmanın glisirizinin hidroliz olmasına ve glisiretinik asit (GA) veya glukuronik asit olarak parçalanmasına neden olabileceği belirtilmiştir [12].

Glisirizinin ekstraksiyonu ve in vitro koşullarda anti inflamatuvar etkinliği üzerine gerçekleştirilen bir çalışmada ise glisirizinin sarıdan turuncuya dönen karakteristik rengi bulunduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada GA ekstraksiyonu için meyan kökü tozunu aseton ve seyreltik nitrik asit ile 2 saat süresince meserasyon yöntemi uygulanmıştır. Glisirizinin in-vitro anti-inflamatuvar aktivitesi, %27,11 oranında inhibisyon göstererek inflamatuvar aktiviteye karşı koyma yeteneğine sahip olduğu belirtilmiştir [13].

Başka bir çalışmada ise 2 g toz meyan kökü ile 20 ml metanol solventi ortam sıcaklığında 30 dakika boyunca ultrasonik banyo uygulanmıştır ve ardından gece boyunca bekletilmiştir. Elde edilen ekstrakt filtre edilerek HPLC-UV-ESI-MS/MS analizi gerçekleştirilmiştir. 16 etken bileşik tespit edilmiştir. Glisirizin etken maddesi (m/z 803, 777, 645, 627, 351) olmak üzere kütle fraksiyonlarına ayrıldığı ve 254 nm’de uyarıldığı tespit edilmiştir. Çalışmada en yüksek içeriğin glisirizin olduğu tespit edilmiştir [14].

Bu çalışmada ise meyan kökünden glisirizin ve glabridinin optimum ekstraksiyon koşullarını belirlemek için farklı çözücü sistemleri, sıcaklık, süre ve prosedürler gerçekleştirilmiştir. Etanol ve su (30:70 v/v) ekstraksiyon solventi tercih edilmiştir ve 60 dakika boyunca 50 °C’de daldırma yöntemi kullanılarak ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. HPLC analizi ile glisirizin 2,39 mg/g ve glabridin 0,92 mg/g olarak tespit edildiği belirtilmiştir [15].

Meyan kökü uygulanmış tütün ürünlerinde glisirizin analizi üzerine gerçekleştirilen bir çalışmada ise HPLC analizi koşullarında asetik asit yerine tercihen asetat tamponu ve fosfat tamponlu mobil faz tercih edilmesi gerektiğini savunmuştur [16].

Glisirizin, glabridin ve toplam flavonoid üzerine gerçekleştirilen diğer bir çalışmada ise glisirizin, glabridin ve toplam flavonoid miktarlarını stabilite ve bozulmalarını etkileyen faktörler üzerine denemeler gerçekleştirilmiştir. 50 mg toz ekstrakt ile 50 ml metanol karıştırılarak ultrasonik ekstraksiyon uygulanmıştır. Glisirizin 254 nm’de tayin edilmiştir ve %7,1-8,7 arasında glisirizin varlığı tespit edilmiştir. Asit hidrolizi, oksidasyon, sıcaklık, nem ve alkali hidroliz koşullarında stabiliteyi etkileyen faktörler incelenmiştir. Glisirizin, glabridin standartlarının ve numune örneklerinin 10 °C ve 25°C ortam koşullarında üç güne kadar stabil kaldığı belirtilmiştir. Glisirizinin stabilitesinin 7 gün boyunca 60°C’de sıcaklıkta %17,2, %75 nem ortamında 40°C’de %25,4, 2N hidroklorik asit hidrolizi ortamında 1 saat boyunca %9,8, 2N sodyum hidroksit hidroliz ortamında 1 saat boyunca %5,3 olarak stabilitesini kaybettiğini ve %30’luk hidrojen peroksit ortamında 1 saat boyunca ise bozulma gerçekleşmediğini belirtilmiştir. Ayrıca çalışma kapsamında HPLC analiz metodu geliştirilmiştir ve tercihen potasyum fosfat tamponu içeren mobil faz kullanılmıştır [17].

Meyan kökünden glisirizin ekstraksiyonu, antioksidan kapasitesi ve antimikrobiyal özelliklerini incelenmiştir. 45°C’de ultrasonik banyo ekstraksiyonu ile üç farklı çözücünün metanol, etanol ve su kullanılarak ekstraksiyon verimi üzerine çalışma gerçekleştirilmiştir. %0,01 w/v amonyak çözeltisi ile muamele edildikten sonra sıcak plaka üzerinde buharlaştırılarak konsantre çözelti haline getirilmiştir. %70’lık etanol ile konsantre çözeltiyi muamele edilerek sülfirik asit ile pH ayarlaması gerçekleştirilmiş ve glisirizin kristalleri eldesi sağlanmıştır. FT-IR spektroskopisi ve TLC kromatografisi ile standart glisirizin ile karşılaştırılarak karakterizasyonu, antioksidan ve antimikrobiyal aktivite etkinlikleri çalışılmıştır. 45°C ve 45 dakika ultrasonik ekstraksiyon prosedürünün en verimli olduğu raporlandırılmıştır [18].

2018 yılında yapılan bir çalışma ise meyan kökü bitkisinin antibakteriyel ve antioksidan aktivitelerini değerlendirilmiştir. Hatay yöresinde üç farklı bölgesinden toplanılan örnekleri kurutma işleminden sonra toz haline getirilip 30 g bitki örneğine 300 ml solvent ekleyerek soxhlet ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Etanol ve su ekstraktlarının antibakteriyel özelliklerini belirlemek amacıyla *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* Cowan I, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus*

mirabilis, *Salmonella Enteritidis* ve *Salmonella Typhimurium* mikroorganizmaları üzerine çalışma gerçekleştirilmiştir ve yalnızca *B. Cereus* 'a karşı antibakteriyel aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Meyan bitkisinin etanol ve su ekstraktları antioksidan seviyesi açısından ise diğer çalışmalara kıyasla düşük bir değer gösterdiği ve su içerikli ekstraksiyonların etanol ekstraktlarına göre daha yüksek antioksidan aktivite gösterdikleri tespit edilmiştir. Bu çalışmada, çoğu mikroorganizmaların duyarlılık göstermemesi kullanılan ekstrakt konsantrasyonunun düşük olmasından kaynaklanmış olabileceği belirtilmiştir [2].

Diğer bir çalışma ise in vivo diyabet modeli uygulanan ratlar üzerinde gerçekleştirilmiştir. Glisirizinin oksidatif stres ve inflamasyon etkinliği araştırılmıştır. Glisirizin sulu çözeltisi, 1 hafta süre ile ratlara 50 mg/kg/gün oral olarak verilmiştir. Süre sonunda adipoz ve karaciğer doku örneklerinde total antioksidan ve oksidan kapasitesi incelenmiştir. Elde edilen bulgulara göre glisirizinin diyabetle uyarılan total oksidan seviyelerini (TOS) anlamlı düzeyde azalttığı ve diyabetle azalan total antioksidan seviyelerinin (TAS) anlamlı düzeyde attırdığı da bulunmuştur. Sonuç olarak diyabetik ratların karaciğer ve adipoz dokularında sitokin seviyelerini düzenleyerek antienflamatuvar etki ve antioksidan etki gösterdiği raporlandırılmıştır [19].

Meyan kökünün şerbet olarak tüketimi Türkiye'nin Güneydoğu Anadolu bölgesinde oldukça yaygındır. Gerçekleştirilen bir çalışmada, toplam aerobik canlı, toplam aerobik mezofilik spor, maya ve küf, toplam koliform grubu bakteri, toplam fenol, toplam flavonoid ve glisirizin miktarı incelenmiştir. Meyan köklerinin ekstraksiyonunda farklı sıcaklık uygulamalarının son ürün şerbetin mikrobiyolojik kalitesini olumlu yönde geliştirmekte olduğunu ve biyoaktif bileşenlerin şerbete geçişini istatistiksel olarak önemli düzeyde arttırdığı da gözlemlenmiştir [20].

Meyan kökü üzerine yapılan ekstraksiyon çalışmaları, bitkiden biyoaktif bileşiklerin elde edilmesini amaçlamaktadır. Bu çalışmalar, meyan kökünden farklı solventler kullanılarak yapılan ekstraksiyonların ve ekstraktların özelliklerini incelemektedir.

Örneğin, bir çalışmada, meyan kökü özütleri, farklı solventler kullanılarak elde edilmiştir ve bu özütlerin antioksidan kapasiteleri karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada, metanol ve etanol gibi polar solventlerin, antioksidan aktivitesi açısından daha etkili olduğu gösterilmiştir [21].

Meyan kökünden elde edilen özütlerin antitümör etkileri de araştırılmıştır. Bir çalışmada, meyan kökü özütleri, farklı solventler kullanılarak elde edilmiş ve bu özütlerin antitümör aktiviteleri incelenmiştir ve antitümör aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur [22].

Glisirizinin saflaştırılması üzerine gerçekleştirilen bir çalışmada poliamid reçine ve makro gözenekli reçineler kullanılarak %11,40'dan %88,95'e saflaştırma başarısı elde edilmiştir [23].

Bir diğer saflaştırma çalışması olarak karşımıza HILIC-SPE metodu ile preparatif HPLC uygulaması gerçekleştirilmiştir. Glisirizin %13,67'den %64,22'e tek basamak uygulama ile saflaştırılmıştır. 1 kg meyan kökü toz haline getirilerek ultrasonik ekstraksiyon metodu ile 1 L; 0,8 L; 0,6 L olmak üzere etanol/su (70:30) oranında 3 saat boyunca ekstraksiyon işlemi uygulanmıştır. Ekstrakt süzildükten sonra evapore edilerek 347,9 g katı elde edilmiştir. 3,4 g katı tekrardan 20 ml etanol/su çözücünden çözdürülerek membran filtreden süzölmüş ve 171,4 mg/ml madde tespit edilmiştir [24].

Farklı bir çalışmada ise Etanol/Fosfat tamponlu ikili faz ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. 1 kg bitki materyali üzerinden 366 g ham ekstrakt elde edilmiş akabinde etanol/fosfat ikili faz ekstraksiyonu uygulanarak 127 g ve %13,5 saflıkta katı madde elde edilmiştir [25].

Glisirizinin meyan kökü ekstraktından adsorpsiyon ve desorpsiyonu üzerine gerçekleştirilen bir çalışmada beş farklı makro-gözenekli reçinenin saflaştırma kabiliyetini karşılaştırılmıştır. İyon değişim reçinelerinin statik ve dinamik adsorpsiyonuyla glisirizinin ayrılmasının optimizasyonu, pH ve etanol konsantrasyonu gibi faktörlerin etkisi incelenmiştir ve Indion 810'un adsorpsiyonda ve desorpsiyonda maksimum kapasiteye sahip olduğunu ve glisirizinin meyan kökünden etkili bir şekilde ayırabildiği belirtilmiştir. Glisirizin saflığının %14,3'ten %71,5'e kadar arttırılmasına olanak sağlayan dinamik desorpsiyon, HPLC geri kazanımının %63.6 olduğu belirtilmiştir [26].

Meyan köküne dair literatür çalışmalarını incelediğimizde birçok çalışma triterpen saponin bileşiği olan glisirizin ekstraksiyonu, saflaştırılması ve aktivite etkinliği üzerinedir. Bu durum glisirizin ve glisirizin tuz formlarını değerli kılmaktadır. Glisirizinin suda çözünabilirliğini arttırmak için potasyum, kalsiyum ve amonyum tuz formları oluşturulmaktadır. Glisirizinin amonyum tuzu formu ticari olarak kullanımı

oldukça yaygındır. Glisirizinin seyreltik sülfürik asit ile hidrolizi sonucunda oldukça değerli ve atopik dermatit etki gösteren glisiretinik aside dönüştüğü raporlanmıştır [27]. Glisirizinin ekstraksiyonu ve saflaştırılması üzerine gerçekleştirilen çalışmalarda çeşitli ekstraksiyon metotları ve saflaştırma teknikleri uygulanmaktadır. Ultrasonik ekstraksiyon yöntemi en yaygın kullanılan modern metot olarak karşımıza çıkmaktadır. Süperkritik sıvı ekstraksiyonu ve enzim ekstraksiyonu yöntemleri de dair çalışmalarda artmaktadır. Meyan kökünün içerdiği biyoaktif bileşenler olan saponinler veya flavonoidlerin ekstraksiyonu için çeşitli koşullar altında farklı ekstraksiyon çözücülerini kullanılmaktadır ve en yaygın olarak kullanılan çözücüler metanol, etanol, su ve seyreltik amonyak çözeltilerini içeren geleneksel ekstraksiyon yöntemleridir. Bitki materyallerinin yetiştirildiği bölge, saklama koşulları, uygun ekstraksiyon metodu, verimli saflaştırma basamakları etken maddelerin miktarını belirlemede oldukça önemlidir. Bu tez çalışması kapsamında, glisirizinin ekstraksiyonu ve saflaştırılması için düşük maliyetli ve kolay işlem basamaklarını içeren ekstraksiyon ve saflaştırma metodu geliştirilmiştir.

1.2. KROMATOGRAFI VE EKSTRAKSİYON

20.yy. başlarında Rus Botanikçi Mikhail Tsvet'in bitki ekstraktlarından klorofili saflaştırması ile kromatografi bir ayırma tekniği olarak karşımıza çıkmaktadır. Bir karışımdaki çeşitli maddeleri, maddelerin kimyasal veya fiziksel farklılıklarından yararlanılarak ayrılmasını sağlayan bir analitik tekniktir. Polarite, çözünürlük, afinite ve iyonik güce bağlı olarak ayrımlar gerçekleştirilebilmektedir. Bir kromatografi sistemini temel olarak sabit faz, hareketli faz ve ayırımı yapılmak istenen karışım oluşturmaktadır. Kromatografinin temel prensibi karışımdaki bileşenlerin hareketli fazın akıcılık özelliğinden faydalanılarak sabit faz ile etkileşimine dayanan taşınma ve birbirinden ayırma işlemidir. Başlıca kromatografi türleri olarak;

1. Kolon Kromatografisi
2. İyon Değişim Kromatografisi
3. Afinite Kromatografisi
4. Kâğıt Kromatografisi
5. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC)

6. Gaz Kromatografisi (GC)

7. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Günümüzde birçok ayırma metodu kullanılmaktadır. Gelişen teknoloji ile birlikte temelde kolon kromatografisi etrafında dizayn edilmiş birçok ayırma metodu geliştirilmiştir. Geliştirilmiş hassas dedektörler sayesinde maddelerin tanımlanması ve ayrıştırılmasında oldukça hassas sonuçların elde edilmesi sağlanmaktadır. Analiz, tanımlama, saflaştırma ve miktar tayini için önemli yöntemlerdir.

Saflaştırma ve ekstraksiyon, kimya ve biyokimya gibi bilim dallarında yaygın olarak kullanılan iki temel ayırma yöntemidir. Her iki yöntemde, bir bileşiği diğer bileşiklerden ayırtmak veya bir karışımdan hedef bileşiği izole etmek için kullanılmaktadır.

Saflaştırma, bir bileşiği diğer bileşiklerden arındırmak için kullanılan bir yöntemdir. Bir bileşik saflaştırıldığında, arındırma süreci, bileşiğin diğer bileşiklerden ayrılması, arzu edilen saf bileşiğin elde edilmesi ve saf bileşiğin saflığının kontrol edilmesi adımlarını içermektedir. Saflaştırma yöntemleri arasında kristalizasyon, damıtma, kromatografi gibi yöntemler yer alır.

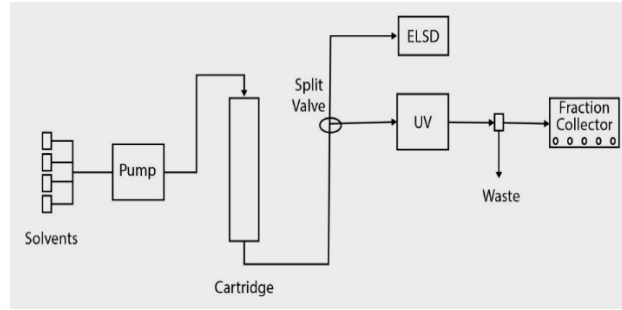
Ekstraksiyon, bir bileşiği bir çözücüden veya karışımdan ayırtmak veya izole etmek için kullanılan bir yöntemdir. Ekstraksiyon, hedef bileşiğin çözünürlüğüne bağlı olarak organik çözücüler, sıvılar, gazlar veya diğer bileşikler kullanarak gerçekleştirilebilir. Ekstraksiyon, organik sentez, doğal ürünlerin izolasyonu, ilaç keşfi ve gıda endüstrisi gibi birçok alanda kullanılır. Ekstraksiyon yöntemleri arasında sıvı-sıvı ekstraksiyonu, katı-sıvı ekstraksiyonu ve süperkritik ekstraksiyon gibi yöntemler yer alır.

Her iki yöntem de bir bileşiği izole etmek veya arındırmak için kullanılan çeşitli teknikleri içermektedir ve bu teknikler seçilen bileşiğin özelliklerine, amaçlarına ve kullanılan materyallere bağlı olarak değişebilmektedir.

1.3. FLASH (FLAŞ) KROMATOĞRAFI

Bu tez çalışması kapsamında kullanılan flash (flaş) kromatografi yöntemi son yıllarda oldukça popüler olan bileşenlerin ayrılması ve saflaştırılması için kullanılan bir yöntemdir. Düşük basınçlarda ve yüksek miktarlarda madde ayırmasını sağlayan sistemlerdir. Temel ayırma prensibi kolon kromatografisi ve yüksek basınçlı sıvı

kromatografisi ile benzer özellik göstermektedir. Karışımdaki bileşenler, farklı polariteleri veya kimyasal özellikleri nedeniyle sabit faz içinde farklı hızlarda hareket ederler. Bu nedenle, bileşenler sabit faz boyunca ayrılır ve ayrı fraksiyonlar elde edilmektedir. Flaş kromatografinin, diğer kromatografi sistemlerinden farkları ise hava basıncı kullanılarak hızlı ayırma için tasarlanmış bir saflaştırma tekniğidir ve 50–200 psi'de basınçlı gaz ve mobil fazın yüksek akış hızlarında (250 ml/dk) kullanılması ile geleneksel kolon kromatografisi tekniğinden farklılaşmaktadır. Kolon kromatografisi sistemlerinde yer çekimi ile bir hareket söz konusu iken flaş kromatografi sistemlerinde hava basıncının etkisi ile hızlı saflaştırma elde edilmektedir. Şekil 1.2 ve Şekil 1.3'de gösterildiği üzere flaş kromatografi sistemlerinde çeşitli ebatlarda paketlenmiş silika-jel veya ters faz içerikli kartuşlar, pompa ünitesi, eluent toplamak için fraksiyon ünitesi, enjeksiyon sistemi, dedektörler (UV, ELSD) gibi sıvı kromatografisi sistemlerinde yer alan parçalardan oluşmaktadır.



Şekil 1.2. Flash kromatografi genel diyagramı.

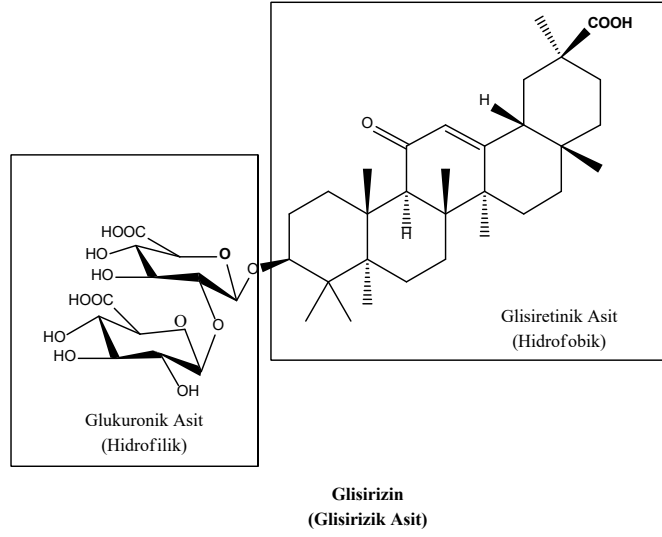


Şekil 1.3. Flash kromatografi cihazı.

Genellikle yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) için hazırlık aşaması olarak kullanılmaktadır. Flash kromatografisi, saflaştırılmış bileşenlerin elde edilmesini hızlı bir şekilde sağlar ve özellikle ilaç keşfi, protein saflaştırma ve doğal ürünlerin izolasyonu gibi alanlarda sıklıkça kullanılır. [28]

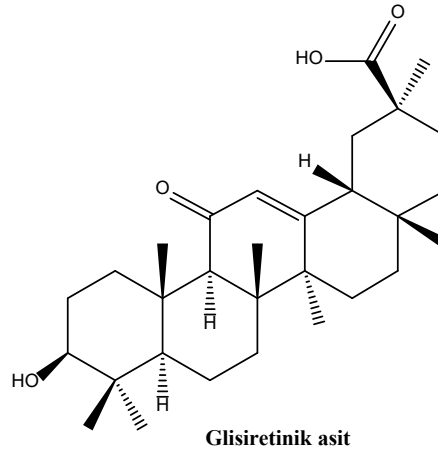
1.4. GLİSİRİZİN (GLİSİRİZİK ASİT) VE KULLANIMI

Glisirizin ($C_{42}H_{62}O_{16}$) ve glisirizin amonyum tuzu ($C_{42}H_{65}NO_{16}$) meyan kökünden (*Glycyrrhiza glabra*) elde edilen bir pentasiklik triterpen saponindir. Glisirizin molekülünü incelediğimiz zaman iki kısımdan meydana geldiği, Şekil 1.4’de görülmektedir.



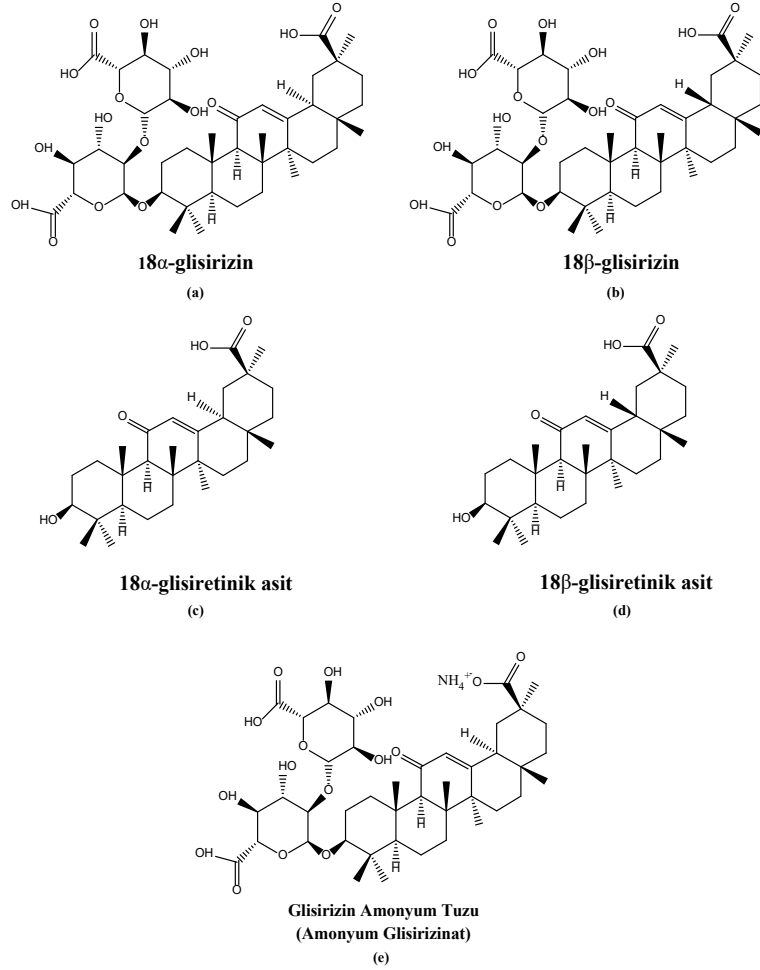
Şekil 1.4. Glisirizin molekülünün kimyasal yapısı.

Glisirizin, amfifilik özellik gösteren bir moleküldür. Moleküle tatlandırıcı özelliği veren glukuronik asit kısmı (glikon) hidrofilik, glisiretinik asit kısmı (aglikon) ise hidrofobik özellik göstermektedir. Şekil 1.5’te gösterilen ana iskelet yapı olan glisiretinik asit kısmıdır. Glisirizinin asit hidrolizi ile elde edilen glisiretinik asidin iki izomer formu bulunmaktadır; 18α -glisiretinik asit ve 18β -glisiretinik asit. Hem glisirizin hem de glisiretinik asit biyoaktif özellik gösteren meyan kökü ekstraktlarının ana bileşenleridir.



Şekil 1.5. Glisiretinik asit kimyasal yapısı.

Glisirizinin bağırsakta emilimi sonucu glisiretinik aside dönüştüğü bilinmektedir [29]. Şekil 1.6’da glisirizin ve türevlerinin kimyasal yapıları a) 18 α -glisirizin b) 18 β -glisirizin c) 18 α -glisiretinik asit d) 18 β -glisiretinik asit e) glisirizin amonyum tuzu olmak üzere gösterilmiştir.



