



Experimental Design and Multi- Response Optimization of Green Solvent Extraction Conditions for Rosmarinic Acid and Antioxidant Components in *Ocimum basilicum* L.

Nilüfer Vural^{1,2,a,*}, Özlem Yalçınçıray^{3,b}, Özge Algan Cavuldağ^{4,c}

¹Department of Food Processing, Vocational School of Technical Sciences, Ankara Yıldırım Beyazıt University, 06760 Çubuk/Ankara, Turkey

²Department of Traditional, Complementary and Integrative Medicine, Institute of Public Health, Ankara Yıldırım Beyazıt University, 06010 Etilik/Ankara, Turkey

³Department of Gastronomy and Culinary Arts, Faculty of Fine Arts, Istanbul AREL University, 34537 Tepekent/Istanbul, Turkey

⁴Department of Food Engineering, Faculty of Engineering, Zonguldak Bülent Ecevit University, 67100 İncivez/Zonguldak, Turkey

*Corresponding author

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p><i>Research Article</i></p> <p>Received : 29/07/2021 Accepted : 31/08/2021</p> <p>Keywords: <i>Ocimum basilicum</i> Rosmarinic acid TPC TAA Modeling, optimization</p>	<p>The main purpose of this study is to develop and optimize a method based on the hydroalcoholic solvent extraction of rosmarinic acid (RA) which is an important active component in the polyphenolic profile of the plant and, stands out with its antioxidant, antibacterial, and antiviral properties, and other antioxidant components. Soft computing-based chemometric studies are needed to model and optimize complex processes such as extraction. In this study, the extraction conditions of bioactive RA from <i>Ocimum basilicum</i> L., a valuable medicinal aromatic plant source, with green and simple technique, were modeled and optimized using chemometric methods. Additionally, it was also aimed to evaluate the potential of RA in <i>O. basilicum</i> with the amount of Total phenolic substance (TFM) and Total antioxidant activity (TAA). In the study, RSM-CCD/small factorial design was used, multi-response optimization was solved with the help of Pareto solutions, and the Desirability function was used to determine the optimum input variable values. As a result, optimum conditions of <i>O. basilicum</i> L. extraction, 47.7% EtOH concentration, 30.0 °C temperature, 77.6 min extraction time, and 10 mL/g solvent/solid ratio were found. Experimental results obtained under optimum conditions were 171.46±1.87 mg GAE/g, 4.76±0.32 mg Trolox/mL, and 8.93±0.65 mg/g for TPC, TAA and RA, respectively. The predicted results from the mathematical model were (172.26 mg GAE/g), (4.13 mg Trolox/mL) and (8.89 mg/g), respectively.</p>

Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 9(9): 1720-1730, 2021

Ocimum basilicum L. Bitkisinde Rosmarinik Asit ve Antioksidan Bileşenler İçin Yeşil Ekstraksiyon Koşullarının Deneysel Tasarımı ve Çok Yanıtlı Optimizasyonu

MAKALE BİLGİSİ	ÖZ
<p><i>Araştırma Makalesi</i></p> <p>Geliş : 29/07/2021 Kabul : 31/08/2021</p> <p>Anahtar Kelimeler: <i>Ocimum basilicum</i> Rosmarinic asit TFM TAA Modelleme, optimizasyon</p>	<p>Bu çalışmanın temel amacı, bitkinin polifenolik profilinde etkin önemli bir bileşen olan ve antioksidan, antibakteriyel ve antiviral özellikleri ile öne çıkan rosmarinik asit (RA) ile diğer antioksidan bileşenlerin hidroalkolik çözücü ekstraksiyonuna dayalı bir yöntem geliştirmek ve optimize etmektir. Ekstraksiyon gibi karmaşık süreçleri modellemek ve optimize etmek için yumuşak bilgi işlem tabanlı kemometrik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu sebeple yapılan çalışmada, değerli bir tıbbi aromatik bitki kaynağı olan <i>Ocimum basilicum</i> L.'den biyoaktif RA'ın yeşil ve basit bir teknikle ekstraksiyon koşullarını, kemometrik yöntemler kullanılarak modellenmesi ve optimizasyonu sağlanmıştır. Bunun yanı sıra <i>O. basilicum</i>' da bulunan RA'ın potansiyelini, Toplam fenolik madde (TFM) miktarı ve Toplam antioksidan aktivite (TAA) ile değerlendirmek de hedeflenmektedir. Yapılan çalışmada RSM-CCD/dar faktöriyel tasarım kullanılmış, çok yanıtlı optimizasyon Pareto çözümleri yardımıyla çözülmüş ve optimum girdi değişkeni değerlerini belirlemek için İstenebilirlik fonksiyonu kullanılmıştır. Sonuç olarak, <i>O. basilicum</i> L. ekstraksiyonun optimum koşulları; %47,7 EtOH konsantrasyonu, 30,0°C sıcaklık, 77,6 dk ekstraksiyon süresi ve 10 mL/g çözücü/katı oranı bulunmuştur. Optimum koşullar altında elde edilen deneysel sonuçlar TFM, TAA ve RA için sırasıyla 171,46±1,87 mg GAE/g, 4,76±0,32 mg Troloks/mL ve 8,93±0,65 mg/g'dır. Matematiksel modelden tahmin edilen sonuçlar sırasıyla (172,26 mg GAE/g), (4,13 mg Troloks/mL) ve (8,89 mg/g) olarak bulunmuştur.</p>