Şekil 1.6. Glisirizin ve türevlerinin kimyasal yapıları a) 18 α -glisirizin b) 18 β -glisirizin c) 18 α -glisiretinik asit d) 18 β -glisiretinik asit e) glisirizin amonyum tuzu.

Yapılan çalışmalarda 4 hafta boyunca haftada üç kez 240 mg’lık glisiretinik asit intravenöz olarak verildiğinde insanlarda herhangi bir yan etkiye neden olmadığı tespit edilmiştir [30]. Glisiretinik asit molekülü de biyoaktif bir bileşendir ve anti-kanser, anti-inflamatuar, anti-viral, anti-diyabetik terapötik etkilere sahiptir [30], [31].

Glisirizin oral ve intravenöz yollar ile vücuda alınabilmektedir lakin bağırsaktan emilimi oldukça zayıftır, bağırsakta hidrolize uğramasıyla birlikte hidroliz ürünü olan glisiretinik aside dönüşerek emilimi sağlanır. Bu sebeple suda çözünebilir amonyum veya potasyum tuzlarına dönüştürülerek daha etkili biyoyararlanımı sağlanmıştır [32].

Japonya’da yaklaşık 40 yıldır akciğer kanseri tedavisinde ve kronik hepatit tedavisinde kullanılmaktadır. İntravenöz ve oral uygulama tedavi yöntemleri olarak kullanılmaktadır ayrıca intravenöz tedavi yöntemi ile farklı tipteki hepatit türlerine karşı etkilidir. Genellikle güvenli bir dozaj ve tüketim şekli 30-150 mg arasındadır. Günlük 30 mg’lık bir doz, genellikle önerilen en düşük dozdur ve 150 mg günlük doz, genellikle önerilen en yüksek dozdur [33].

Antik çağdan günümüze çeşitli hastalıkların tedavisinde bitkisel kaynaklı tedavi kültürü uygulanmaya devam etmektedir. Sanayileşme devrimi ile gelişen kimya ve ilaç endüstrisi bitkiler yerine sentetik ürünlerin kullanımını yaygın ve ekonomik bir hale getirmiştir. Günümüzde ise çoğu kimyasalın çevresel etkileri ve insana olan kanserojen etkileri tartışma konusudur. Yapılan araştırmalarda ekolojik ve insana olan etkileri araştırılmaktadır ve belirli kimyasallara kısıtlamalar getirilmektedir. Bu durum tekrardan yeni alternatif ürünlere yönelmeye yol açmıştır. Bunun sonucunda bitkisel kaynaklı ürünlere tedaviyi destekleme amaçlı yönelme söz konusudur.

Koronavirüs pandemisinde etkin aşı veya ilaç gruplarının üretilmesine kadar geçen süre de bitkisel kaynaklı yardımcı alternatif tıp büyük ilgi görmüştür. Bitkileri bu değerli önemli kılan ise değerli fitokimyasalları içermekte olmalarıdır. Yapılan birçok araştırmalarda elde edilen veriler bitkisel içerikli ürünlerin genel sağlığı korumak ve iyileştirmek, besin takviyesi ve hastalıklardan korunmak amacıyla kullanıldığı gözlenmiştir. Son derece yaygın bir şekilde kullanılmalarına rağmen pek çok bitkisel ürünün etkisi henüz tam olarak kanıtlanmamıştır ve bu alanlarda bilimsel veri eksikliği göze çarpmaktadır. Standardize edilmiş ürünlerin hekim kontrolünde kullanımı sağlık açısından çok derece önemlidir.

Kimyager Paracelsus’un sözünde değindiği üzere “İlacı, zehirden ayıran dozdur.” Bir ilacın ya da etken maddeye sahip olan bitkisel bir ürünün zararlı, etkisiz veya etkili denilebilmesi için önce o ürünün/etken maddenin hastalığın hangi evresinde, hangi doz aralığında ve hangi sıklıkta verilmesinin araştırılması ve belirlenmesi gerekmektedir. Sistematik ve standardize bir üretim prosedürüne sahip olması gerekmektedir. Tıbbi sentetik ilaçların yan etkileri olabildiği gibi bitkisel ürünlerinde yan etkilere veya kullanılan ilaç gruplarıyla farmakolojik etkileşimlere girebileceği göz ardı edilmelidir.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu tez çalışmasında, ekstraksiyon ve analiz işlemleri HPLC grade saflıkta çözücüler ile gerçekleştirilmiştir. Solvent evaporasyonu Heidolph Hei-Vap Value HL/G1 marka Rotary Evaporatör ile gerçekleştirilmiştir. HPLC analizleri Shimadzu markalı LC-20AT model cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Flash kromatografi çalışmaları Buchi Pure C850-FlashPrep cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Liyofilize işlemleri Christ Alpha 1-2 LD plus cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Kütle ölçümleri Shimadzu markalı LC-MS/MS-8030 Plus ile gerçekleştirilmiştir. NMR ölçümleri JEOL ECZ500R cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Araştırmada kullanılan meyan kökü (*Glycyrrhiza glabra*) örnekleri Aydın ilinin İncirliova ilçesine bağlı Gerenkova köyünde ekimini ve hasadını gerçekleştiren çiftçiden gölgede kurutulmuş ve öğütülmüş formda temin edilmiştir.

En uygun ekstraksiyon ve saflaştırma metodolojisini belirlemek için literatür taramaları göz önünde bulundurularak temin edilen meyan kökü tozuna ekstraksiyon denemeleri gerçekleştirilmiştir.

2.1. EKSTRAKSİYON DENEMELERİ

Çalışmada uygun olan ekstraksiyon metodunun belirlenmesi amacı ile;

1. Asidik ortam
2. Bazik ortam
3. Ultrasonik Ekstraksiyon
4. Hekzan ile safsızlık giderimi
5. Hekzan ve adsorban uygulaması
6. İkili ve üçlü solvent uygulaması
7. Refluks sisteminde ve oda sıcaklığında ekstraksiyon yöntemleri uygulanmış ve etkileri kıyaslanmıştır. Elde edilen sonuçlar HPLC analizi ile değerlendirilerek uygun ekstraksiyon metodu belirlenmiştir. Çizelge 2.1'de gerçekleştirilen ekstraksiyon çalışmalarının detayları verilmiştir.

Çizelge 2.1. Gerçekleştirilen ekstraksiyon denemeleri.

TEZDE BÖLÜMÜ	MEYAN KÖKÜ (Gram)	ÇÖZÜCÜ (v/v)	SÜRE (Saat)	SICAKLIK (°C)	YÖNTEM	ORAN
2.1.1	10	99 ml Etanol ve 1 ml Asetik Asit	2	25	Karıştırma	1:10
2.1.2	10	97 ml Etanol ve 3 ml Amonyak	2	25	Karıştırma	1:10
2.1.3	10	100 ml Etanol	2	25	Karıştırma	1:10
2.1.4	10	100 ml Etanol	2	25	Ultrasonik	1:10
2.1.5	10	30 ml Hekzan / 100 ml Etanol/ 0,5 g Silika 60	30dk- 2-30 dk	25	Karıştırma	1:10
2.1.6	10	30 ml Hekzan / 100 ml Etanol/ 0,5 g Aktif Karbon	30dk- 2-30 dk	25	Karıştırma	1:10
2.1.7	10	30 ml Hekzan / 100 ml Etanol/ 0,5 g Ultra Kaolin	30dk- 2-30 dk	25	Karıştırma	1:10
2.1.8	10	30 ml Hekzan / 100 ml Etanol	30dk- 2-	25	Karıştırma	1:10
2.1.9	10	%100 Etanol	2	75	Reflüks	1:10
2.1.10	10	Su / Etanol (70:30)	2	105	Reflüks	1:10
2.1.11	10	Su / Etanol (70:30)	2	<50	Karıştırma	1:10
2.1.12	10	Metanol/Etanol/Su (70:20:10)	2	<50	Karıştırma	1:10

2.1.1. Asidik Ortam Ekstraksiyonu

10 g meyan kökü tozu ile %1'lik asetik asit içeren 100 ml etanol çözeltisi (v/v) 25°C'de 2 saat boyunca karıştırıldı. Süzme işlemi gerçekleştirildi ve katı posa ayrıldı. Elde edilen ekstrakt evapore edildi. Elde edilen katı ekstrakt, 10 ml metanol ile çözdürüldü ve 0,45 µm PTFE filtreden süzüldü ve viallendi. Analiz çalışmalarına kadar -20°C'de saklanmıştır. Analiz sonuçları bölüm 3.1.2.1'de yer almaktadır.

2.1.2. Bazik Ortam Ekstraksiyonu

10 g meyan kökü tozu ile %3'lük amonyak içeren 100 ml etanol çözeltisi (v/v) 25°C'de

2 saat boyunca karıştırıldı. Süzme işlemi gerçekleştirildi ve katı posa ayrıldı. Elde edilen ekstrakt evapore edildi. Elde edilen katı ekstrakt, 10 ml metanol ile çözdürüldü ve 0,45 µm PTFE filtreden süzüldü ve viallendi. Analiz çalışmalarına kadar -20°C’de saklanmıştır. Analiz sonuçları bölüm 3.1.2.2’de yer almaktadır.

2.1.3. Etanol Ekstraksiyonu

10 g meyan kökü tozu ile 100 ml etanol çözücüsü 25°C’de 2 saat boyunca karıştırıldı. Süzme işlemi gerçekleştirildi ve katı posa ayrıldı. Elde edilen ekstrakt evapore edildi. Elde edilen katı ekstrakt, 10 ml metanol ile çözdürüldü ve 0,45 µm PTFE filtreden süzüldü ve viallendi. Analiz çalışmalarına kadar -20°C’de saklanmıştır. Analiz sonuçları bölüm 3.1.2.3’te yer almaktadır.

2.1.4. Ultrasonik Destekli Etanol Ekstraksiyon

10 g meyan kökü tozu ile 100 ml etanol çözücüsü 25°C’de 2 saat boyunca ultrasonik ekstraksiyon uygulandı. Süzme işlemi gerçekleştirildi ve katı posa ayrıldı. Elde edilen ekstrakt evapore edildi. Elde edilen katı ekstrakt, 10 ml metanol ile çözdürüldü ve 0,45 µm PTFE filtreden süzüldü ve viallendi. Analiz çalışmalarına kadar -20°C’de saklanmıştır. Analiz sonuçları bölüm 3.1.2.4’te yer almaktadır.

2.1.5. Hekzan İle Ön Yıkama ve Silika 60 Adsorbanı Uygulaması

10 g meyan kökü tozu ile 30 ml hekzan çözücüsü 25°C’de 30 dakika boyunca karıştırıldı. Süzme işlemi gerçekleştirildi ve hekzan fazı ayrıldı. Ön yıkama işlemi uygulanan katı posa ile 100 ml etanol çözücüsü 25°C’de 2 saat boyunca karıştırıldı. Süzme işlemi gerçekleştirildi ve katı posa ayrıldı. Süzüntüye 0,5 g Silika 60 adsorbanı eklendi ve 25°C’de 30 dakika boyunca karıştırıldı. Adsorban süzülerek ayrıldı ve süzüntü ekstrakt evapore edildi. Elde edilen katı ekstrakt, 10 ml metanol ile çözdürüldü ve 0,45 µm PTFE filtreden süzüldü ve viallendi. Analiz çalışmalarına kadar -20°C’de saklanmıştır. Analiz sonuçları bölüm 3.1.2.5’te yer almaktadır.

2.1.6. Hekzan İle Ön Yıkama ve Aktif Karbon Adsorbanı Uygulaması

10 g meyan kökü tozu ile 30 ml hekzan çözücüsü 25°C’de 30 dakika boyunca karıştırıldı. Süzme işlemi gerçekleştirildi ve hekzan fazı ayrıldı. Ön yıkama işlemi uygulanan katı posa ile 100 ml etanol çözücüsü 25°C’de 2 saat boyunca karıştırıldı. Süzme işlemi gerçekleştirildi ve katı posa ayrıldı. Süzüntüye 0,5 g aktif karbon

adsorbanı eklendi ve 25°C’de 30 dakika boyunca karıştırıldı. Adsorban süzülerek ayrıldı ve süzüntü ekstrakt evapore edildi. Elde edilen katı ekstrakt, 10 ml metanol ile çözdürüldü ve 0,45 µm PTFE filtreden süzüldü ve viallendi. Analiz çalışmalarına kadar -20°C’de saklanmıştır. Analiz sonuçları bölüm 3.1.2.6’da yer almaktadır.

2.1.7. Hekzan İle Ön Yıkama ve Ultra Kaolin Adsorbanı Uygulaması

10 g meyan kökü tozu ile 30 ml hekzan çözücüsü 25°C’de 30 dakika boyunca karıştırıldı. Süzme işlemi gerçekleştirildi ve hekzan fazı ayrıldı. Ön yıkama işlemi uygulanan katı posa ile 100 ml etanol çözücüsü 25°C’de 2 saat boyunca karıştırıldı. Süzme işlemi gerçekleştirildi ve katı posa ayrıldı. Süzüntüye 0,5 g ultra kaolin adsorbanı eklendi ve 25°C’de 30 dakika boyunca karıştırıldı. Adsorban süzülerek ayrıldı ve süzüntü ekstrakt evapore edildi. Elde edilen katı ekstrakt, 10 ml metanol ile çözdürüldü ve 0,45 µm PTFE filtreden süzüldü ve viallendi. Analiz çalışmalarına kadar -20°C’de saklanmıştır. Analiz sonuçları bölüm 3.1.2.7’de yer almaktadır.

2.1.8. Hekzan İle Ön Yıkama ve Etanol Ekstraksiyonu

10 g meyan kökü tozu ile 30 ml hekzan çözücüsü 25°C’de 30 dakika boyunca karıştırıldı. Süzme işlemi gerçekleştirildi ve hekzan fazı ayrıldı. Ön yıkama işlemi uygulanan katı posa ile 100 ml etanol çözücüsü 25°C’de 2 saat boyunca karıştırıldı. Süzme işlemi gerçekleştirildi ve katı posa ayrıldı. Elde edilen ekstrakt evapore edildi. Elde edilen katı ekstrakt, 10 ml metanol ile çözdürüldü ve 0,45 µm PTFE filtreden süzüldü ve viallendi. Analiz çalışmalarına kadar -20°C’de saklanmıştır. Analiz sonuçları bölüm 3.1.2.8’de yer almaktadır.

2.1.9. Etanol Ekstraksiyonu (Refluks)

10 g meyan kökü tozu ile 100 ml etanol çözücüsü 2 saat boyunca refluks ekstraksiyonu uygulandı. Süzme işlemi gerçekleştirildi ve katı posa ayrıldı. Elde edilen ekstrakt evapore edildi. Elde edilen katı ekstrakt, 10 ml metanol ile çözdürüldü ve 0,45 µm PTFE filtreden süzüldü ve viallendi. Analiz çalışmalarına kadar -20°C’de saklanmıştır. Analiz sonuçları bölüm 3.1.2.9’da yer almaktadır.

2.1.10. Saf Su / Etanol (70:30) Ekstraksiyonu

10 g meyan kökü tozu ile 100 ml saf su/etanol (70:30, v/v) çözücüsü 25°C’de 2 saat boyunca karıştırıldı. Süzme işlemi gerçekleştirildi ve katı posa ayrıldı. Elde edilen

ekstrakt evapore edildi. Elde edilen katı ekstrakt, 10 ml metanol ile çözdürüldü ve 0,45 µm PTFE filtreden süzüldü ve viallendi. Analiz çalışmalarına kadar -20°C’de saklanmıştır. Analiz sonuçları bölüm 3.1.2.10’da yer almaktadır.

2.1.11. Saf Su / Etanol (70:30) Ekstraksiyonu (Refluks)

10 g meyan kökü tozu ile 100 ml saf su / etanol (70:30, v/v) çözücüsü 2 saat boyunca refluks ekstraksiyonu uygulandı. Süzme işlemi gerçekleştirildi ve katı posa ayrıldı. Elde edilen ekstrakt evapore edildi. Elde edilen katı ekstrakt, 10 ml metanol ile çözdürüldü ve 0,45 µm PTFE filtreden süzüldü ve viallendi. Analiz çalışmalarına kadar -20°C’de saklanmıştır. Analiz sonuçları bölüm 3.1.2.11’de yer almaktadır.

2.1.12. Metanol / Etanol / Saf Su (70:20:10) Ekstraksiyonu

10 g meyan kökü tozu ile 100 ml metanol/etanol/saf su (70:20:10, v/v/v) çözücüsü 40°C’de 2 saat boyunca karıştırıldı. Süzme işlemi gerçekleştirildi ve katı posa ayrıldı. Elde edilen ekstrakt evapore edildi. Elde edilen katı ekstrakt, 10 ml metanol ile çözdürüldü ve 0,45 µm PTFE filtreden süzüldü ve viallendi. Analiz çalışmalarına kadar -20°C’de saklanmıştır. Analiz sonuçları bölüm 3.1.2.12’de yer almaktadır.

2.2. GELİŞTİRİLMİŞ EKSTRAKSİYON METODU

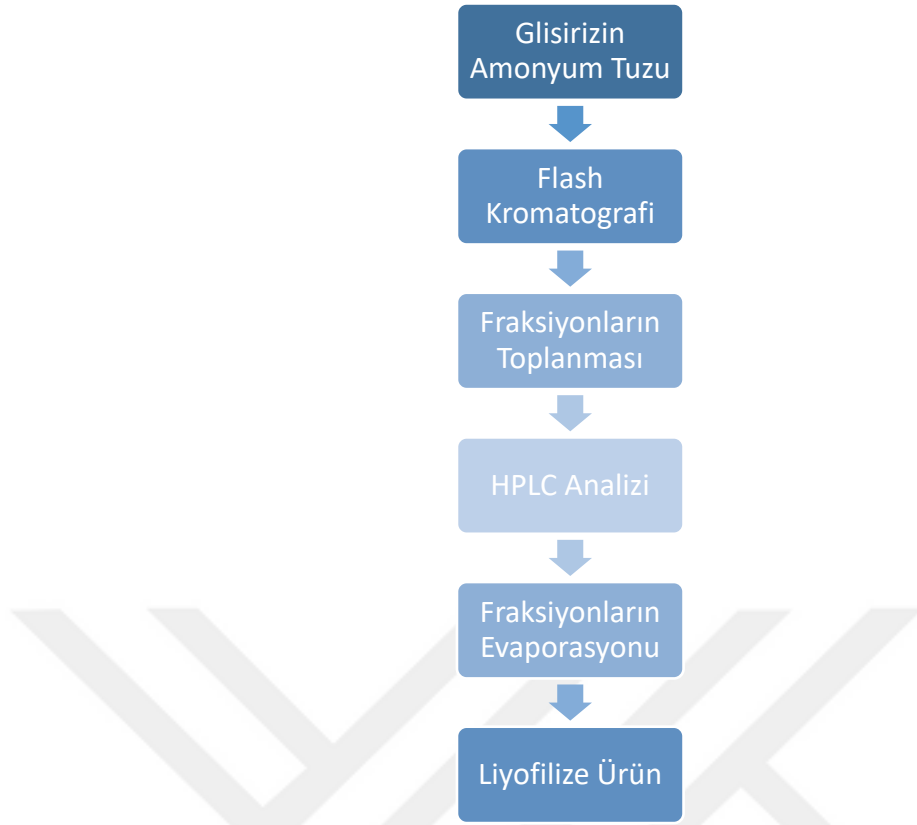
100 g meyan kökü tozu ile 500 ml aseton çözücüsü 25°C’de 30 dakika boyunca karıştırıldı. Boyar madde giderimi sağlanması amacıyla bu işlem gerçekleştirildi. Ardından süzme işlemi uygulanarak posa ayrıldı. Aseton fazı atıldı ve meyan kökü posasına metanol/etanol/su (7:2:1, v/v/v) çözeltisi eklenerek 40°C’de 2 saat boyunca ekstraksiyon işlemi gerçekleştirildi. Süzme işlemi uygulanarak posa atıldı ve ekstrakt çözeltisi ayrıldı. Ekstrakt çözeltisi 15 dakika boyunca 1 g biyokömür (biochar) adsorbanı ile muamele edildi. Akabinde tekrardan süzme işlemi gerçekleştirildi ve adsorban madde ayrıldı. Berrak bir çözelti halini alan ekstraksiyon çözeltisine 1 M HCl-H₂SO₄ asit çözeltisi eklenerek pH asidik ortama düşürüldü ve 15 dakika karıştırıldı. Akabinde pH düzenlemesi tekrardan yapılarak ekstraksiyon çözeltisinin pH’ını yükseltmek amacıyla amonyak ve amonyum klorür tampon çözeltisi eklendi. Amonyak/amonyum klorür tampon çözeltisi eklenmeye başlanması ile glisirizin amonyum tuzunu içermekte olan katı madde çökmeye başladı. Glisirizin amonyum tuzunun çökme işleminin tamamlanması için bırakıldı. Çökme işlemi tamamlandıktan

sonra ise katı madde süzülerek ayrıldı ve vakumlu etüvde kurutuldu. Elde edilen glisirizin amonyum tuzu katısı tekrardan boyar madde giderimi ve diğer safsızlıkların giderimi için aseton ve etil asetat çözücülerini ile 15 dakika boyunca karıştırıldı. Safsızlık giderimi uygulanan madde görsel olarak koyu sarı renkten açık bej renge dönüştü. Bu basamak ile safsızlık giderimi sağlanan glisirizin amonyum tuzu katısı ultra saf su ile çözündürme işlemi gerçekleştirilerek Flash kromatografi saflaştırılması için hazırlandı. Flash kromatografi cihazı ile fraksiyonları toplandı. Toplanan fraksiyonların HPLC analizi gerçekleştirildi. HPLC analizi sonucu glisirizin amonyum tuzu içeren fraksiyonlar birleştirildi ve evapore edildi. Elde edilen glisirizin katısı ultra saf suda çözündürüldü ve liyofilize işlemi gerçekleştirildi.

Aseton ve etil asetat fazına glisirizin maddesi geçmemektedir. Saflaştırma basamaklarında bu çözeltiler boyar madde giderimi için kullanılmaktadır. Çalışmamızda saflaştırma basamaklarında bazık çöktürme gerçekleştirilerek amonyum tuzu formuna getirmiş olduğumuz glisirizini diğer safsızlıklardan ayırmaktayız. Akabinde flash kromatografi işlemi gerçekleştirilerek zenginleştirme işlemini sağlamış bulunmaktayız. Şekil 2.1 ve Şekil 2.2’de ekstraksiyon ve saflaştırma basamakları şematik olarak gösterilmiştir.

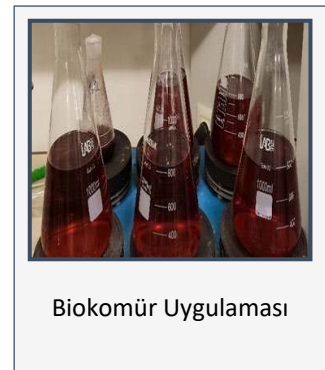


Şekil 2.1. Meyan kökü ekstraksiyonu ve saflaştırma basamakları.

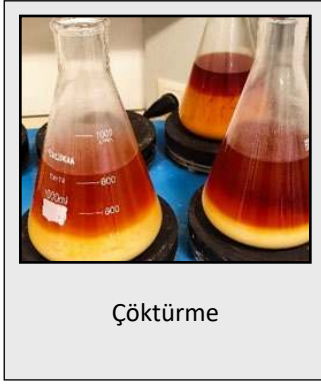


Şekil 2.2. Glisirizin amonyum tuzunun flash kromatografi ile zenginleştirilmesi.

Şekil 2.3'te Meyan köküne uygulanan ön yıkama, ekstraksiyon ve adsorban uygulaması basamakları, Şekil 2.4'de saflaştırma çalışmalarının basamakları ve Şekil 2.5'de ise flash kromatografi ile saflaştırılmış glisirizin amonyum tuzunun eldesi gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Ekstraksiyon çalışmalarının basamakları.



Şekil 2.4. Safflaştırma çalışmalarıının basamakları.



Şekil 2.5. Flash kromatografi ile saflaştırma basamakları.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. HPLC ANALİZ METODU

Çizelge 3.1’de HPLC analiz koşulları ve uygulanan gradient yürütme metodu ayrıntılı olarak verilmiştir. Çalışmalar ODS ve C18 kolonlarda gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.1. HPLC analiz metodu.
HPLC ANALİZ METODU KOŞULLARI

Kolon	C18 Kolon (4,6*250mm- 5,0 µm)
Akış Hızı	0,8 ml/dk
Kolon Sıcaklığı	30 °C
UV dalga boyu	254 nm
A Mobil Fazı	Asetonitril
B Mobil Fazı	Ultra saf su (1 L ultra saf suya 0,90 g potasyum fosfat monobazik eklenir.)
Metod Süresi	32 dakika

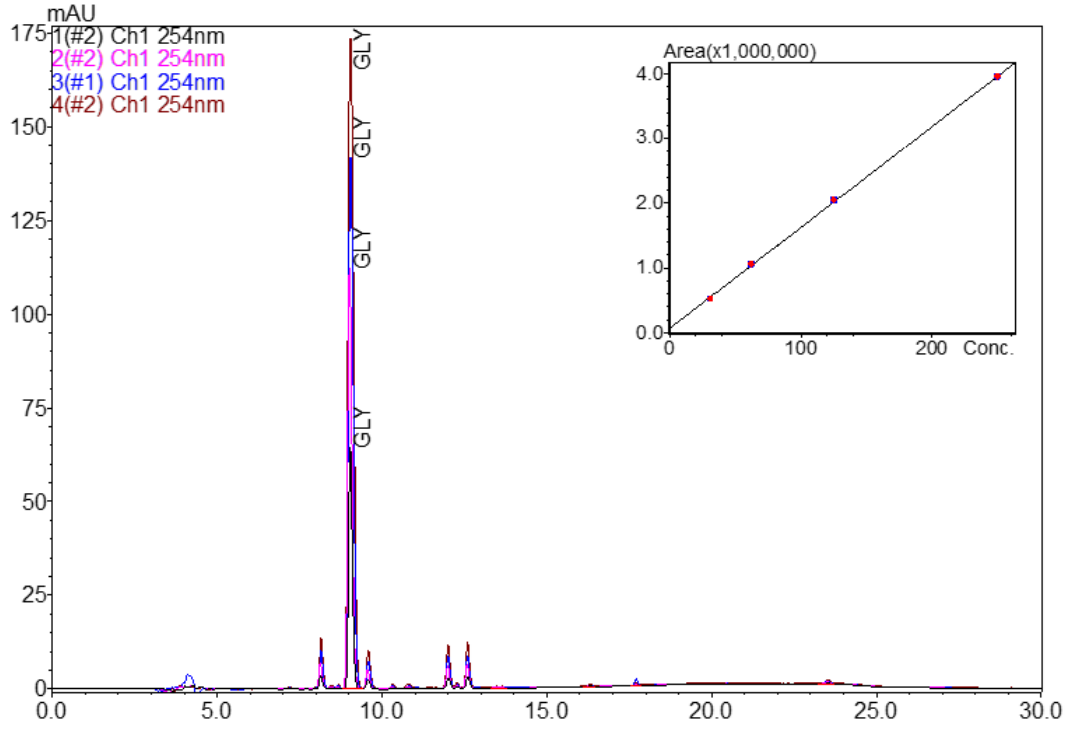
Gradient yürütme metodu uygulanmıştır.

Süre	A fazı	B fazı
0 (Başlangıç)	%25	%75
0-15	%75	%25
15-25	%75	%25
25-28	%25	%75
32	BİTİŞ	

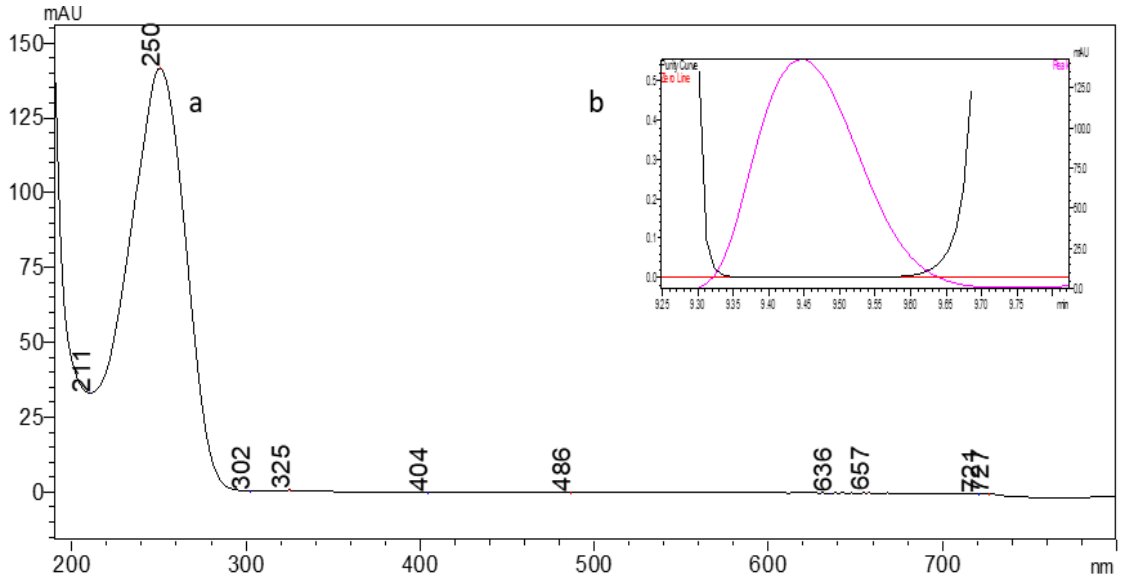
3.1.1. HPLC Standart Kalibrasyon Grafiği

Standart kalibrasyonu glisirizin amonyum standardı (>%80, Toronto Research Chemicals) metanol çözücü (%99,5, HPLC grade, ISOLAB) ile 31,25-62,5-125-250 ppm olarak hazırlanmıştır. $R^2 = 0,999$ ve %RSD: 3,358 değerleri olarak hesaplanmıştır ve spesifik dalga boyu 250 ± 1 nm olarak tespit edilmiştir.

Şekil 3.1’de glisirizin standardının HPLC kromatogramı verilmiştir. Şekil 3.2’de ise glisirizin standarda ait olan a) UV sepkrum taraması ve spesifik dalga boyu b) pik saflığıı içeren görsel bulunmaktadır.



Şekil 3.1. Standart çözeltilerin HPLC kromatogramı.

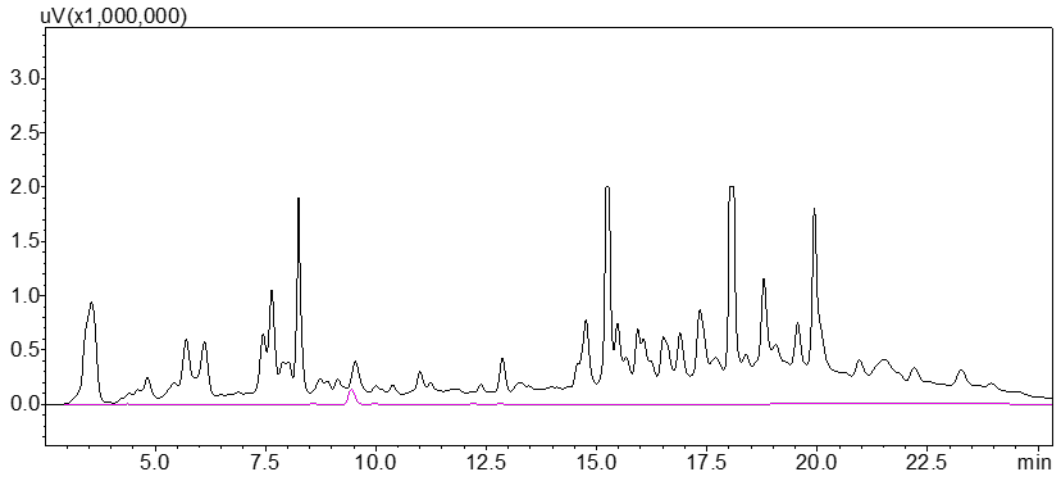


Şekil 3.2. Glisirizin standardının a) UV sepkrumu b) pik saflığıı.

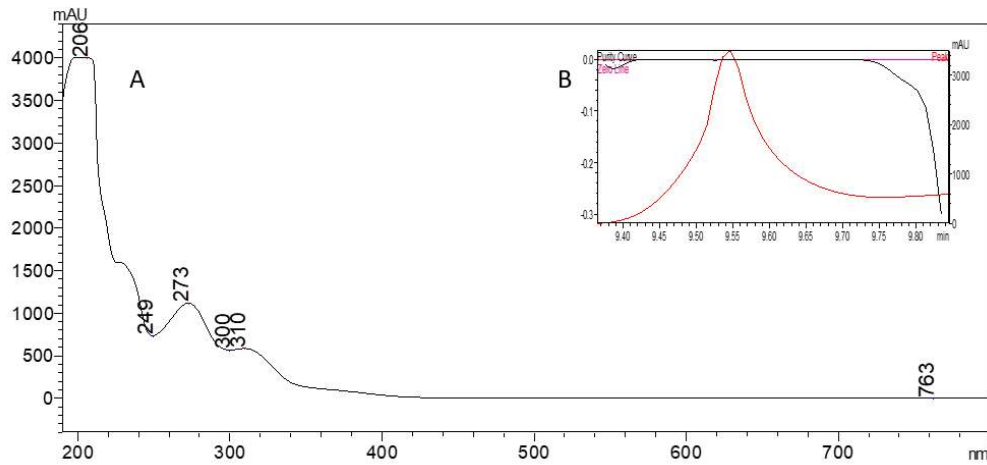
3.1.2. Ekstraksiyon Denemeleri HPLC Sonuçları

3.1.2.1. Asidik Ortam Ekstraksiyonu

Bölüm 2.1.1’de asidik ortam ekstraksiyon yöntemi anlatılan çalışmanın Şekil 3.3 ve Şekil 3.4’te HPLC kromatogramı ile UV spektrum taraması ve Çizelge 3.2’de miktar tayini sonuçları verilmiştir.



Şekil 3.3. Asidik ortam ekstraksiyonu (siyah) ve standart HPLC kromatogramı (pembe).



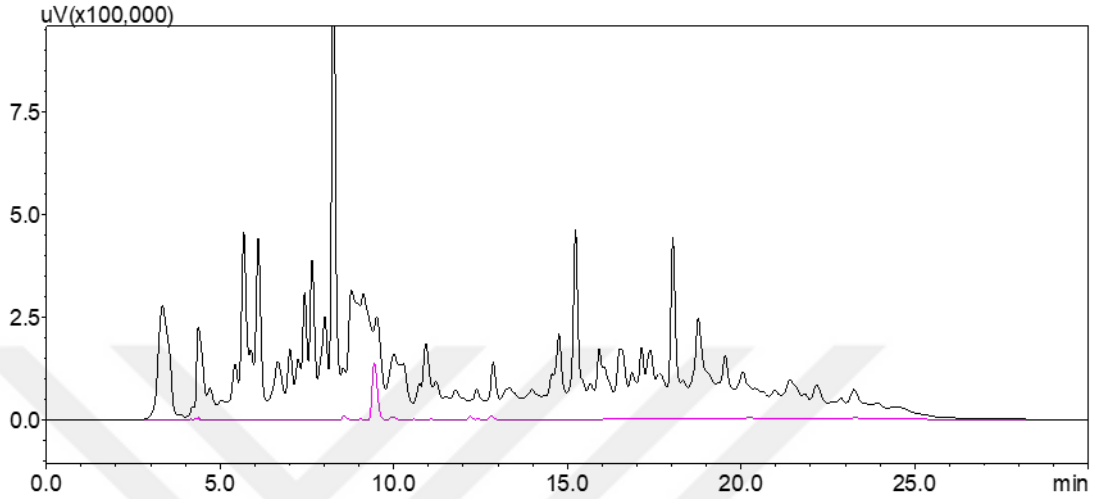
Şekil 3.4. Asidik ortam ekstraksiyonun a) UV spektrumu b) pik saflığı.

Çizelge 3.2. Asidik ortam ekstraksiyonun sonuçları.

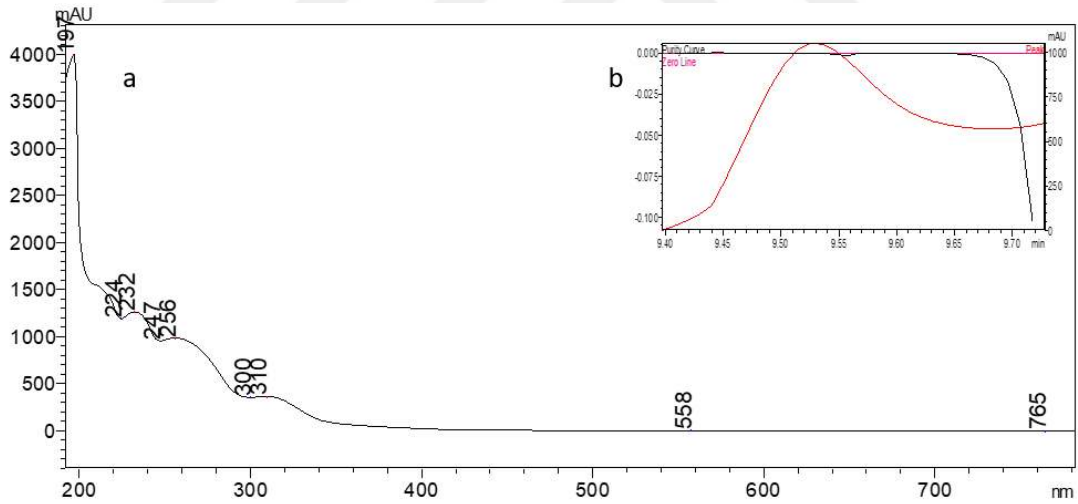
Çözücü	Pik Alanı	Glisirizin Miktar (mg/L, ppm)	Pik Saflığı
99 ml Etanol ve 1 ml Asetik Asit	5804111	368,92	0,36

3.1.2.2. Bazik Ortam Ekstraksiyonu

Bölüm 2.1.2’de bazik ortam ekstraksiyon yöntemi anlatılan çalışmanın Şekil 3.5 ve Şekil 3.6’da HPLC kromatogramı ile UV spektrum taraması ve Çizelge 3.3’te ise miktar tayini sonuçları verilmiştir.



Şekil 3.5. Bazik ortam ekstraksiyonu (siyah) ve standart HPLC kromatogramı (pembe)



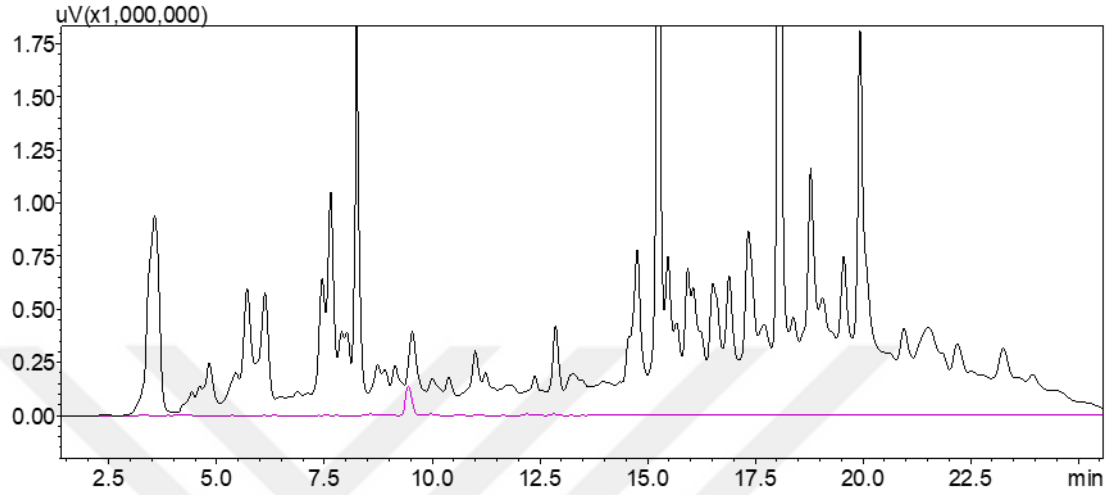
Şekil 3.6. Bazik ortam ekstraksiyonun a) UV spektrumu b) pik saflığı.

Çizelge 3.3. Bazik ortam ekstraksiyonun sonuçları.

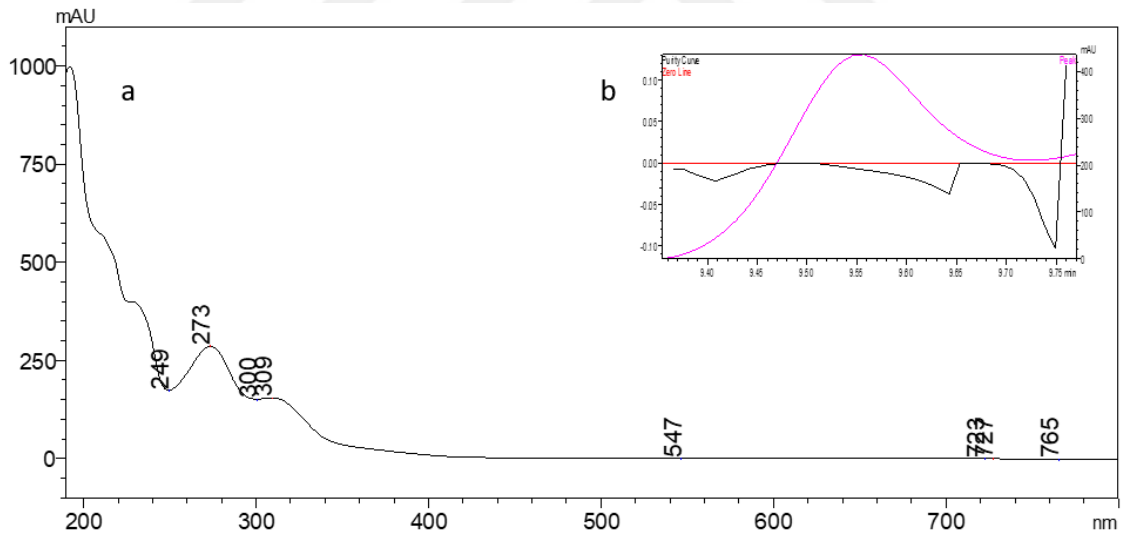
Çözücü	Pik Alanı	Glisirizin Miktar (mg/L, ppm)	Pik Saflığı
97 ml Etanol ve 3 ml Amonyak	3208729	201,84	0,88

3.1.2.3. Etanol Ekstraksiyonu

Bölüm 2.1.3'te etanol ekstraksiyonu yöntemi anlatılan çalışmanın Şekil 3.7 ve Şekil 3.8'de HPLC kromatogramı ile UV spektrum taraması ve Çizelge 3.4'te ise miktar tayini sonuçları verilmiştir.



Şekil 3.7. Etanol ekstraksiyonu (siyah) ve standart HPLC kromatogramı (pembe).



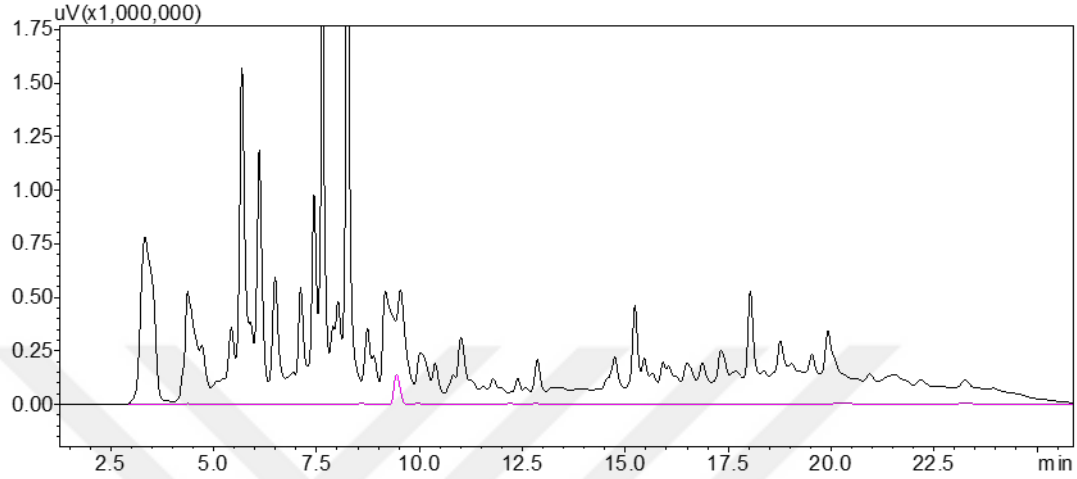
Şekil 3.8. Etanol ekstraksiyonun a) UV spektrumu b) pik saflığı.

Çizelge 3.4. Etanol ekstraksiyonun sonuçları.

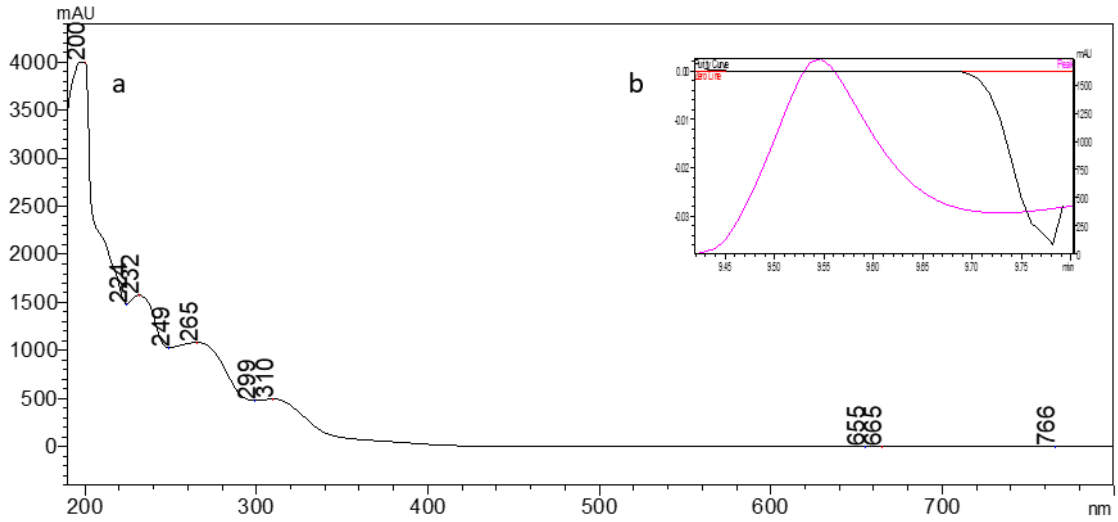
Çözücü	Pik Alanı	Glisirizin Miktar (mg/L, ppm)	Pik Saflığı
100 ml Etanol	1224515	74,10	0,83

3.1.2.4. Ultrasonik Destekli Etanol Ekstraksiyonu

Bölüm 2.1.4'te ultrasonik destekli etanol ekstraksiyonu yöntemi anlatılan çalışmanın Şekil 3.9 ve Şekil 3.10'da HPLC kromatogramı ile UV spektrumu ve Çizelge 3.5'de ise miktar tayini sonuçları verilmiştir.



Şekil 3.9. Ultrasonik destekli etanol ekstraksiyonu (siyah) ve standart HPLC kromatogramı (pembe).



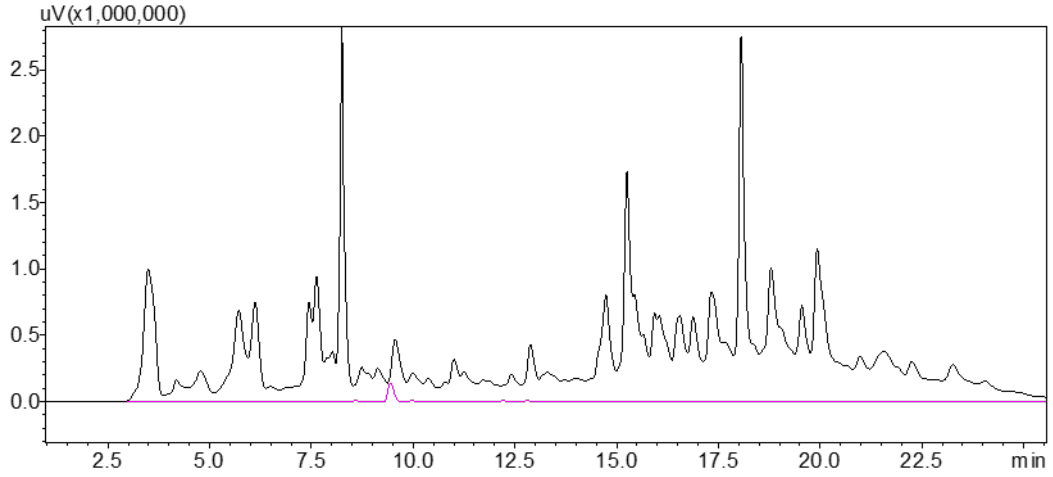
Şekil 3.10. Ultrasonik destekli etanol ekstraksiyonun a) UV spektrumu b) pik saflığı.

Çizelge 3.5. Ultrasonik destekli etanol ekstraksiyonun sonuçları.

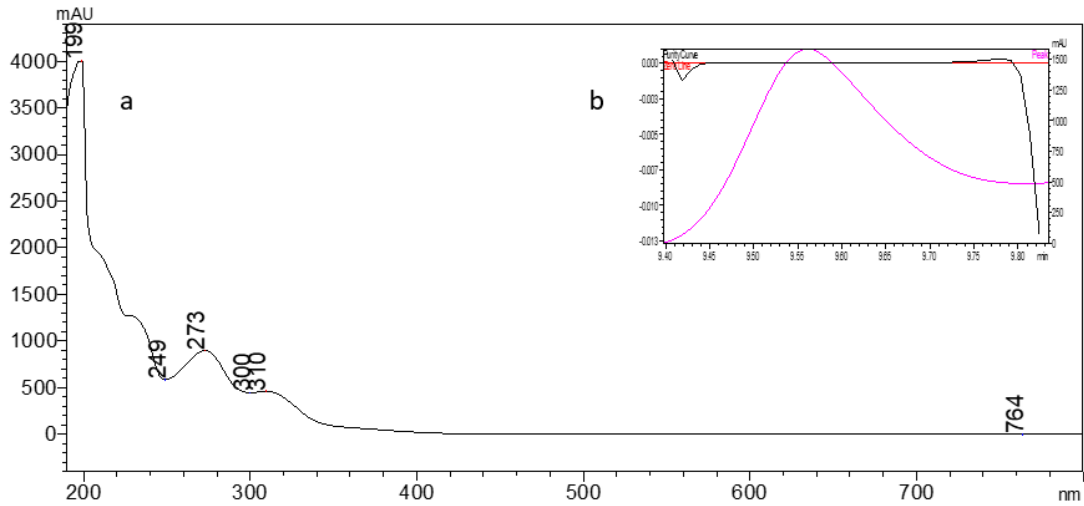
Çözücü	Pik Alanı	Glisirizin Miktar (mg/L, ppm)	Pik Saflığı
100 ml Etanol (Ultrasonik Ekstraksiyon)	4201806	265,77	0,95

3.1.2.5. Hekzan ile Ön Yıkama Ve Silika 60 Adsorbantı Uygulaması (H-Si60)

Bölüm 2.1.5'te ekstraksiyon yöntemi anlatılan çalışmanın Şekil 3.11 ve Şekil 3.12'de HPLC kromatogramı ile UV spektrumu ve Çizelge 3.6'da ise miktar tayini sonuçları verilmiştir.



Şekil 3.11. H-Si60 kodlu deneme (siyah) ve standart HPLC kromatogramı (pembe).



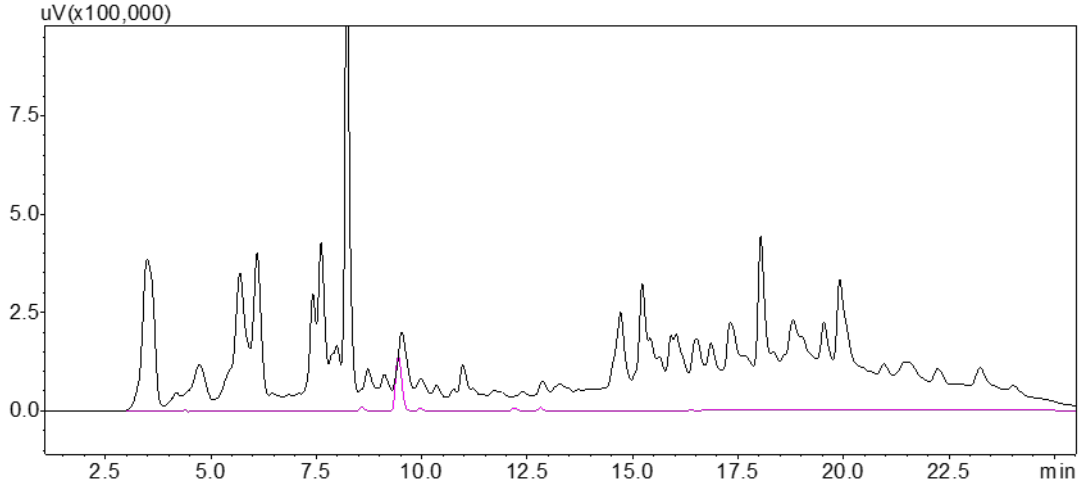
Şekil 3.12. H-Si60 kodlu deneme ekstraksiyonun a) UV spektrumu b) pik saflığı.

Çizelge 3.6. H-Si60 kodlu deneme ekstraksiyonun sonuçları.

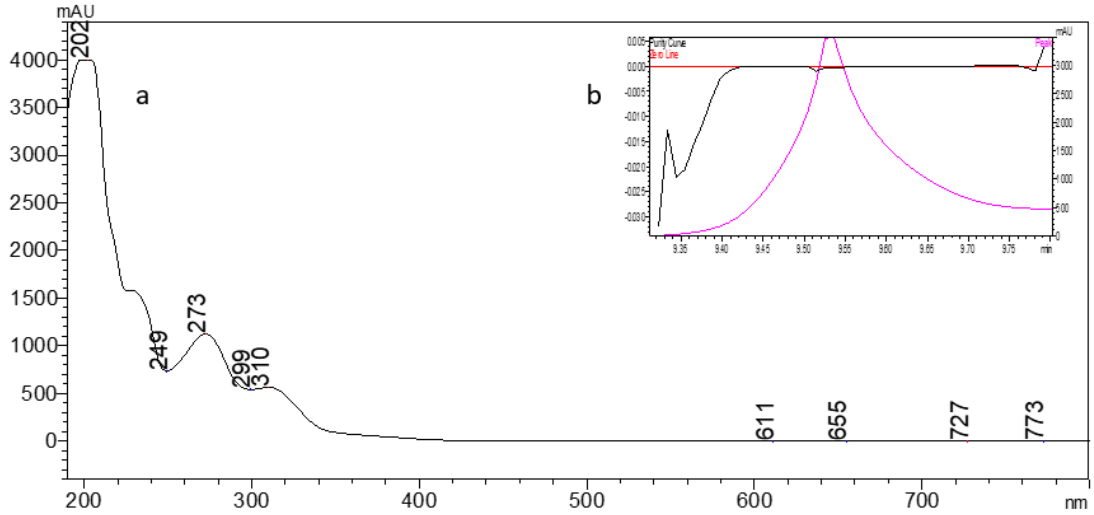
Çözücü	Pik Alanı	Glisirizin Miktar (mg/L, ppm)	Pik Saflığı
100 ml Etanol (Hekzan ve Silika 60 Uygulaması)	5353420	339,91	0,96

3.1.2.6. Hekzan ile Ön Yıkama Ve Aktif Karbon Adsorbanı Uygulaması (H-Aktif)

Bölüm 2.1.6’da ekstraksiyon yöntemi anlatılan çalışmanın Şekil 3.13 ve Şekil 3.14’te HPLC kromatogramı ile UV spektrumu ve Çizelge 3.7’de ise miktar tayini sonuçları verilmiştir.



Şekil 3.13. H-aktif kodlu deneme (siyah) ve standart HPLC kromatogramı (pembe).



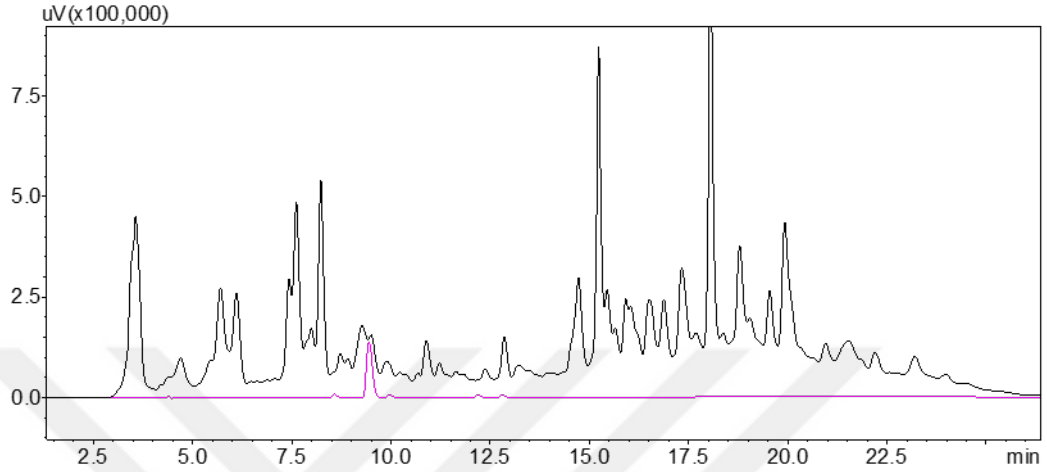
Şekil 3.14. H-aktif kodlu deneme ekstraksiyonun a) UV spektrumu b) pik saflığı.

Çizelge 3.7. H-aktif kodlu deneme ekstraksiyonun sonuçları.

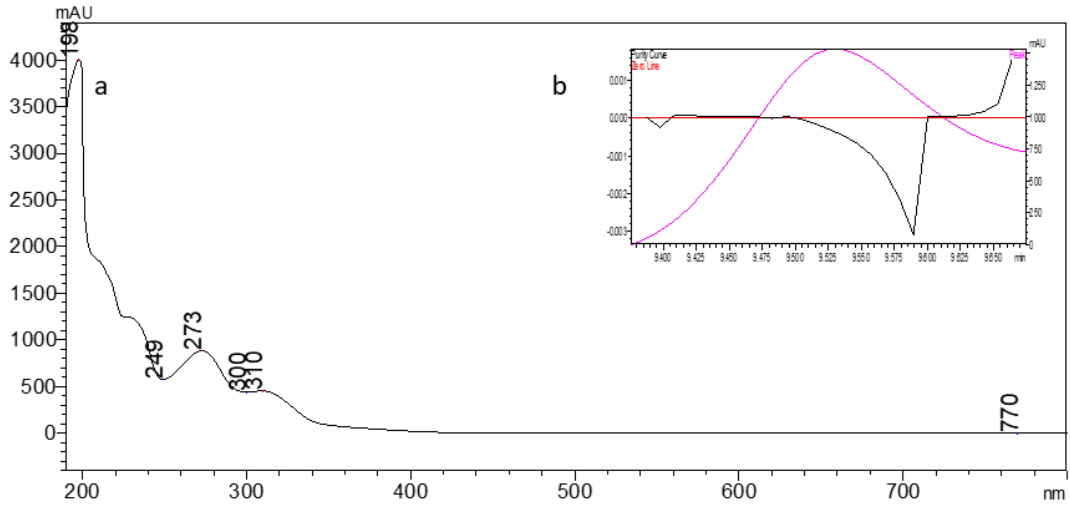
Çözücü	Pik Alanı	Glisirizin Miktar (mg/L, ppm)	Pik Saflığı
100 ml Etanol (Hekzan ve Aktif Karbon Uygulaması)	7873505	502,14	0,96

3.1.2.7. Hekzan ile Ön Yıkama Ve Ultra Kaolin Adsorbantı Uygulaması (H-Ultra)

Bölüm 2.1.7’de ekstraksiyon yöntemi anlatılan çalışmanın Şekil 3.15 ve Şekil 3.16’da HPLC kromatogramı ile UV spektrumu ve Çizelge 3.8’de ise miktar tayini sonuçları verilmiştir.



Şekil 3.15. H-ultra kodlu deneme (siyah) ve standart HPLC kromatogramı (pembe).



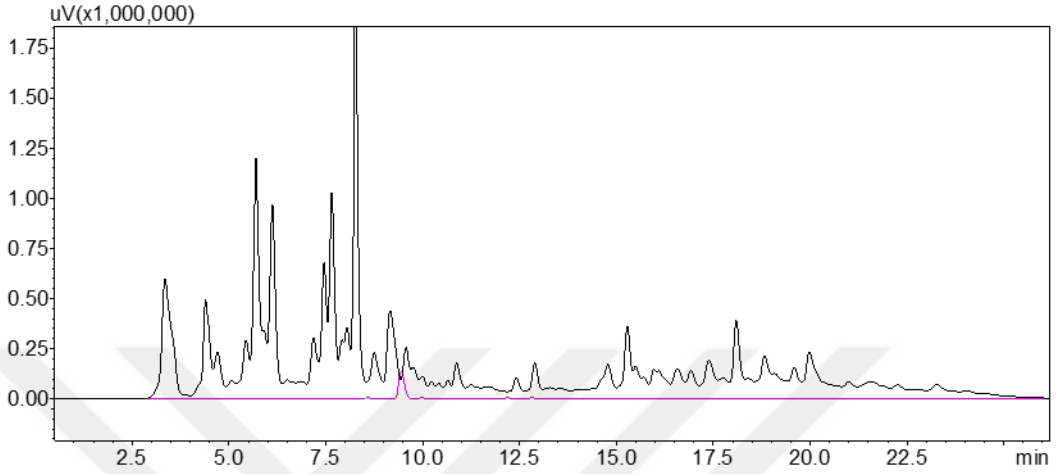
Şekil 3.16. H-ultra kodlu deneme ekstraksiyonun a) UV spektrumu b) pik saflığı.

Çizelge 3.8. H-ultra kodlu deneme ekstraksiyonun sonuçları.

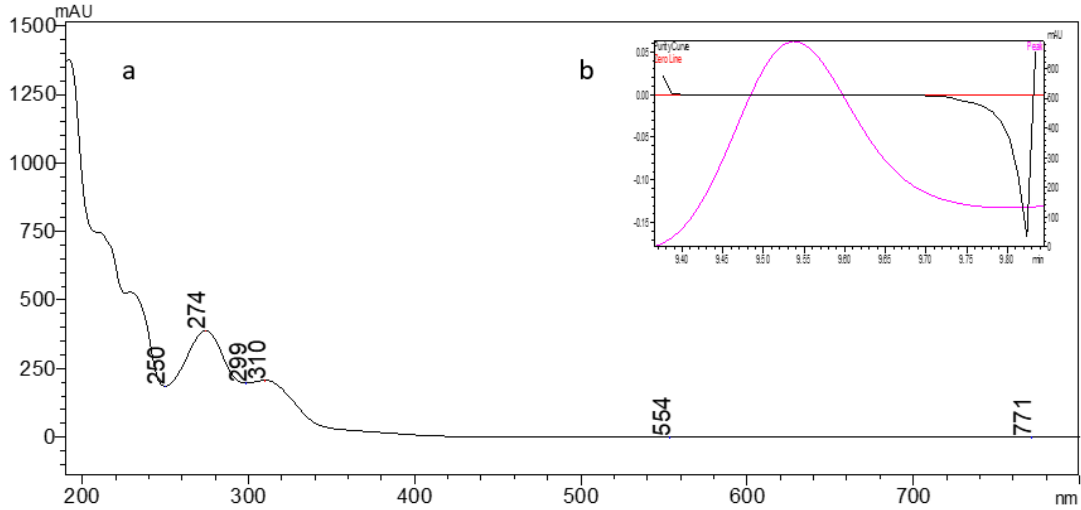
Çözücü	Pik Alanı	Glisirizin Miktar (mg/L, ppm)	Pik Saflığı
100 ml Etanol (Hekzan ve Ultra Kaolin Uygulaması)	1231384	74,54	0,58

3.1.2.8. Hekzan ile Ön Yıkama Ve Etanol Ekstraksiyonu Uygulaması (H-Etanol)

Bölüm 2.1.8’de ekstraksiyon yöntemi anlatılan çalışmanın Şekil 3.17 ve Şekil 3.18’de HPLC kromatogramı ile UV spektrumu ve Çizelge 3.9’da ise miktar tayini sonuçları verilmiştir.



Şekil 3.17. H-etanol kodlu deneme (siyah) ve standart HPLC kromatogramı (pembe).



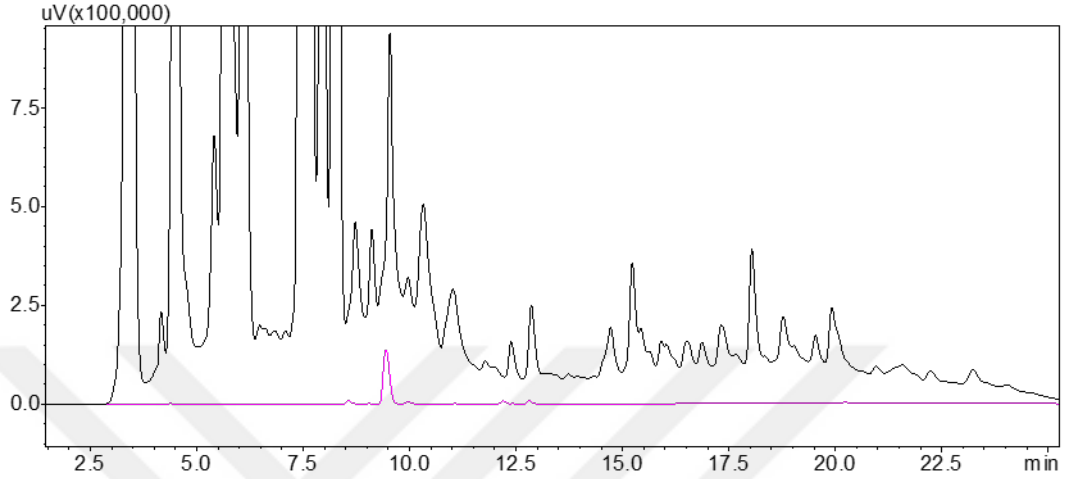
Şekil 3.18. H-etanol kodlu deneme ekstraksiyonun a) UV spektrumu b) pik saflığı.

Çizelge 3.9. H-etanol kodlu deneme ekstraksiyonun sonuçları.

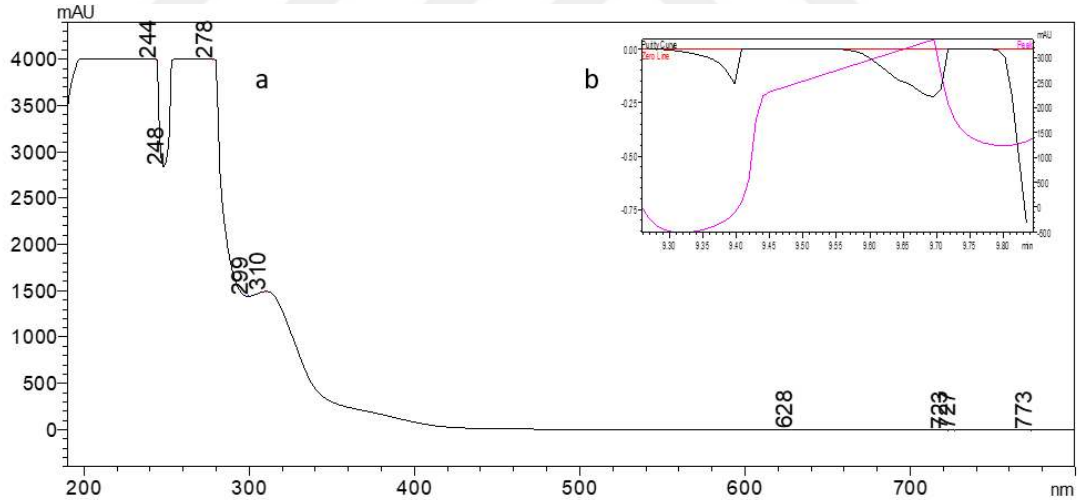
Çözücü	Pik Alanı	Glisirizin Miktar (mg/L, ppm)	Pik Saflığı
100 ml Etanol (Hekzan ile Ön Yıkama)	1912065	118,36	0,73

3.1.2.9. Etanol Ekstraksiyonu (Refluks)

Bölüm 2.1.9’de ekstraksiyon yöntemi anlatılan çalışmanın Şekil 3.19 ve Şekil 3.20’de HPLC kromatogramı ile UV spektrumu ve Çizelge 3.10’da ise miktar tayini sonuçları verilmiştir.



Şekil 3.19. Etanol ekstraksiyonu refluks (siyah) ve standart HPLC kromatogramı (pembe).



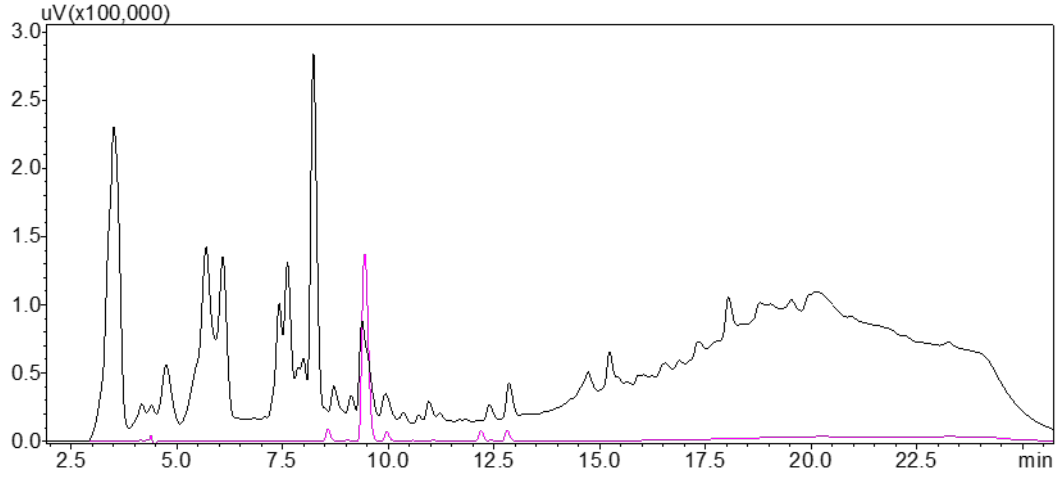
Şekil 3.20. Etanol ekstraksiyonu refluks a) UV spektrumu b) pik saflığı.

Çizelge 3.10. Etanol ekstraksiyonu refluksun sonuçları.

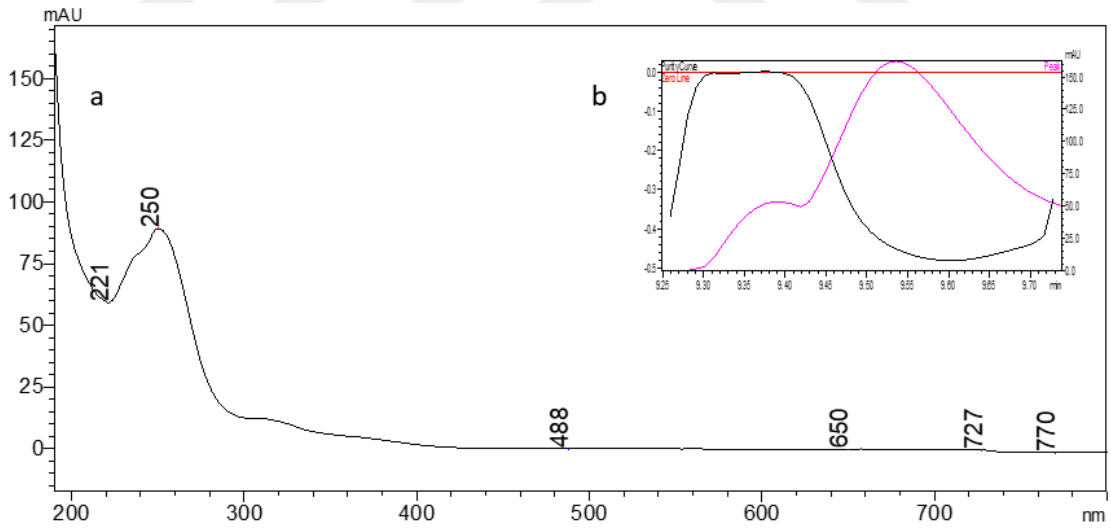
Çözücü	Pik Alanı	Glisirizin Miktar (mg/L, ppm)	Pik Saflığı
100 ml Etanol (Refluks)	26499111	1701,21	0,18

3.1.2.10. Saf Su / Etanol (70:30) Ekstraksiyonu

Bölüm 2.1.10’da ekstraksiyon yöntemi anlatılan çalışmanın Şekil 3.21 ve Şekil 3.22’de HPLC kromatogramı ile UV spektrumu ve Çizelge 3.11 ise miktar tayini sonuçları verilmiştir.



Şekil 3.21. Saf su / etanol ekstraksiyonu (70:30) (siyah) ve standart HPLC kromatogramı (pembe).



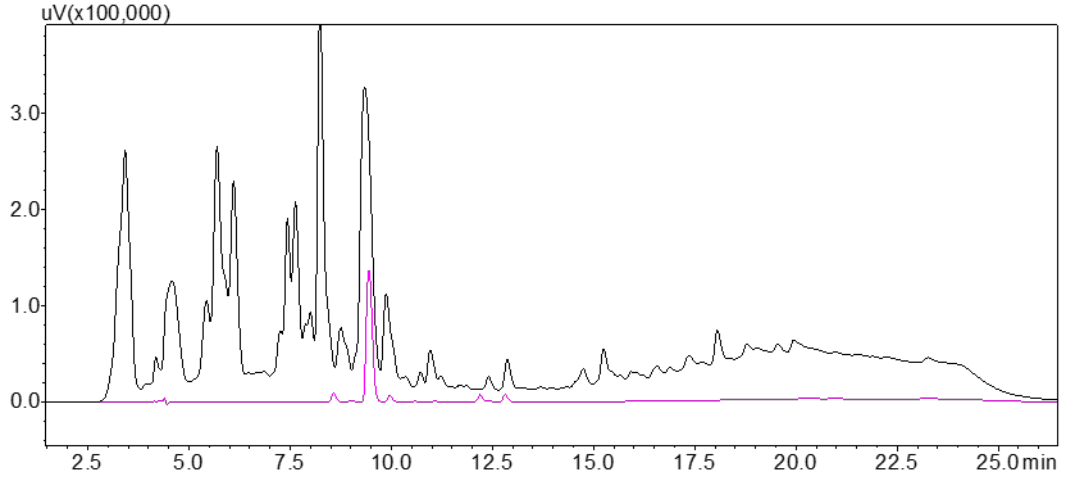
Şekil 3.22. Saf su / etanol ekstraksiyonun (70:30) a) UV spektrumu b) pik saflığı.

Çizelge 3.11. Saf su / etanol ekstraksiyonun (70:30) sonuçları.

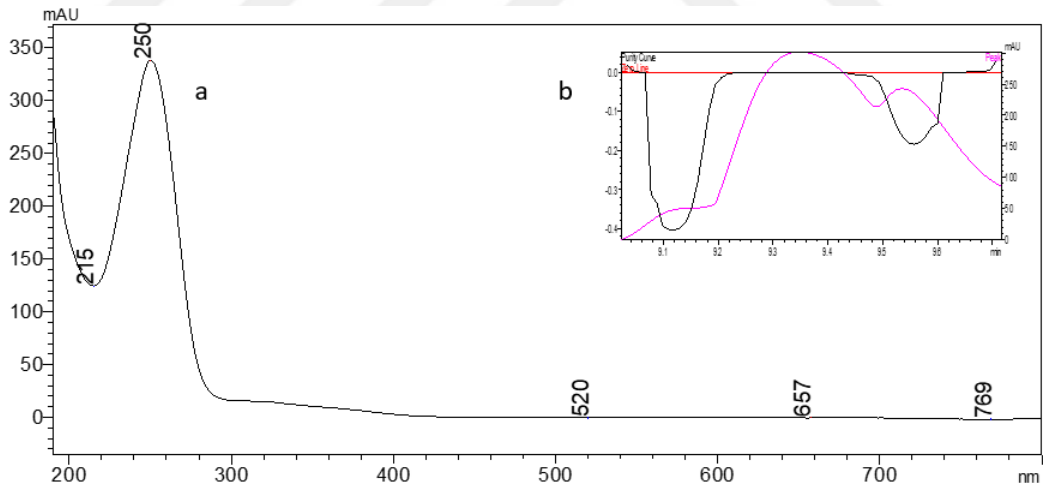
Çözücü	Pik Alanı	Glisirizin Miktar (mg/L, ppm)	Pik Saflığı
100 ml Saf Su / Etanol (70:30)	930642	55,18	0,51

3.1.2.11. Saf Su / Etanol (70:30) Ekstraksiyonu (Refluks)

Bölüm 2.1.11’de ekstraksiyon yöntemi anlatılan çalışmanın Şekil 3.23 ve Şekil 3.24’de HPLC kromatogramı ile UV spektrumu ve Çizelge 3.12’de ise miktar tayini sonuçları verilmiştir.



Şekil 3.23. Saf su / etanol (70:30) reflüks ekstraksiyonu (siyah) ve standart HPLC kromatogramı (pembe).



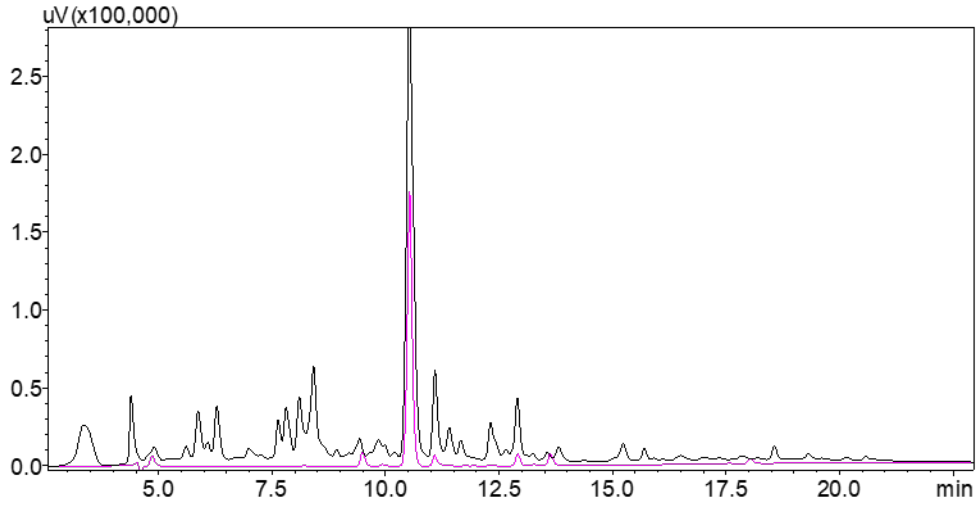
Şekil 3.24. Saf su / etanol (70:30) reflüks ekstraksiyonu a) UV spektrumu b) pik saflığı.

Çizelge 3.12. Saf su / etanol (70:30) reflüks ekstraksiyonun sonuçları.

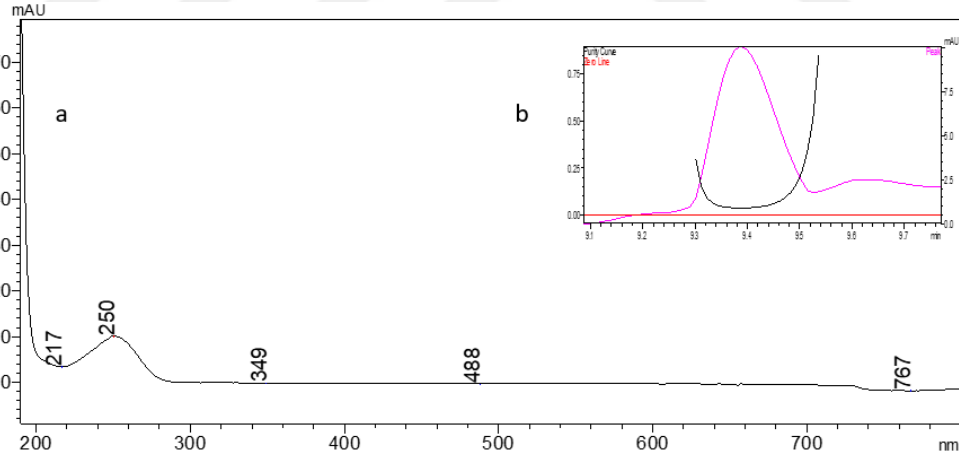
Çözücü	Pik Alanı	Glisirizin Miktar (mg/L, ppm)	Pik Saflığı
100 ml Saf Su / Etanol (70:30) Refluks	5313337	337,33	0,59

3.1.2.12. Metanol/ Etanol/ Saf Su (70:20:10) Ekstraksiyonu

Bölüm 2.1.12’de ekstraksiyon yöntemi anlatılan çalışmanın Şekil 3.25 ve Şekil 3.26’da HPLC kromatogramı ile UV spektrumu ve Çizelge 3.13’de ise miktar tayini sonuçları verilmiştir.



Şekil 3.25. Metanol/etanol/saf su (70:20:10) ekstraksiyonu (siyah) ve standart HPLC kromatogramı (pembe).



Şekil 3.26. Metanol/etanol/saf su (70:20:10) ekstraksiyonu a) UV spektrumu b) pik saflığı.

Çizelge 3.13. Metanol/etanol/saf su (70:20:10) ekstraksiyonun sonuçları.

Çözücü	Pik Alanı	Glisirizin Miktar (mg/L, ppm)	Pik Saflığı
100 ml M / E/ S (70:20:10)	97405	7,72	0,99

Pik saflığı (peak purity) kabul kriteri değeri 0,99-1,00 aralığında olmalıdır. Safsızlıkların olması durumunda girişim etkisi oluşacağından dolayı pik saflığı değeri 0,99 değerinden düşük değerler alabilmektedir. Kabul kriteri aralığı dışındaki değerler, girişim etkisinin olduğunu, başka bir bileşik veya bileşik grubunun pik alanına olumsuz etki ettiğini gösterebilmektedir. Kromatografi analizlerinde piklerin ayırım işleminin iyi olmaması veya aranılan bileşiğin konsantrasyonu pik ile aynı alıkonma zamanında başka bir yüksek konsantrasyona sahip bileşikten düşük ise çakışma (piklerin iç içe geçme) durumu söz konusu olabilir ve yüksek konsantrasyona sahip bileşik tarafından perdeleme etkisi gözlenebilmektedir. Simetrik pik yerine pik şekillerinde anormallikler gözlenebilmektedir.

Pik genişlemesi, pik kuyruklanması, pik omuzlanması veya pik bölünmesi gibi anormal şekiller gözlenmektedir. Özellikle bitki ekstrakt çalışmalarında safsızlık miktarları yüksek konsantrasyonlara ulaşabilmektedir. HPLC analizi öncesi numuneye uygulanacak olan ekstraksiyon ve ön saflaştırma işlemleri ile safsızlık giderimi ne kadar yüksek olursa daha kesin ve hassas sonuçlar elde edilebilmektedir.

Yüksek hassasiyetli fotodiyot dizisi dedektörler (PDA) UV ve görünür bölgede ışık yayarlar ve 190-800 nm aralığında ölçüm yapabilmektedirler. Döteryum lambalar, UV aralığı 190 - 400 nm için ışık yaymaktadır ve tungsten lambası ise kızıl ötesi yakın görünür ve kısa dalga için 400 - 800 nm ışık yaymaktadır. İki lambanın çalışması ile daha geniş dalga boyu aralığında iyi hassasiyet sağlanmaktadır. Fotodiyot dizisi dedektörler ile taramalı UV spektrum ölçümü gerçekleştirilebilir. PDA dedektörler seçilen dalga boyunu ve 1,0 nm aralıklarda spektrofotometre gibi tarama gerçekleştirerek tüm dalga boylarını kaydedebilmektedir. Pik saflığının ve pik alanının analiz edilmesi için farklı dalga boyundaki UV spektrum taramaları incelenir. PDA dedektörlerin en büyük avantajı incelenen pikte bileşene ait olan spesifik dalga boyunun dışında başka dalga boylarını inceleme imkânı sağlamasıdır. Eğer referans standart madde mevcut ise standart ve numune karşılaştırılarak pikin saflığı açısından bir fikir sahibi olunabilir. Pik analizinde dikkat edilmesi gereken husus pik alanı içerisindeki her noktada spektrum aynı olmalıdır. Bazı durumlarda sadece PDA dedektörleri yeterli olmayabilir bu durumlarda kütle dedektörleri ile daha hassas sonuçlar elde edilebilmektedir.

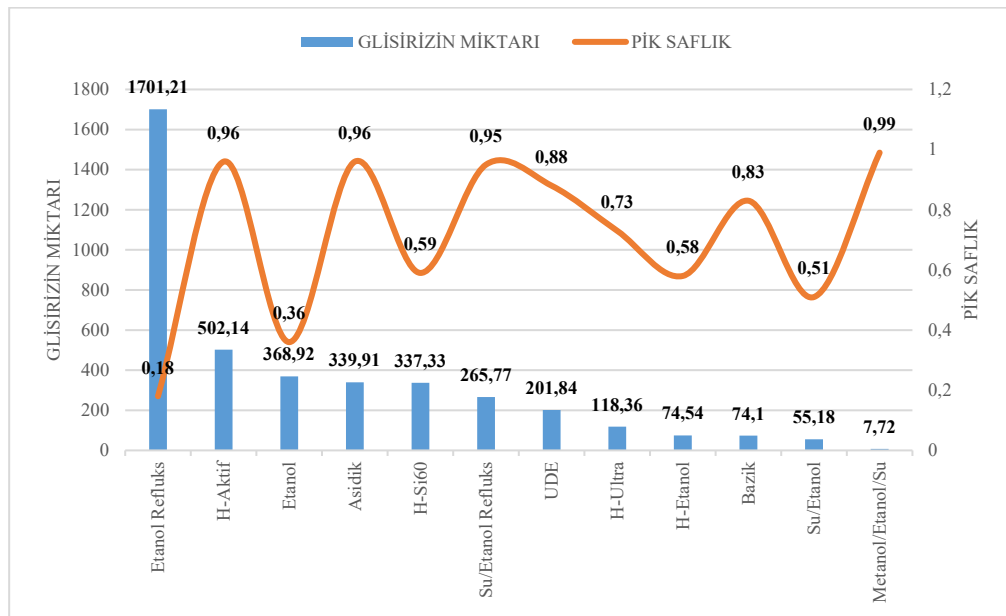
Ekstraksiyon sonuçlarını incelediğimizde Metanol/Etanol/Saf su ekstraksiyon çalışmasının geliştirilmesi gereken metot olarak uygun bulunmuştur.

Çizelge 3.14'te ekstraksiyon sonuçlarını içeren tablo verilmiştir.

Çizelge 3.14. Ekstraksiyon sonuçları.

Deney Kod	Pik Alanı	Glisirizin Miktar (mg/L, ppm)	Pik Saflığı	Maksimum Dalgaboyu(λ_{max})
Etanol Reflüks	26499111	1701,21	0,18	244/278/310/657/728
H-Aktif	7873505	502,14	0,96	202/229/273/310/728
Asidik	5804111	368,92	0,36	206/273/310
H-Si60	5353420	339,91	0,96	199/273/310
Su/Etanol Reflüks	5313337	337,33	0,59	250
UDE	4201806	265,77	0,95	200/232/265/310/727
Bazik	3208729	201,84	0,88	197/232/256/310/728
H-Etanol	1912065	118,36	0,73	211/274/310/728
H-Ultra	1231384	74,54	0,58	198/273/310
Etanol	1224515	74,1	0,83	273/309/727
Su/Etanol	930642	55,18	0,51	250
Metanol/Etanol/Su	97405	7,72	0,99	250

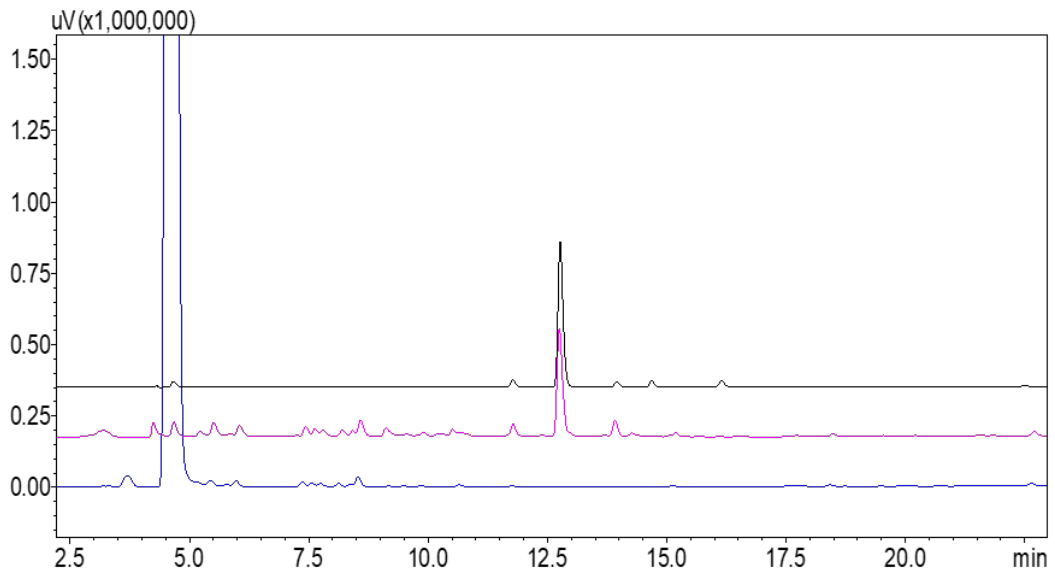
Şekil 3.27'de ekstraksiyon çalışmalarındaki glisirizin miktarları ile pik saflığını içeren grafik verilmiştir.



Şekil 3.27. Ekstraksiyon çalışmalarındaki glisirizin miktarları ve pik saflığının grafiği.

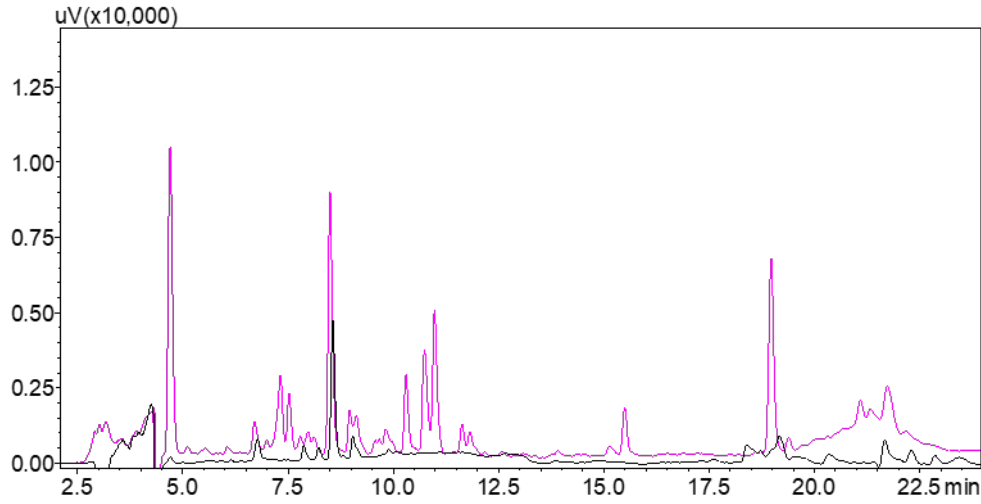
Ekstraksiyon çalışmalarında pik saflıkları ve UV taramaları incelenmiştir. Glisirizin standardının spesifik dalga boyu 250 nm $\pm$ 1 olarak ölçülmüştür. Standart ile aynı alıkonma zamanında gelen piklerin UV spektrumları ve pik saflıkları değerlendirilmiştir. Etanol refluks, H-aktif, Asidik, H-Si60, UDE, Bazik, H-Etanol, H-Ultra, Etanol çalışmalarında başka analit girişimlerin olduğu ve piklerde şekil anormallikleri gözlenmiştir. Bu durum çalışmaların pik saflıklarını etkilemiştir. Tek bir pik gibi görünen ve integre edilen piklerin glisirizin dışında başka safsızlıkları içerdiği UV spektrum taramalarında açıkça görülmektedir. Bu çalışmalarda yüksek konsantrasyonlarda boyar madde ve fenolik bileşiklerin ekstrakte edildiği tespit edilmiştir. Safsızlık miktarının artması ile girişim etkisinden dolayı glisirizin miktarları da net olarak tespit edilememiştir. Şekil 3.27’de paylaşılan glisirizin miktarları glisirizin standardı ile aynı alıkonma zamanında integre edilen piklerin değerleridir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda ekstraksiyon ve ön saflaştırma basamaklarının optimize edilerek safsızlıkların giderildiği ve pik saflığının arttığı uygun bir metot geliştirilmiştir.

- Ön yıkama basamağında hekzan kullanımının safsızlık giderimi sağladığı ve glisirizin pik saflığını arttırdığı tespit edilmiştir. Bundan dolayı hem polar hem de apolar bileşikler ile etkileşim gösterebilen, aseton solventi ön yıkama işlemlerinde tercih edilmiştir. Şekil 3.28’de ön yıkama basamağında aseton fazına glisirizin bileşiği geçmediği görülmektedir.



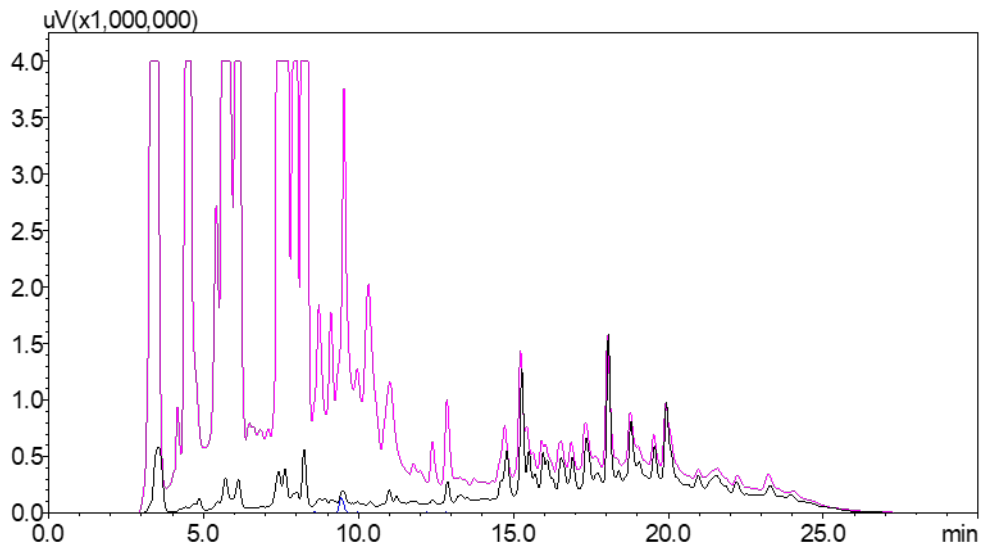
Şekil 3.28. Aseton fazı (mavi), aseton ile ön yıkama sonrası ekstrakt (pembe) ve standart (siyah) HPLC kromatogramı.

- Adsorban kullanımının diğer safsızlıkları giderdiği ve pik saflığını arttırdığı tespit edilmiştir. Bu doğrultuda kullanılan adsorbanlarda aktif karbonun yerine daha uygun maliyetli biyokömür adsorban olarak kullanılmıştır. Şekil 3.29'da biyokömürün safsızlık giderimine etkisi gösterilmiştir.



Şekil 3.29. Biyokömür uygulaması (pembe) ve standart (siyah) HPLC kromatogramı.

- Ultrasonik destekli ekstraksiyon ve reflüks ekstraksiyonu çalışmalarında boyar madde ve fenolik bileşik safsızlıklarının yüksek olmasından dolayı geleneksel ekstraksiyon metodu tercih edilmiştir. Şekil 3.30'de reflüks ekstraksiyonu ile geleneksel etanol ekstraksiyonu kıyaslanmıştır.



Şekil 3.30. Reflüks ekstraksiyonu (pembe) ve etanol ekstraksiyonu (siyah) HPLC kromatogramı.

- Yüksek sıcaklıklarda safsızlık miktarının artması ve glisirizin bileşiminin etkilenmesi göz önünde bulunduğundan 25°C - 40°C sıcaklıkları arasında ekstraksiyon için uygun olduğu belirlenmiştir.
- Ekstraksiyon çözücüsü olarak alkol solventine ek olarak su kullanılması gerektiği değerlendirilmiştir. Su ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanıldığı çalışmalarda Çizelge 3.14'te glisirizine ait spesifik dalga boyu 250 nm net olarak görülmüştür ve integre edilen pikler incelediğinde glisirizin standardı ile benzer UV spektrum özelliği göstermektedir.
- Zenginleştirilmiş glisirizin elde için ekstraksiyon çalışmasında asidik ve bazik çöktürme basamağı ekstraksiyon yöntemine eklenmiştir. Bu yöntem ile glisirizin amonyum tuzu olarak eldesi gerçekleştirilmiştir.

Bu tez çalışmasında zenginleştirilmiş glisirizin eldesi için uygun olan ekstraksiyon metodu olarak Metanol/Etanol/Su (70:20:10) geliştirilmiştir. Geliştirilmiş ekstraksiyon metodu bölüm 2.2'de ayrıntılı olarak anlatılmıştır.

3.2. FLASH KROMATOGRAFI İLE SAFLAŞTIRMA METODU

Flash kromatografi basamağında geliştirilmiş ekstraksiyon metodu ile elde edilen glisirizin amonyum tuzunun saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Saflaştırma metodunun belirlenmesi için Çizelge 3.15’de gösterilen denemeler gerçekleştirilmiştir. Denemelerde SiliaSep™ C18 12 g ve SiliaSep™ HP 12 g olmak üzere iki farklı kartuş kullanılmıştır. Farklı çözücü sistemleri ve akış hızlarında lineer gradient sistemler uygulanmıştır. Bu denemelerin detayları Çizelge 3.15’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.15. Flash kromatografi metot denemeleri.

A mobil Fazı	B mobil fazı	Kartuş (12 g)	Akış hızı (ml/dk)	%B değişim	Süre(dk)
Kloroform	Metanol	C18 & Si	10,20,30,40	%5-40	15
Kloroform	Metanol	C18 & Si	10,20,30,40	%100-60	15
Su	Metanol	C18 & Si	5,10,15,20	%0-40	16
Su	Asetonitril	C18 & Si	5,10,12,15,20,30,40	%100-50	20
Su	Asetonitril	C18 & Si	5,10,15,20	%10-80	20
Hekzan	Etil Asetat	C18 & Si	10,20,30,50	%0-100	26
Su (%0.1 fosfat)	Asetonitril	C18 & Si	5,10,15,20	%10-80	20
Su (%0.1 fosfat)	Asetonitril	C18 & Si	5,10,15,20	%100-50	20

Bu denemeler sonucunda belirlenen flash metodu Çizelge 3.16’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.16. Flash kromatografi metodu.

FLASH METODU

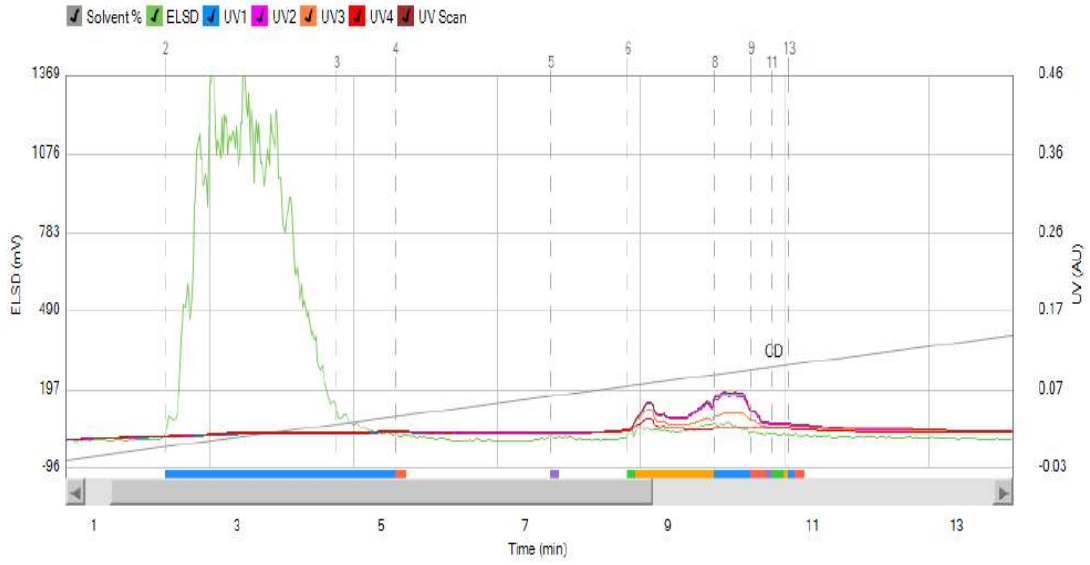
Kolon	SiliaSep™ C18 12 g
Akış Hızı	15 ml/dk
Kolon Sıcaklığı	Ortam Sıcaklığı
Kolon Şartlama Süresi	2,0 dakika
Flash Modu	Sıvı Enjeksiyon
UV dalga boyu	ELSD ve 254, 265, 280, 320 nm
UV Threshold (Min.Eşik)	0,05 AU
UV Hassasiyeti	Düşük
ELSD Threshold (Min.Eşik)	20 mV
ELSD Hassasiyeti	Düşük
Fraksiyon Toplama	Fraksiyon piklerini topla
A Mobil Fazı	Asetonitril
B Mobil Fazı	Ultra saf su
Metod Süresi	32 dakika

Gradient yürütme metodu uygulanmıştır.

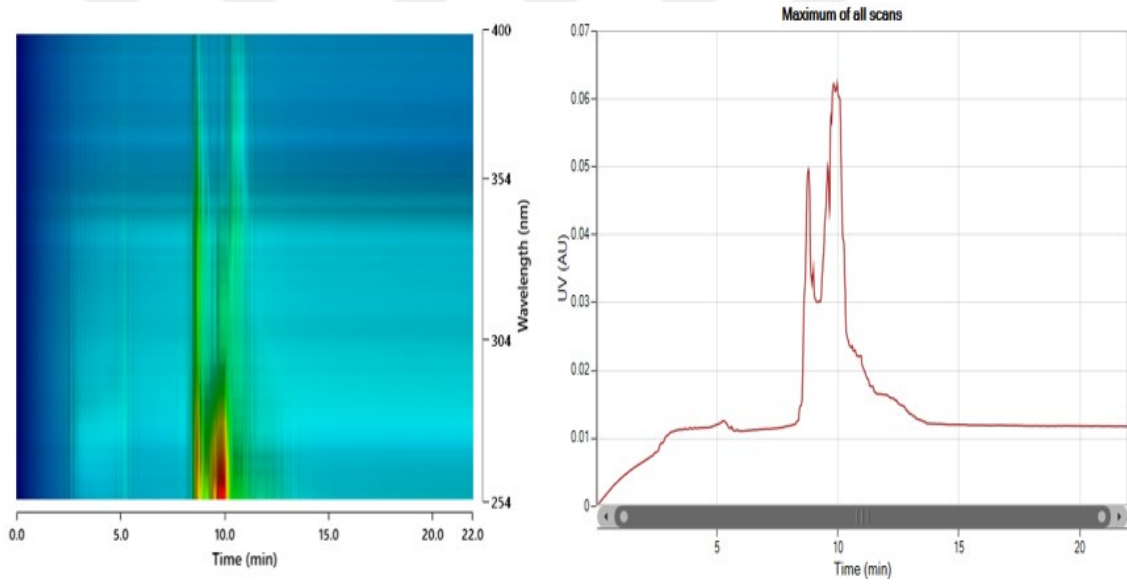
Süre	A mobil fazı	B mobil fazı
0 (Başlangıç)	%25	%75
0-15	%75	%25
15-25	%75	%25
25-28	%25	%75
32	BİTİŞ	

3.2.1. Flash Kromatografi Sonuçları

Optimize edilen ekstraksiyon metodu ile elde edilen 250 mg glisirizinin amonyum tuzu formu 4 ml ultra saf su ile çözdürüldü ve 0,22 nm hidrofilik membran filtreden süzüldü enjeksiyon işlemi gerçekleştirildi. Şekil 3.31’de flash kromatografi datasında görüldüğü üzere 13 adet fraksiyon toplanmıştır. Şekil 3.32’de genel spektrum taraması verilmiştir.



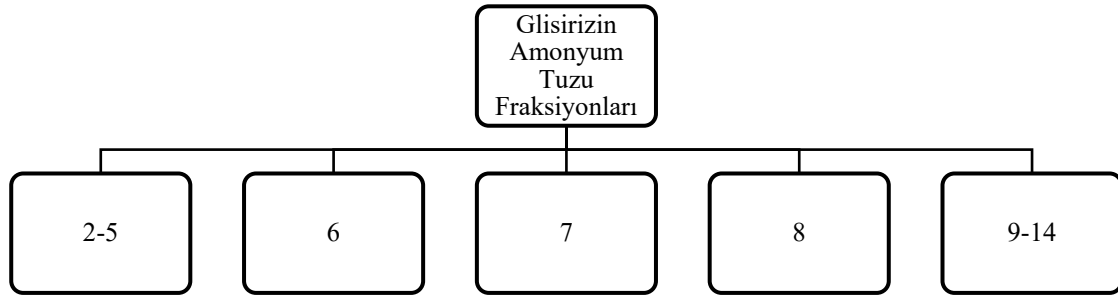
Şekil 3.31. Flash kromatografi datası.



Şekil 3.32. Genel tarama spektrumu.

Toplanan fraksiyonlar ELSD ve UV spektrumları değerlendirilerek birleştirilmiştir. Çizelge 3.17’de toplanan fraksiyonlar gösterilmiştir.

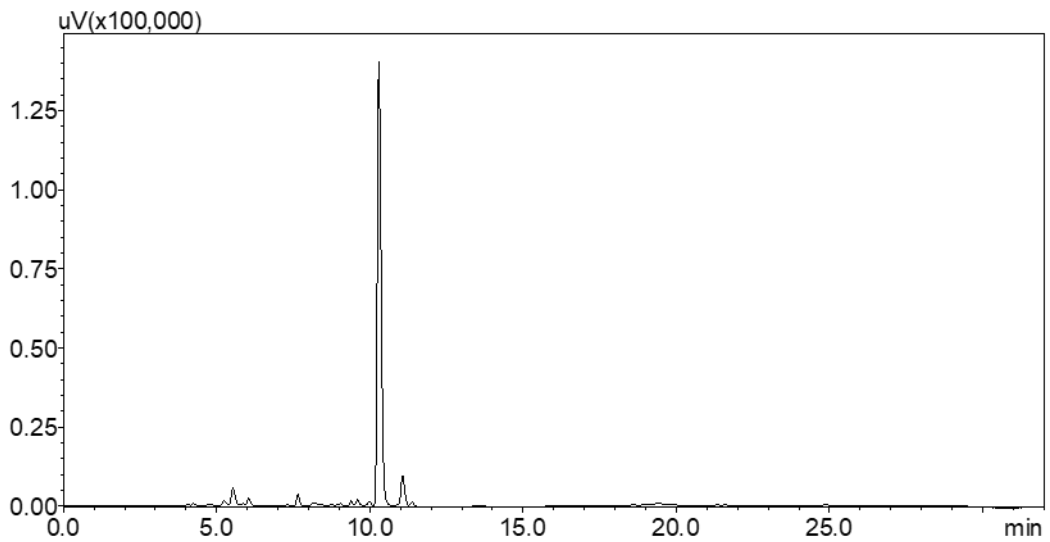
Çizelge 3.17. Flash kromatografi ile toplanan fraksiyonlar.



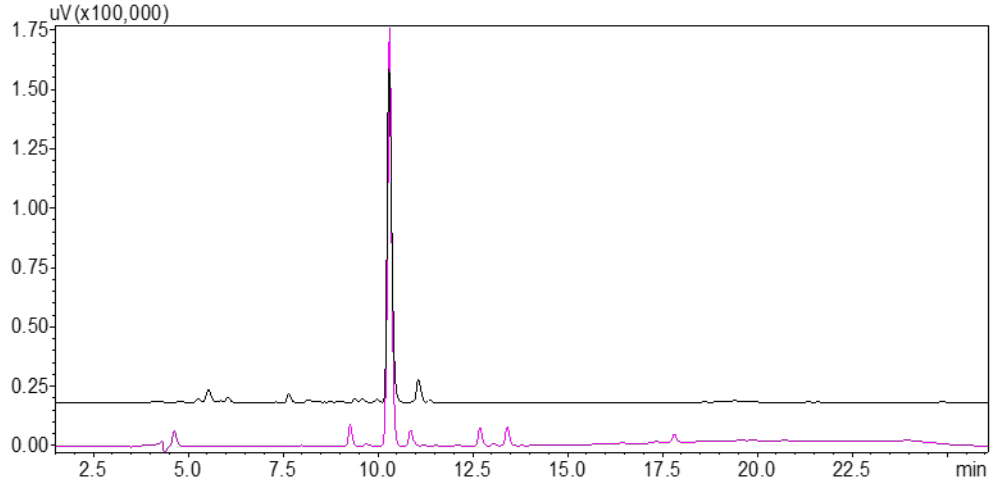
8 numaralı fraksiyonda glisirizinin saflaştırıldığı tespit edilmiştir. 8 numaralı fraksiyona ait HPLC kromatogramı Şekil 3.33’de gösterilmiştir. Şekil 3.34’de 8 numaralı fraksiyon ile glisirizin standardının karşılaştırılması gösterilmiştir. UV spektrumu ve pik saflığı ise Şekil 3.35’te gösterilmiştir. Çizelge 3.18’de toplanan fraksiyonun analiz sonuçları gösterilmiştir.

Çizelge 3.18. 8 numaralı fraksiyonun analiz sonuçları.

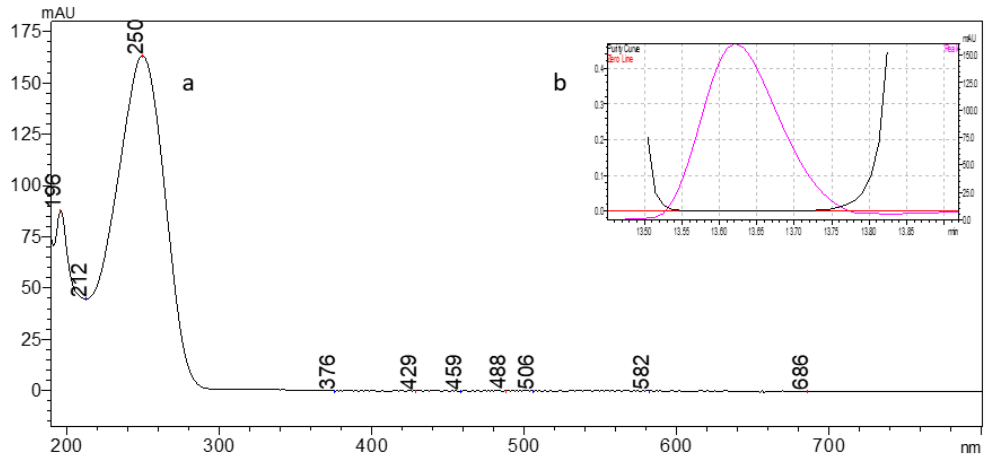
Fraksiyon	Pik Alanı	Glisirizin Miktar (mg/L, ppm)	Pik Saflığı	Pik Alanı(%)
8	1202709	186,62	1,00	83,3701



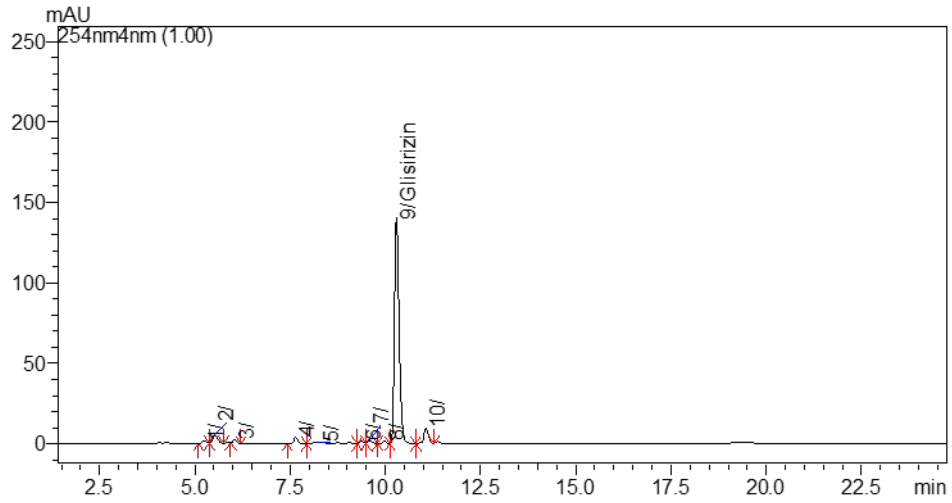
Şekil 3.33. 8 numaralı fraksiyona ait HPLC kromatogramı.



Şekil 3.34. 8 numaralı fraksiyon (siyah) ve gliserizin standardına ait HPLC kromatogramı (pembe).



Şekil 3.35. 8 numaralı fraksiyonun a) UV spektrum b) pik saflığı.



Şekil 3.36. Flash kromatografi ile saflaştırılan ürünün HPLC kromatogramı.

Glisirizin amonyum tuzu flash kromatografi işlemi ile saflaştırılmıştır. Ardışık enjeksiyonlar ile glisirizin içeren fraksiyonlar toplandı ve evapore edildi. Ultra saf suda çözdürüldü ve liyofilize edildi. Flash uygulamasında kullanılan glisirizin amonyum tuzu ve fraksiyon edilen glisirizin amonyum tuzunun liyofilize ürün hali Şekil 3.37’de gösterilmiştir. Glisirizin amonyum tuzunun nem içeriği %3,27 olarak ölçülmüştür.



Şekil 3.37. a) Glisirizin amonyum tuzu b) Liyofilize ürün hali.

3.3. TLC UYGULAMASI

TLC çalışmasında çin farmakopesinden alınan metot uygulanmıştır [34]. TLC plaka olarak 20x20 cm (Merck) Glass plates TLC Si 60 F254 özellikli tabaka kullanılmıştır. Çalışma sonucunda elde edilen glisirizin amonyum tuzu ile standart olarak temin edilen glisirizin amonyum tuzu ve meyan kökü ekstresi karşılaştırıldı. 0,5 g Glisirizin amonyum tuzu 10 ml etanol-su (70:30) çözeltisinde 10 dakika boyunca ultrasonik banyoda hazırlandı. Santrifüj işlemi uygulandı ve supertant kısmı test için hazırlandı. 1 mg glisirizin amonyum standartı 10 mL etanol-su (70:30) çözeltisinde hazırlandı. 10 g meyan kökünden hazırlanan ana ekstrakt karşılaştırma için hazırlandı. 20 ml sülfirik asit 180 mL soğuk metanol içerisine eklenerek asit spreyi hazırlandı. TLC tabakaya ekim gerçekleştirildi ve 10 dakika boyunca sabit mobil faz içeriği etil asetat, formik asit, asetik asit ve su (15:2:1:2) içeren çözelti ortamında yürütülmeye bırakıldı. Spreyleme işlemi uygulanarak 100°C’ye ısıtılmış ısıtıcıda bekletildi ve UV ışık altında gözlemlendi. Şekil 3.38’de tlc işlemi sonucu plakada yürüyen maddeler gösterilmiştir.



Şekil 3.38. TLC uygulaması sonucu 1) Glisirizin standardı 2) Glisirizin amonyum tuzu 3) Glisirizin etanol ana ekstrakt

3.4. LC-MS/MS İLE KÜTLE TAYİNİ

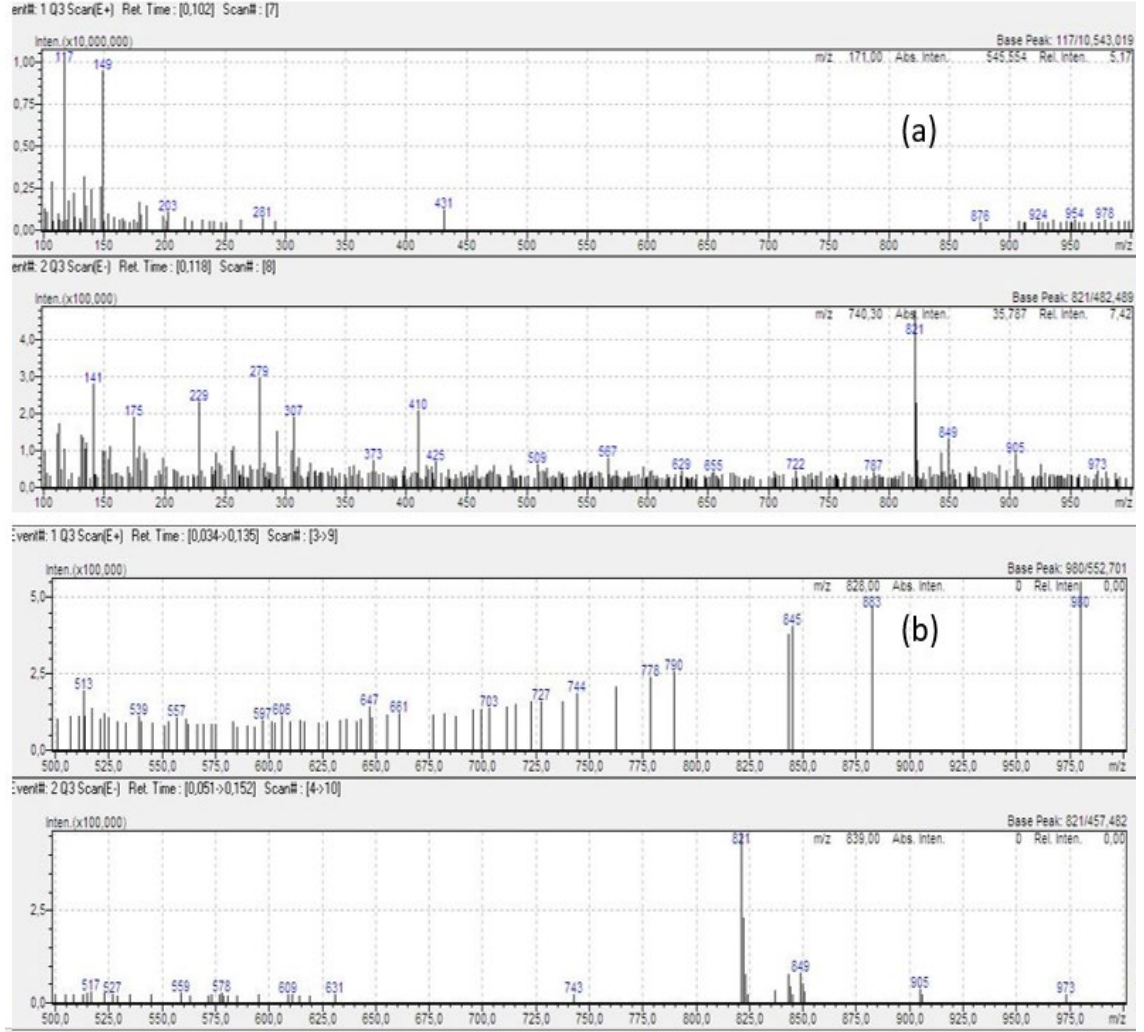
Kütle analizleri Shimadzu markalı LCMS-8030 Plus cihazında kütle taraması olarak gerçekleştirilmiştir. Glisirizin Standardı (GLY-STD) ve çalışmada elde edilen glisirizin amonyum tuzu (GLY-1) ve flash kromatografi ile saflaştırılan glisirizin amonyum tuzu (GLY-2) analiz edilmiştir. 100-1000 m/z iyon taraması gerçekleştirilmiştir. Glisirizin bileşiğinin molekül formülü $C_{42}H_{62}O_{16}$ ve molekül ağırlığı 822,94 g/mol'dur. [M] kütle taramaları pozitif (+) ve negatif (-) iyon olarak gerçekleştirilmiş ve ölçülen m/z iyonları aşağıdaki Çizelge 3.19'da verilmiştir.

Glisirizin molekülünün ana iyonları $[M+H]^+$ m/z = 823,2 ve $[M-H]^-$ m/z = 821,2'dir.

Çizelge 3.19. Glisirizinin molekülün iyon kütleleri.

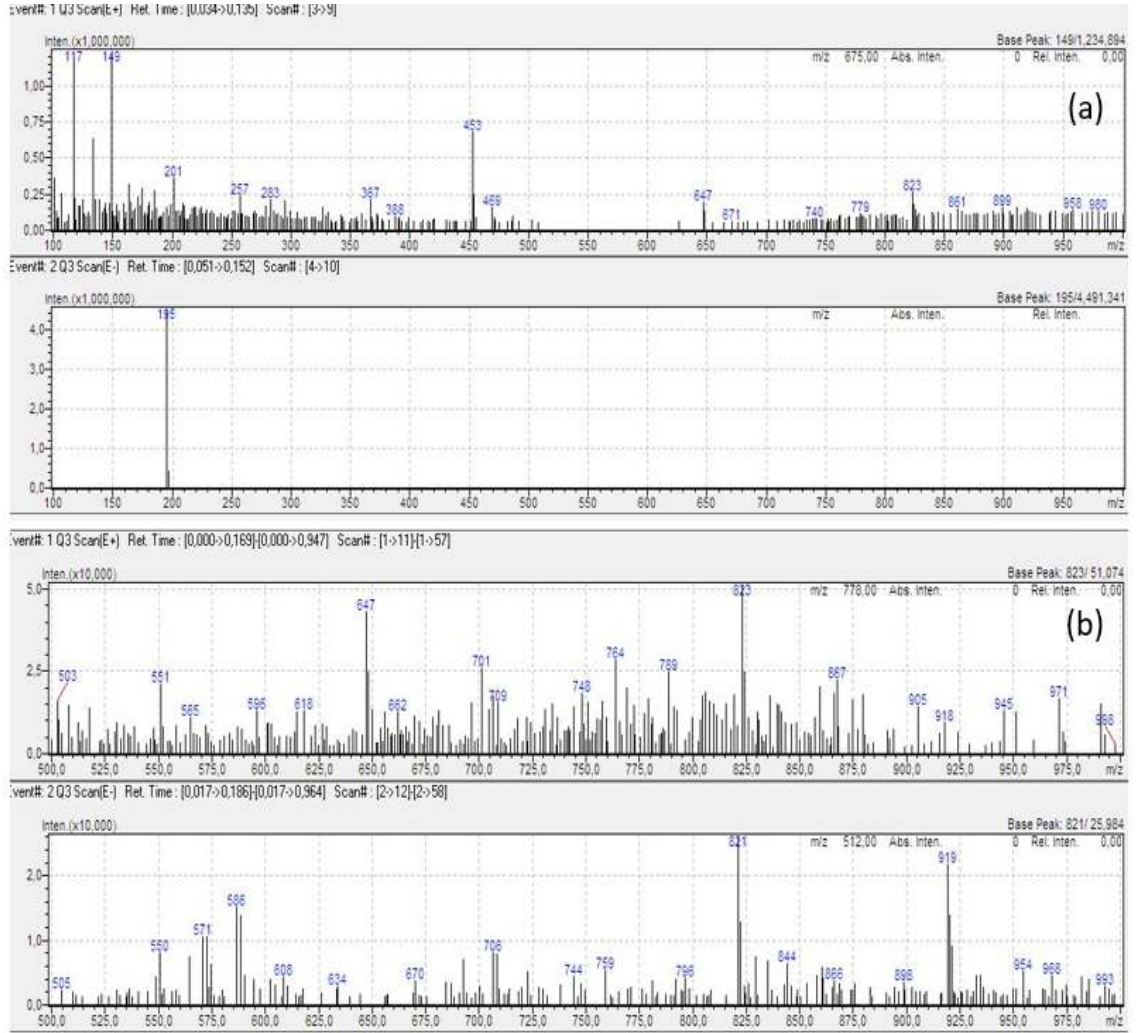
	MS ² Parçaları	Ölçülen Kütle (m/z)
Pozitif İyon Taraması	$[M+Na]^+$	845,2
	$[M+H]^+$	823,2
	$[M+H\text{-Glukuronik asit}]^+$	647,2
	$[M+H\text{-2 Glukuronik asit}]^+$	471,2
	$[M+H\text{-2 Glukuronik asit-H}_2\text{O}]^+$	453,2
Negatif İyon Taraması	$[M-H]^-$	821,2

Şekil 3.39’da GLY-STD ait olan kütle taraması spektrumu görülmektedir. 100-1000 ve 500-1000 m/z olmak üzere taramalar gerçekleştirilmiştir.



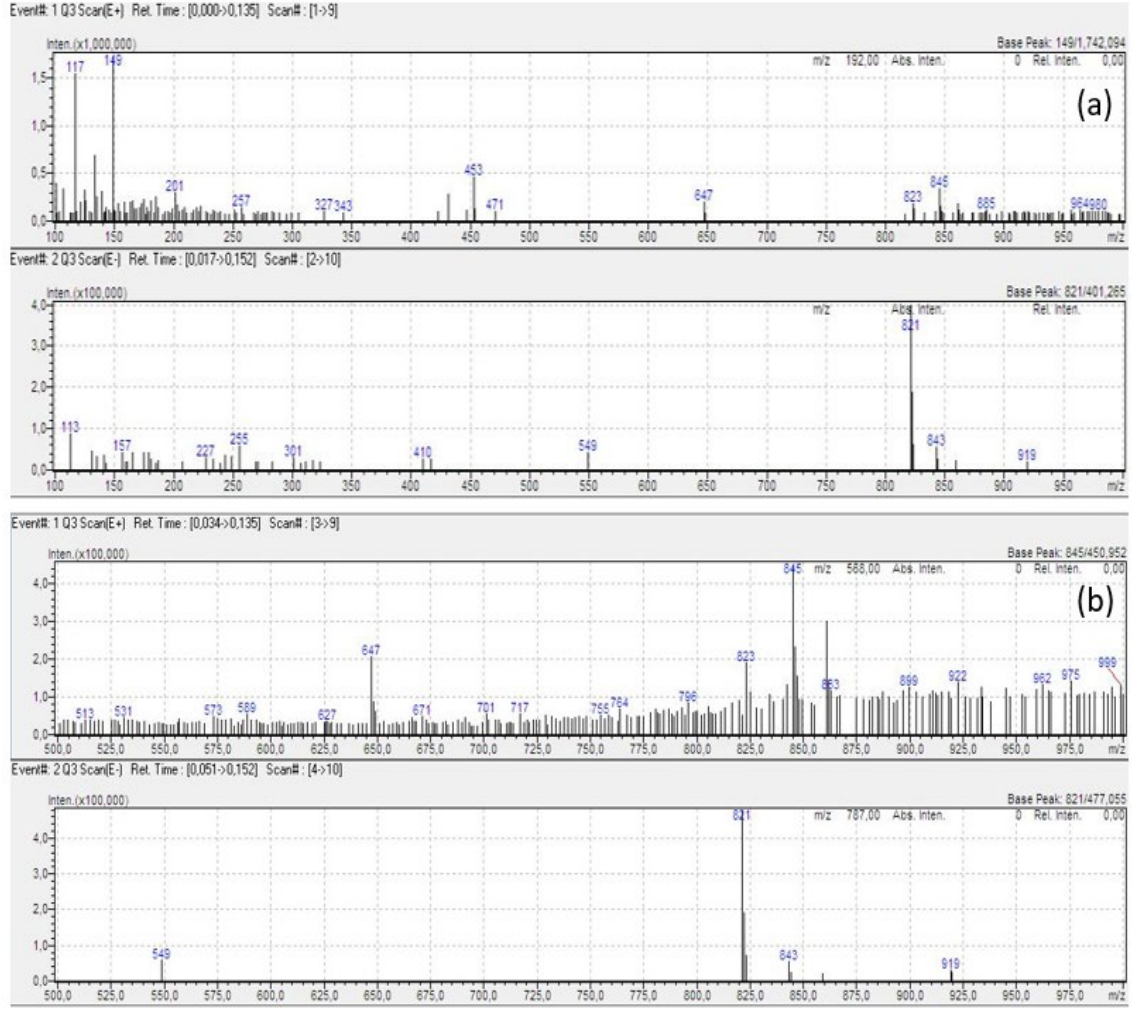
Şekil 3.39. Glisirizin standardı(GLY-STD) LC-MS/MS kütle tarama spektrumu

Şekil 3.40'da GLY-1 ait olan kütle taraması spektrumu görülmektedir. 100-1000 ve 500-1000 m/z olmak üzere taramalar gerçekleştirilmiştir.

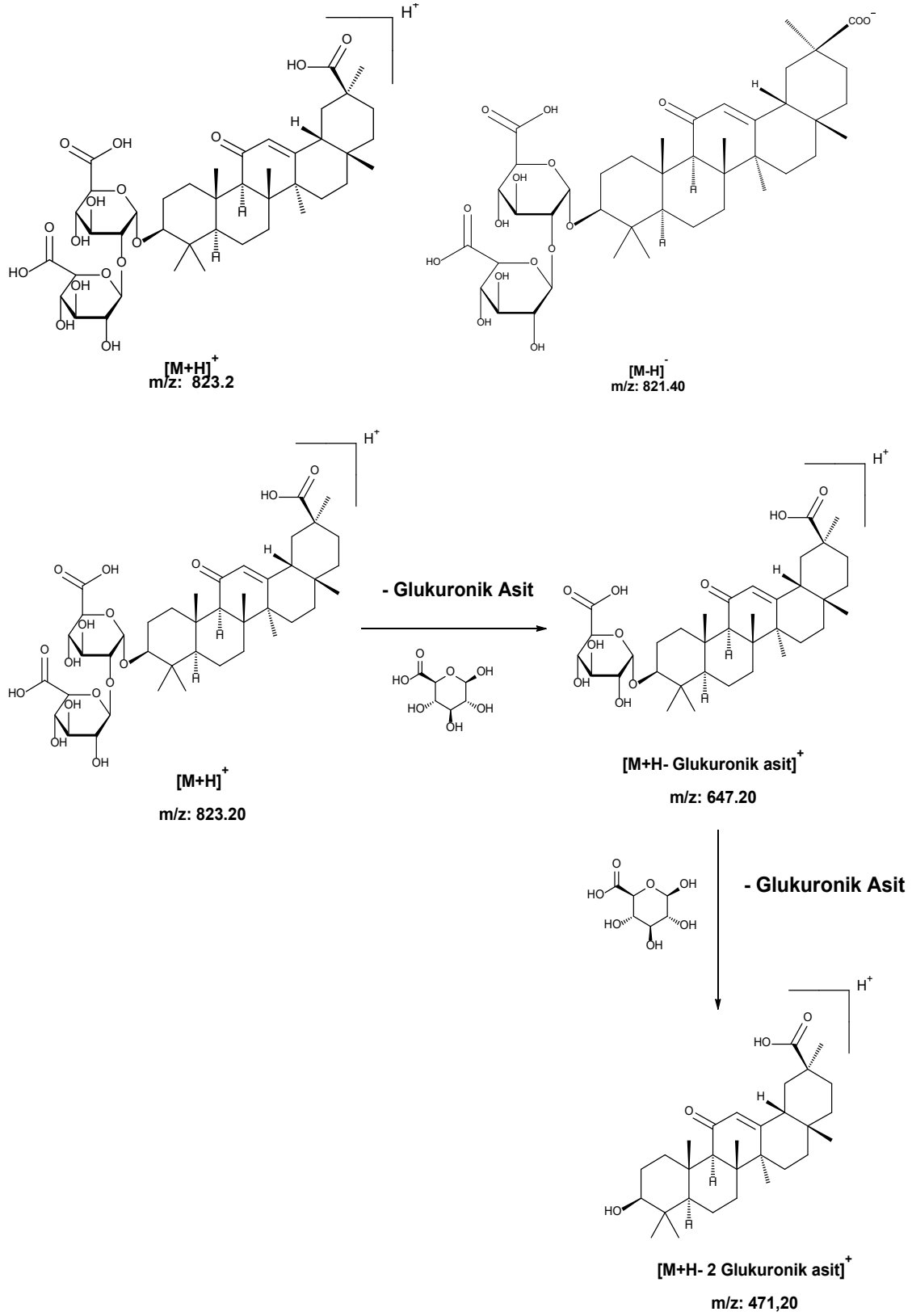


Şekil 3.40. Glisirizin amonyum tuzu (GLY-1) LC-MS/MS kütle tarama spektrumu.

Şekil 3.41’de GLY-2 ait olan kütle taraması spektrumu görülmektedir. 100-1000 ve 500-1000 m/z olmak üzere taramalar gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.41. Flash kromatografi ile saflaştırılmış glisirizin amonyum tuzunun(GLY-2) LC-MS/MS kütle tarama spektrumu.



Şekil 3.42. Glisirizin molekülünün parçalanma iyonların yapıları ve kütleleri. Kütle taramalarında Şekil 3.42’de gösterilen parçalanma iyonları ve ana pik iyonları görülmüştür.

3.5. SİTOTOKSİSİTE ÇALIŞMA SONUÇLARI

GLY-STD, GLY-1, GLY-2 ve GLY-3 kodlu numuneler sırasıyla glisirizin standardı, glisirizin amonyum tuzu, glisirizin amonyum tuzu saflaştırılmış ve glisirizin amonyum tuzunun flash kromatografi ile saflaştırılmış halinin toksisitesi L929 (fare fibroblast) hücre hattında uygulama yapılarak analiz edildi. Konsantrasyonlar her bir ürün için geniş ve farklı aralıklarda olmak üzere ppm düzeyinde ultra saf su ile hazırlandı. Test edilecek ürün ile hücreler buluşturularak 24 saat 37°C %5 CO₂ koşullarında inkübasyona bırakıldı.

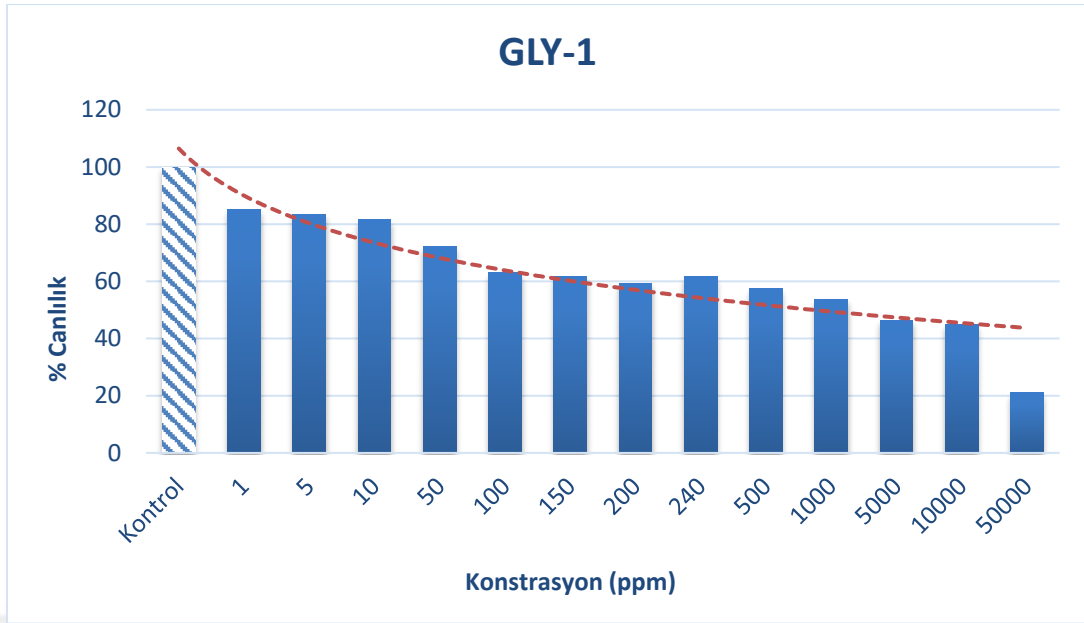
Ürünün toksisitesini belirlemek için WST-1 hücre proliferasyon test protokolü uygulandı. Hücre canlılığını %50 ve aşağısına düşüren konsantrasyonlar toksik olarak kabul edildi.

ELISA mikropate okuma sonuçlarına göre; herhangi bir ürün verilmeyen kontrol olarak sınıflandırılan grup %100 canlı olarak değerlendirildi ve test konsantrasyonlarındaki % canlılık hesaplamaları yapıldı.

Glisirizin amonyum tuzu (GLY-1) için sonuçlar aşağıda Çizelge 3.20 ve Şekil 3.43'te verilmiştir. GLY-1 kodlu numune kontrol grubuna göre; doza bağlı olarak konsantrasyon arttıkça hücre canlılığı azalmıştır. 500 ppm üzerinde toksisite gözükmemektedir.

Çizelge 3.20. GLY-1 numunesine ait canlılık verileri.

Konsantrasyon(ppm)	% Canlılık
Kontrol	100
1	85,19
5	83,33
10	81,48
50	72,22
100	62,96
150	61,73
200	59,26
240	61,73
500	57,41
1000	53,70
5000	46,30
10000	45,06
50000	20,99

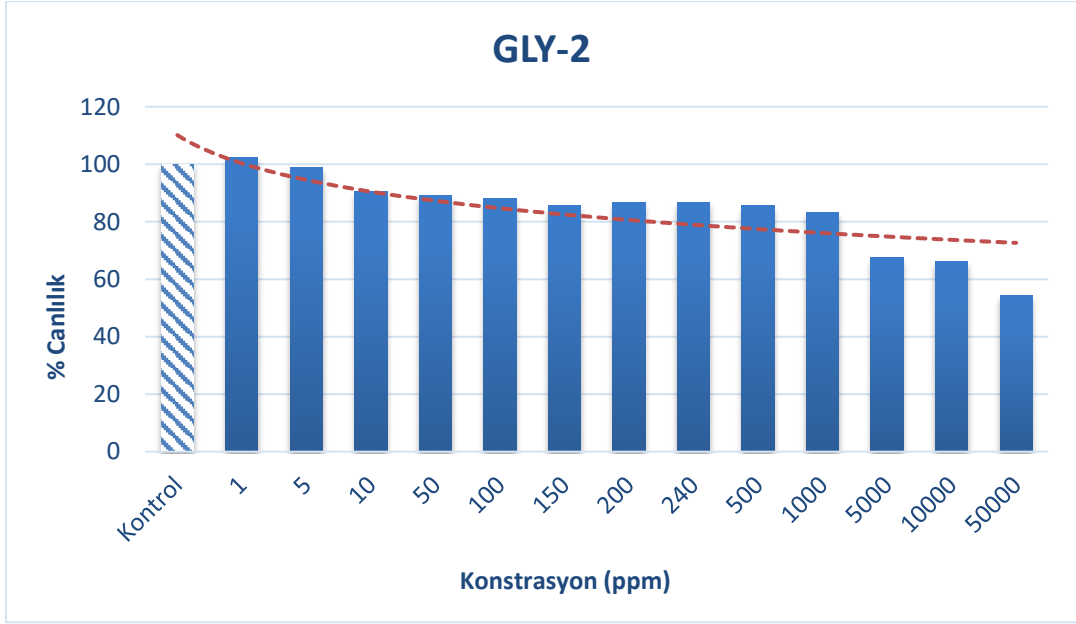


Şekil 3.43. GLY-1 numunesine ait % canlılık grafiği.

Glisirizin amonyum tuzu saflaştırma (GLY-2) kodlu numune kontrol grubuna göre; doza bağlı olarak konsantrasyon arttıkça hücre canlılığında azalma görülmüştür. Hücre canlılığı 5000 ppm de % 67 dolaylarına kadar düşmüştür. 50000 ppm ve üzeri dozları toksisite göstermiştir. Sonuçlar aşağıda Çizelge 3.21 ve Şekil 3.44'te verilmiştir.

Çizelge 3.21. GLY-2 numunesine ait canlılık verileri.

Konsantrasyon (ppm)	% Canlılık
Kontrol	100
1	102,41
5	98,80
10	90,36
50	89,16
100	87,95
150	85,54
200	86,75
240	86,75
500	85,54
1000	83,13
5000	67,47
10000	66,27
50000	54,22

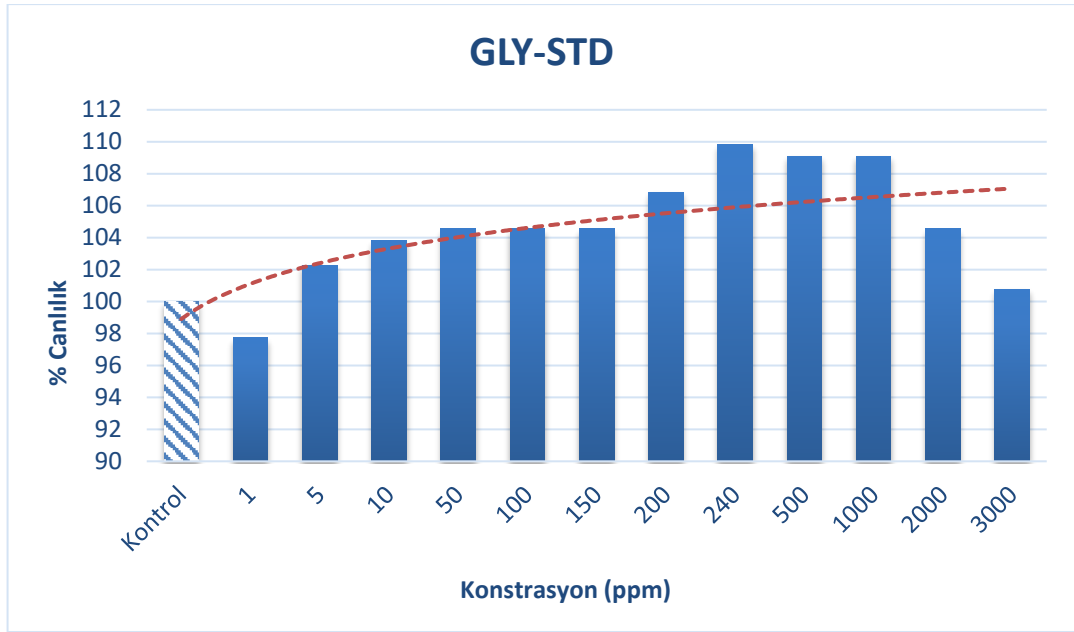


Şekil 3.44. GLY-2 numunesine ait % canlılık grafiği.

GLY-STD kodlu numune kontrol grubuna göre; hücre canlılığında ciddi bir değişiklik görülmemiştir. Ürün toksik L929 hücre hattında toksik değildir.

Çizelge 3.22. GLY-STD numunesine ait canlılık verileri.

Konsantrasyon (ppm)	% Canlılık
Kontrol	100
1	97,73
5	102,27
10	103,79
50	104,55
100	104,55
150	104,55
200	106,82
240	109,85
500	109,09
1000	109,09
2000	104,55
3000	100,76

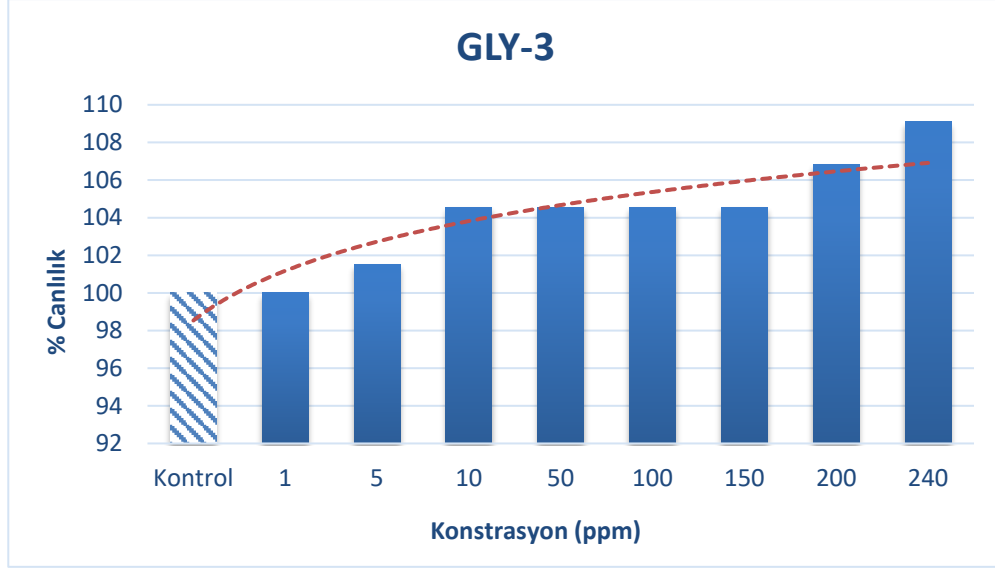


Şekil 3.45. GLY-STD numunesine ait % canlılık grafiği.

GLY-3 kodlu numune kontrol grubuna göre; kodlu numune kontrol grubuna göre; hücre canlılığında ciddi bir değişiklik görülmemiştir. Ürün L929 hücre hattında toksik olmadığı ve canlılığı arttırdığı tespit edilmiştir.

Çizelge 3.23. GLY-3 numunesine ait canlılık verileri.

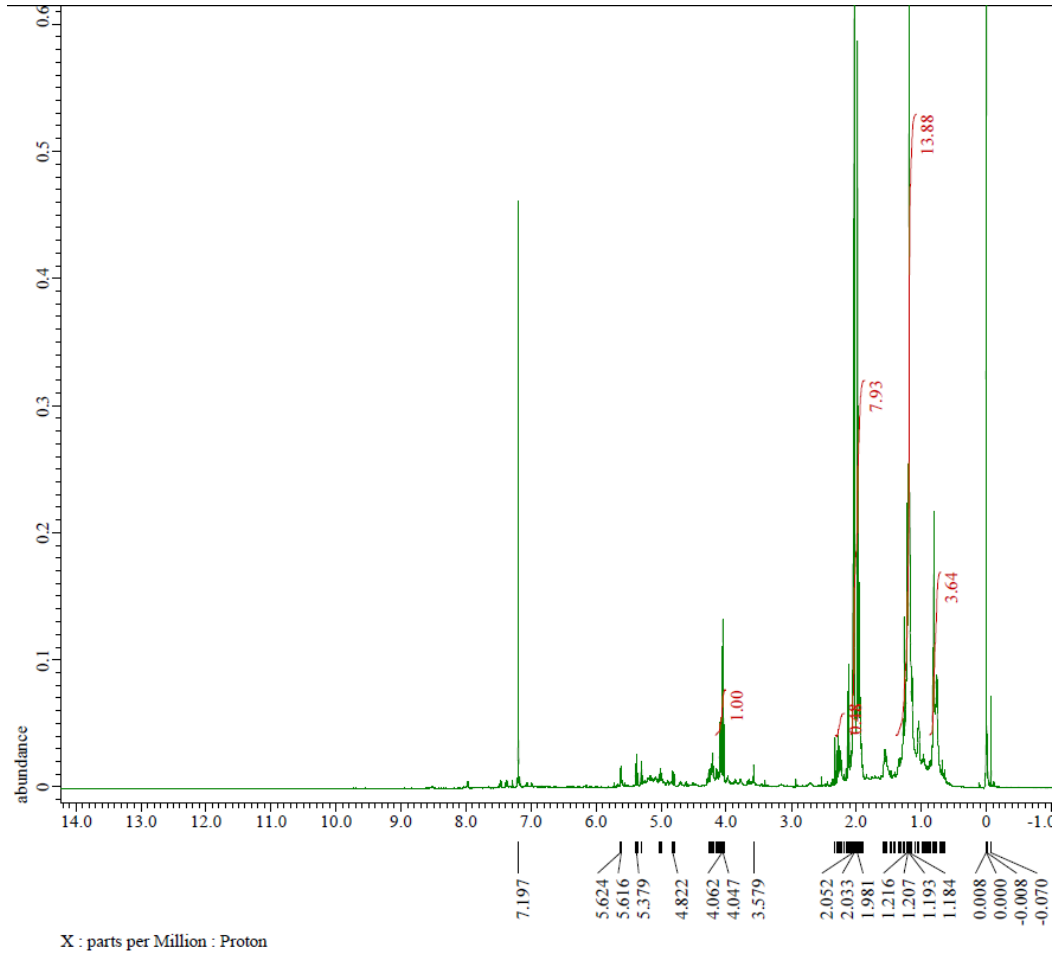
Konsantrasyon (ppm)	% Canlılık
Kontrol	100
1	100
5	101,52
10	104,55
50	104,55
100	104,55
150	104,55
200	106,82
240	109,09



Şekil 3.46. GLY-3 numunesine ait % canlılık grafiği.

Numune örneklerini standart referans madde ile kıyasladığımızda direkt elde edilen glisirizin amonyum tuzunun (GLY-1) toksik özellik gösterdiği tespit edilmiştir. GLY-1 kodlu örneğin saflaştırma işlemleri uygulanmış hali olan GLY-2 kodlu numune ise canlılık özelliğinin GLY-1'e kıyasla arttığı gözlenmiştir. GLY-3 kodlu numune ise GLY-2 numunesinin flash kromatografi ile saflaştırılmış halidir ve canlılık özelliğinin arttığı toksisite göstermediği gözlenmiştir.

3.6. NMR SONUÇLARI



Şekil 3.47. GLY-AT'ın NMR spektrumu.

Glizirizik asit, bir triterpen kısmı (bir karboksilik grup ile) ve bir dimer glukuronik asitten (iki karboksilik grup ile) oluşur. İzole edilen bileşiğin ^1H NMR spektrumları kloroform- d_6 (CDCl_3-d_6) içerisinde çözülerek bileşiklerin farklı kimyasal çevreye sahip protonlarının kimyasal kayma değerleri tespit edilmiştir. İzole edilen bileşiğin ^1H NMR spektrumlarında, çözücü olarak kullanılan kloroform- d_6 'ya ait metil pikleri 7.197 ppm değerinde gözlenmiştir.

Bileşik ^1H NMR spektrumları, 0.79, 0.81, 0.82, 1.18, 1.26, 1.53 ve 1.54'te yedi metil singletin varlığını gösterir. Buda bileşiğin bir terpenoid iskelete sahip olduğunu göstermiştir. Oksimetil bağına ait pik 3,57 de gözlemlenmiştir. ^1H NMR: δ 0.85-1.06 (15H, 0.90 (s), 0.95 (s), 0.98 (s), 1.00 (s), 1.01 (s)), 1.13 (3H, s), 1.20-2.20 (22H, 1.25 (s), 1.31 (ddt, $J = 13.1, 4.3, 1.4$ Hz), 1.44 (dddd, $J = 13.1, 9.8, 9.1, 5.5$ Hz), 1.44 (ddd, $J = 13.2, 9.8, 3.4$ Hz), 1.51 (ddd, $J = 14.1, 10.1, 2.8$ Hz), 1.59 (ddd, $J = 13.2, 4.0, 2.5$ Hz),

1.61 (ddd, J = 12.9, 10.1, 3.6 Hz), 1.60 (dd, J = 9.1, 1.4 Hz), 1.65 (ddd, J = 14.2, 10.3, 3.0 Hz), 1.66 (ddd, J = 13.3, 9.8, 4.3 Hz), 1.72 (ddd, J = 13.3, 5.5, 1.4 Hz), 1.81 (dt, J = 12.9, 2.8 Hz), 1.86 (ddd, J = 14.1, 3.6, 2.8 Hz), 1.93 (ddd, J = 14.1, 9.8, 4.0 Hz), 1.95 (ddd, J = 14.2, 3.3, 2.3 Hz), 2.00 (dddd, J = 14.1, 4.3, 3.0, 2.3 Hz), 2.03 (dddd, J = 14.1, 10.3, 9.9, 3.3 Hz), 2.08 (ddd, J = 14.1, 3.4, 2.5 Hz), 2.09 (dd, J = 13.4, 3.4 Hz), 2.12 (dd, J = 13.4, 10.1 Hz), 2.37 (1H, dd, J = 10.1, 3.4 Hz), 2.70 (1H, s), 3.23 (1H, t, J = 3.5 Hz), 3.34 (1H, t, J = 3.5 Hz), 3.48-3.60 (2H, 3.54 (dd, J = 3.5, 2.6 Hz), 3.54 (dd, J = 3.5, 2.6 Hz)), 3.64-3.86 (3H, 3.71 (dd, J = 10.3, 3.5 Hz), 3.78 (dd, J = 9.9, 4.3 Hz), 3.79 (dd, J = 10.3, 3.5 Hz)), 4.05-4.21 (2H, 4.11 (d, J = 10.3 Hz), 4.15 (d, J = 10.3 Hz)), 4.48-4.65 (2H, 4.53 (d, J = 2.6 Hz), 4.59 (d, J = 2.6 Hz)), 6.02 (1H, s).



4. SONUÇ

Bitkiler ile tedavi kültürü antik çağdan günümüze kadar süregelmiştir. Doğal bitkisel ürünler büyük rağbet görmektedir. Geleneksel tamamlayıcı tıbbın popülaritesi gün geçtikçe artmaktadır. Son yıllarda modern tıbbın tedavi uygulamalarına destek amaçlı olarak geleneksel tamamlayıcı ve alternatif tıp tedavi uygulamaları ilgi görmektedir. Bitkisel içerikli ürünler genellikle çok sayıda etken maddeden oluşmaktadır ve kullanım sırasında birbiriyle etkileşime girebilir. Bu etkileşim mekanizmalarını açıklamak için bitki kökenli ürünlerin biyoaktif bileşenlerini tespit etmek ve etkileşim mekanizmalarını araştırmak gerekmektedir. Doğal bitkisel ürünler geleneksel tıpta büyük öneme sahiptir. Bu tür ürünlerin kullanılmasının bilinçli bir şekilde ve hekim kontrolünde olması gerekmektedir. Paraselsus'un dediği gibi "*Tüm maddeler zehirdir, ilacı zehirden ayıran dozudur*". Her bir bitkisel ürün içerdiği etken bileşikler ile hem tedavi edici özellikler gösterebildiği gibi hem de belli bir dozdan sonra yan etkiler gösterebilir. Bu durumun önüne geçmek için kullanılan ürünlerin standardize edilmiş olması gerekmektedir. İçerdiği etken madde ve miktarının net olarak belirlenmiş olması büyük önem taşımaktadır. Sadece bununla kalınmayıp etken maddelerin doz aralıklarının da çalışılması ve farmakolojik etkilerinin incelenmesi gerekmektedir. Bu tez çalışması kapsamında çalışılan meyan kökü asırlardır tüketimi olan hem gıdalarda tatlandırıcı hem de tedavi edici özellikleri ile kullanılan bir materyaldir. Bu özelliklerinin yanı sıra meyan kökünün yan etkileri de mevcuttur. Örneğin, meyan kökü, kan basıncını yükselten ve su tutmayı teşvik eden bileşikler içerir. Ayrıca, meyan kökü, östrojen benzeri etkilere sahip bileşikler içerir, bu nedenle hormon düzenleyici ilaçlarla birlikte kullanıldığında hormonal dengesizliğe neden olabilir. Türk Gıda Kodeksi Gıda Etiketleme ve Tüketicileri Bilgilendirme Yönetmeliği'nde 50 mg/L veya daha fazla konsantrasyonda glisirizik asit veya glisirizik asidin amonyum tuzunu içeren içeceklerin etiketlerinde "*Meyankökü içerir. Yüksek tansiyon hastaları aşırı tüketimden kaçınmalıdır.*" uyarısı bileşenler listesinin hemen ardına eklenmelidir. Standardize edilen ürünlerin belirlenen doz aralıklarında tüketimi oldukça önem kazanmaktadır.

Bu tez çalışması kapsamında meyan kökünden glisirizinin ekstraksiyonu ve saflaştırılması amacıyla çeşitli ekstraksiyon ve ön işlemler gerçekleştirilmiş ve uygulanan ekstraksiyon yöntemlerinde refluks ekstraksiyonu, ultrasonik destekli ekstraksiyon, adsorban uygulamaları, asidik ortam ve bazik ortamda gerçekleştirilen

ekstraksiyon yöntemlerinde boyar madde ve diğer fenolik içerikli bileşiklerin yüksek konsantrasyonlarda ekstrakte edilmesi ile glisirizinin saflığını ve derişimini etkilediği gözlemlenmiştir. Glisirizine ait olan pik şekillerinde anormallikler olduğu ve farklı dalga boylarında safsızlıklar içerdiği Çizelge 3.14'te listelenmiştir. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde optimum ekstraksiyon koşullarında ön yıkama için polar veya apolar solventlerin kullanılması, ekstraksiyon solventi olarak tercihen alkol ve su içerikli solventlerin kullanılması, adsorban uygulaması ile polar ve apolar safsızlıkların giderilmesi gerektiği belirlenmiştir. Glisirizinin asidik-bazik çöktürme ile tuz formunda eldesi sağlanmıştır. Yapı ve miktar tayini için LC-MS/MS, HPLC ve NMR tekniklerinden faydalanılmıştır. LC-MS/MS uygulamasında moleküler iyon pikleri $[M]^+$ ve $[M]^-$ parçalanma ürünleri saptanmıştır. HPLC analizleri ile referans standart madde ile karşılaştırılmıştır. Glisirizin amonyum tuzunun su, metanol ve etanol içerisindeki çözünürlüğü ortalama olarak 1-5 mg/ml'dir. Amonyum tuz formu dışında farklı tuz formları oluşturularak potasyum, magnezyum ve kalsiyum gibi çözünürlük miktarları arttırabilir. Flash kromatografi basamağında akış hızına bağlı olarak solvent tüketimi diğer analitik cihazlarla kıyaslandığında daha yüksektir. Distilasyon sistemi ile solvent geri kazanımı sağlanabilir. Sonuç olarak; Glisirizin amonyum tuzunun flash kromatografi ile saflaştırılması Çizelge 3.18'da analiz sonucu ve Şekil 3.36'de diğer safsızlıklar dahil edilerek hesaplandığında %83,37 pik alanına sahip olduğu ve pik saflığının ise 1,00 değerinde olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen glisirizin amonyum tuzunun ekstraksiyon verimi ortalama olarak %2,40'tır. Sitotoksite çalışmalarında saflaştırma işlemleri sonrası elde edilen glisirizin amonyum tuzunun toksik etki göstermediği ve canlılığı arttırdığı gözlenmiştir. Bu verim miktarı kullanılan meyan kökünün yetiştirildiği bölgeye, saklama koşullarına, meyan kökünün türüne, hasat zamanına göre değişkenlik gösterebilir. Bitkilerde mevcut olan sekonder metabolitler çevresel etkilere karşı kendilerini savunabilmek amacıyla üretilmektedir bu durum aynı bitki türünün farklı coğrafyalarda farklı miktarlarda sekonder metabolit içermesinin bir tanımıdır. Çevresel faktörler bitkilerin savunma mekanizmasının düzenlenmesinde son derece önemlidir. Birçok bitki, yetiştiği bölgede mevcut olan bir böcek türüne göre kendi savunma mekanizmasını geliştirir ve gelişme, büyüme evrelerinde yaşamsal faaliyetlerini sürdürebilmek için bu bileşikleri sentezler. Sekonder metabolit mekanizma sonucunda biyoaktif bileşikler saponinler gibi bitkiyi otçul böcekler ve diğer mikrobiyal etkilere karşı korumaktadır.

Meyan kökü ülkemizde üretimi ve tüketimi oldukça yaygındır. TÜİK 2022 yılı verilerine göre; meyan kökünün ihraç edilen miktarı 2400 ton ve ithal edilen miktarı ise 1700 ton olarak karşımıza çıkmaktadır. İhracat hacmi 5 049 450 \$ ve ithalat hacmi 2 759 513 \$ olarak gerçekleşmiştir. Bu tez kapsamında elde edilen glisirizinin asit hidrolizi ile glisiretinik asit eldesi gerçekleştirilebilir. Hem glisirizin hem de glisiretinik asit kozmetik ve kişisel bakım, gıda ve içecek, farmasötik, tütün ürünleri ve tarım ürünleri sektörlerinde kullanılmaktadır. Tez çalışmasında elde edilen glisirizin amonyum tuzu sonrası geriye kalan meyan kökü ekstraktı saponin ve fenolik bileşen içeriği oldukça yüksektir; bu ekstrakt üzerine yeni çalışmalar gerçekleştirilebilir, deterjan ve temizlik sektörlerinde değerlendirilebilir ve glisirizin içermemesinden dolayı tansiyon hastalarının kullanıma uygun olabilir. Katma değeri yüksek ürünlerin eldesi ülkemiz ekonomisi için son derece önemli bir konudur.



5. KAYNAKLAR

- [1] R. Yang, L. Q. Wang, B. C. Yuan, ve Y. Liu, “The Pharmacological Activities of Licorice”, *Planta Medica*, c. 81, sayı 18, ss. 1654–1669, 2015.
- [2] H. Durmaz, M. Hülül, ve H. Çelik, “Meyan (*Glycyrrhiza glabra* L.) Bitkisinin Antibakteriyel ve Antioksidan Aktiviteleri”, *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, c. 7, ss. 37–41, 2018.
- [3] I. Kitagawa, “Licorice root. A natural sweetener and an important ingredient in Chinese medicine”, *Pure and Applied Chemistry*, c. 74, sayı 7, ss. 1189–1198, 2002.
- [4] Y. C. Hou vd., “Profound difference of metabolic pharmacokinetics between pure glycyrrhizin and glycyrrhizin in licorice decoction”, *Life Sciences*, c. 76, sayı 10, ss. 1167–1176, 2005.
- [5] G. Cantelli-Forti, M. A. Raggi, F. Bugamelli, F. Maffei, A. Villari, ve N. M. Trieff, “Toxicological assessment of liquorice: Biliary excretion in rats”, *Pharmacological Research*, c. 35, sayı 5, ss. 463–470, 1997.
- [6] I. E. Orhan ve F. S. Senol Deniz, “Natural Products as Potential Leads Against Coronaviruses: Could They be Encouraging Structural Models Against SARS-CoV-2?”, *Natural Products and Bioprospecting*, c. 10, sayı 4, ss. 171–186, 2020.
- [7] C. Bailly ve G. Vergoten, “Glycyrrhizin: An alternative drug for the treatment of COVID-19 infection and the associated respiratory syndrome?”, *Pharmacology and Therapeutics*, c. 214, 2020.
- [8] V. Acıbuca ve D. Bostan Budak, “Dünya’da ve Türkiye’de Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Yeri ve Önemi Place and Importance of Medicinal and Aromatic Plants in the World and Turkey”, *Çukurova J. Agric. Food Sci.*, c. 33, sayı 1, ss. 37–44, 2018.
- [9] K. Priya, V. R. M. Gupta, ve K. Srikanth, “Natural sweeteners: A complete review.”, *Journal of Pharmacy Research*, c. 4, sayı 7, ss. 2034–2039, 2011,
- [10] R. A. Isbrucker ve G. A. Burdock, “Risk and safety assessment on the

- consumption of Licorice root (*Glycyrrhiza* sp.), its extract and powder as a food ingredient, with emphasis on the pharmacology and toxicology of glycyrrhizin”, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, c. 46, sayı 3, ss. 167–192, 2006.
- [11] M. H. Leskinen *vd.*, “Daily liquorice consumption for two weeks increases augmentation index and central systolic and diastolic blood pressure”, *PLoS ONE*, c. 9, sayı 8, ss. 1–10, 2014.
- [12] M. A. Shabkhiz, M. H. Eikani, Z. Bashiri Sadr, ve F. Golmohammad, “Superheated water extraction of glycyrrhizic acid from licorice root”, *Food Chemistry*, c. 210, ss. 396–401, 2016.
- [13] S. Chauhan, N. Gulati, ve U. Nagaich, “Glycyrrhizic acid: extraction, screening and evaluation of anti-inflammatory property”, *Ars Pharmaceutica*, c. 59, sayı 2, ss. 61–67, 2018.
- [14] Y. Zhang, J. Cao, Y. Wang, ve S. Xiao, “Simultaneous Determination of Glycyrrhizin and 15 Flavonoids in Licorice and Blood by High Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detector”, *ISRN Analytical Chemistry*, c. 2013, ss. 1–7, 2013.
- [15] M. Tian, H. Yan, ve K. H. Row, “Extraction of glycyrrhizic acid and glabridin from licorice”, *International Journal of Molecular Sciences*, c. 9, sayı 4, ss. 571–577, 2008.
- [16] C. H. Risner, “Evaluation of HPLC mobile phases and extracts for the determination of glycyrrhizic acid in licorice and tobacco”, *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, c. 31, sayı 9, ss. 1337–1345, 2008.
- [17] S. Kulkarni, S. Palghadmal, A. Sawant, S. Bhope, S. Padmanabhan, ve G. J. Pharmaceu Sci, “RP-HPLC Method Development and Validation for Simultaneous Estimation of Glabridin, Glycyrrhizic Acid and Total Flavonoids in *Glycyrrhiza glabra* Extract: Stability Studies of Constituents”, *Global Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, c. 8, sayı 1, ss. 1–5, 2021.
- [18] D. Thakur, Abhilasha, A. Jain, ve G. Ghoshal, “Evaluation of phytochemical, antioxidant and antimicrobial properties of glycyrrhizin extracted from roots of *glycyrrhiza glabra*”, *Journal of Scientific and Industrial Research*, c. 75, sayı 8, ss. 487–494, 2016.

- [19] M. M. İşgör, A. Küçükgül, G. O. Kocamüftüoğlu, ve H. Ata, “Eurasian Journal Of Health Sciences Research Article / Investigation of Antiinflammatory and Antioxidant Effects of Glycyrrhizin on Rats with Experimental Diabetes Deneyisel Diyabetli Ratlarda Glisirizin ’ in Antienflamatuar ve Antioksidan Etkilerinin Araş”, c. 2, sayı 2, ss. 73–80, 2019.
- [20] C. N. Ekşi, E. Özçelik, B. Ayana Çam, ve Ç. Uysal Pala, “Geleneksel Meyan Kökü Şerbeti Hazırlama Sürecinde Farklı Sıcaklık Uygulamalarının Şerbetin Mikrobiyolojik Kalitesi ve Biyoaktif Bileşenleri Üzerine Etkisi (The Effects of Different Temperature Applications on Microbiological Quality and Bioactive Compound”, *Journal of Tourism and Gastronomy Studies*, c. 5, sayı 2, ss. 276–286, 2017.
- [21] M. Sohail, A. Rakha, M. S. Butt, ve M. Asghar, “Investigating the antioxidant potential of licorice extracts obtained through different extraction modes”, *Journal of Food Biochemistry*, c. 42, sayı 2, 2018.
- [22] A. H. A. Abdel-Wahab, H. Effat, E. A. Mahrous, M. A. Ali, ve T. A. Al-Shafie, “A Licorice Roots Extract Induces Apoptosis and Cell Cycle Arrest and Improves Metabolism via Regulating MiRNAs in Liver Cancer Cells”, *Nutrition and Cancer*, c. 73, sayı 6, ss. 1047–1058, 2021.
- [23] Y. F. Zheng, J. H. Wei, L. W. Qi, J. M. Cheng, ve G. P. Peng, “A green and efficient protocol for large-scale production of glycyrrhizic acid from licorice roots by combination of polyamide and macroporous resin adsorbent chromatography”, *Journal of Separation Science*, c. 36, sayı 4, ss. 809–816, 2013.
- [24] W. Yu vd., “Purification of high-purity glycyrrhizin from licorice using hydrophilic interaction solid phase extraction coupled with preparative reversed-phase liquid chromatography”, *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, c. 1040, ss. 47–52, 2017.
- [25] T. Tianwei, H. Qing, ve L. Qiang, “Purification of glycyrrhizin from *Glycyrrhiza uralensis* Fisch with ethanol/phosphate aqueous two phase system”, *Biotechnology Letters*, c. 24, sayı 17, ss. 1417–1420, 2002.
- [26] T. W. Charpe ve V. K. Rathod, “Separation of glycyrrhizic acid from licorice root extract using macroporous resin”, *Food and Bioproducts Processing*, c. 93,

sayı October, ss. 51–57, 2015.

- [27] L. A. Baltina *vd.*, “Synthesis of glycyrrhizic acid from glycyrram and pharmacological characterization of the product”, *Pharmaceutical Chemistry Journal*, c. 35, sayı 1, ss. 40–44, 2001.
- [28] A. Garjani, “Pharmaceutical sciences”, *Pharmaceutical Sciences*, c. 22, sayı 1, s. 1, 2016.
- [29] J. Y. Li, H. Y. Cao, P. Liu, G. H. Cheng, ve M. Y. Sun, “Glycyrrhizic acid in the treatment of liver diseases: Literature review”, *BioMed Research International*, c. 2014.
- [30] C. S. Graebin, “The Pharmacological Activities of Glycyrrhizinic Acid (‘Glycyrrhizin’) and Glycyrrhetinic Acid”, *Reference Series in Phytochemistry*, ss. 245–261, 2018.
- [31] L. Yang, Y. Jiang, Z. Zhang, J. Hou, S. Tian, ve Y. Liu, “The anti-diabetic activity of licorice, a widely used Chinese herb”, *Journal of Ethnopharmacology*, c. 263, sayı May, s. 113216, 2020.
- [32] J. Yang, L. Zhou, J. Wang, C. Wang, ve A. K. Davey, “The disposition of diammonium glycyrrhizinate and glycyrrhetinic acid in the isolated perfused rat intestine and liver”, *Planta Medica*, c. 74, sayı 11, ss. 1351–1356, 2008.
- [33] A. A. Gomaa ve Y. A. Abdel-Wadood, “The potential of glycyrrhizin and licorice extract in combating COVID-19 and associated conditions”, *Phytomedicine Plus*, c. 1, sayı 3, 2021.
- [34] E. Reich, A. Schibli, ve A. DeBatt, “6a-Licorice Method Evaluation - Evaluation and Optimization of Identification Method for Licorice by HPTLC Fingerprint”, *JAOAC Int*, c. 91, sayı 1, ss. 196Supp-210Supp, 2008.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Bora KARAGÜL

Yabancı Dili : İngilizce

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Doktora	Doğal, Bitkisel Ve Kozmetik Ürünler	Düzce Üniversitesi	2023
Y. Lisans	Kimya Bölümü	Düzce Üniversitesi	2017
Lisans	Kimya Bölümü	Düzce Üniversitesi	2014
Lise	Matematik-Fen	Prof. Faik Somer Anadolu Lisesi	2009

YAYINLAR

A. Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

- A1. Sibel Bayıl Oğuzkan, **Bora Karagül**, Esra Kütük, İbrahim Halil Kılıç, Halil İbrahim Uğraş, “Effects on Antibacterial and DNA Protection of Organic Dyestuff Extracts Obtained from Hazelnut Nuthusk,” *Int. J. Sec. Metabolite*, Vol. 4: 3 (2017) pp. 211-217
- A2. Sibel Bayıl Oguzkan, **Bora Karagül**, Ayşe Uzun, Özen Özensoy Güler and Halil İbrahim Uğras, “Pre-purification of an Anticancer Drug (Paclitaxel) Obtained from Nut Husks,” *International Journal of Pharmacology*, DOI: İJP.0000.85394.85394, 14, 76-822018,
- A3. Sibel Bayıl Oğuzkan, **Bora Karagül**, Elif Sine Aksoy, Ayşe Uzun, Merve Can, Hasibe Yılmaz, Halil İbrahim Uğras, Burcu Binici and Ahmet C.Goren, “Determination Of Taxanes By Validated LC-MS/MS Method In

- Hazelnut Collected From Different Regions And Altitudes İn Turkey,” *J. Chem.Metrol.* 12:1 (2018) 26-33, <http://doi.org/10.25135/jcm.16.18.03.082>
- A4. S. Bayıl Oğuzkan, S. Uğraş, E. S. Aksoy, S. Ülger, Ş. Üzmez, **B. Karagül** & H. İ. Uğraş, “Biological Activity Analysis Of Hazelnut Nutshell Extracts,” *International Journal of Chemical and Natural Science*, 2016, 2347-6672, 4, 5, 481-485
- A5. S. Ulger, S. B. Oguzkan, S. Ugras, M. Can, A. Uzun, S. Uzmez, B. Karagul, H. I. Kılıc, M. Ozaslan & H. I. Ugras, “Biological Activity Analysis of Hazelnut (Corylus avellana L.) Green Shell and Leaf Extracts,” *Kahramanmaraş Sutcu Imam University Journal Of Natural Sciences*, 2016, 1309-1743, 19, 4, 373-378
- A6. Sibel Bayıl Oğuzkan, Şeref Karadeniz, **Bora Karagül**, Ayşe Uzun, Elif Sine Aksoy, Özen Özensoy Güler, Ümit Çakır and Halil İbrahim Uğraş, “Effects of Some Adsorbents on the Pre-purification of Taxol (Anticancer Drug) from Hazelnut Nutshells.” *International Journal of Pharmacology*, 2018, 14 : 835-840.

B. Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

- B1. Sibel Bayıl Oğuzkan, Serpil Uğraş, Merve Can, Ayşe Uzun, Sultan Ülger, Şebnem Üzmez, **Bora Karagül**, İ. Halil Kılıç, Mehmet Özaslan, Halil İbrahim Uğraş, Fındık (Corylus avellana L.) Yeşil Kabuk ve Yaprak Ekstraktlarında Biyolojik Aktivite Tayini, *KSÜ Doğa Bil. Derg.*, 19(4), 373-378, 2016
- B2. Sibel Bayıl Oğuzkan, Serpil Uğraş, E. Sine Aksoy, Sultan Ülger, Şebnem Üzmez, **Bora Karagül** and Halil İbrahim Uğraş ‘Biological Activity Analysis of Hazelnut Nutshell Extracts’ *KSÜ Doğa Bil. Derg.*, Vol. 4, No. 5 (2016): 481-485
- B3. Pınar Aydın, **Bora Karagül**, Şeref Karadeniz ve Halil İbrahim Uğraş, Bazı Aminoasit Gümüş Tuzlarının Sentezi Ve Karakterizasyonu, *Journal of Advanced Technology Sciences*, Cilt 7, Sayı 2 (2018), ISSN:2147-3455