^a n.vural@ybu.edu.tr

^b <https://orcid.org/0000-0003-3047-3004>

^b ozlemyalcinciray@gmail.com

^c <https://orcid.org/0000-0001-9033-1935>

^c ozge.ac@beun.edu.tr

^b <https://orcid.org/0000-0001-8349-9035>



This work is licensed under Creative Commons Attribution 4.0 International License

Giriş

Günümüzde insanların beslenme ve sağlık konularında hiç olmadıkları kadar bilgili olmaları; hastalıkların gelişiminde ve önlenmesinde, sağlığı geliştirici bir diyet ve fiziksel aktivite, kilo yönetimi ve daha sağlıklı bir yaşam tarzının, genetik faktörlerin yanında oldukça önemli bir rol oynadığı bilincinin gelişmesini sağlamıştır. Bunun yanı sıra insanlar çeşitli takviyeler yoluyla ve sağlığı geliştirici faktörleri içerecek şekilde formüle edilen veya güçlendirilen gıdaları tüketerek diyetlerinin, sağlığı geliştirme yeteneklerini optimize edebilmeye başlamışlardır (Wildman, 2019). Ayrıca modern yaşam koşulları, mevcut nüfus ve sağlık eğilimlerinin yanı sıra nutrasötik ve fonksiyonel özellik gösteren maddelerin özelliklerini ve potansiyel uygulamalarını belirlemeye yönelik araştırmaların artması, fonksiyonel gıda pazarının büyümesinin başlıca nedenleri arasında yer almaktadır. Beslenme ve hastalık ilişkilerinin açığa çıkması, beslenmenin birçok hastalığın önlenmesinde çok önemli olduğunu doğrulamıştır. Bunun sonucunda tüketiciler, gıdaların sağlıklarına doğrudan katkıda bulunabileceğine giderek daha fazla inanmaya başladıkları için günümüzde gıdalar sadece açlığı gidermek amacıyla tüketilmekle sınırlı kalmamakta aynı zamanda hastalıkları önlemek ve ruh sağlığını geliştirmek gibi fonksiyonel görevler de üstlenmektedir (Teofilović ve ark., 2021).

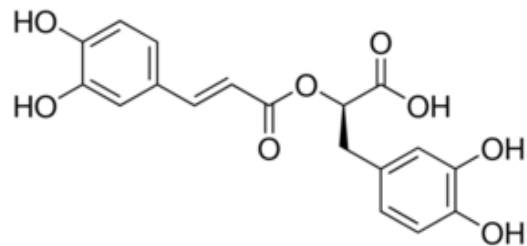
Besinlere bu fonksiyonel işlevsellik çoğu şifalı bitkilerin içerdikleri antioksidan bileşenler, diyet lifleri, vitaminler, mineraller vb. sayesinde kazandırılmaktadır. Fenolik bileşiklerin güçlü antioksidatif potansiyelleri doğrudan serbest radikal süpürme kapasitelerinin bir sonucudur ve oksidatif stresi ve onun sonuçlarını azaltmaktadır (Lobo ve ark., 2010; Shahidi, 2004). Polifenolik bileşiklerin, güçlü antioksidan, anti-alerji, antimikrobiyal, anti-kanserojen ve anti-inflamatuar ajan rollerine ek olarak; tümör hücresi çoğalması, karsinogenez, bronşiyal astım, peptik ülser, ateroskleroz, spazmojenik bozukluklar, iskemik kalp hastalığı, hiperglisemi, hepatotoksisite, depresyon, katarakt da dahil olmak üzere çeşitli hastalıklara ve sağlık risklerine karşı hayati roller oynadığı gösterilmiştir (Alagawany ve ark., 2017)

Tıbbi aromatik şifalı bitkiler içeren *Lamiaceae* familyasında, *Ocimum* cinsine göre sınıflandırılan fesleğen, Asya'daki tropikal ve subtropikal bölgelere özgü olmakla birlikte; Güney ve Kuzey Amerika, Afrika ve Avrupa'da iklimlendirilmiş ve 160 kadar farklı türden oluşmaktadır (Dudai ve ark., 2020). Yapılan çalışmalar *Lamiaceae* familyasından olan bitkilerin gerek mutfakta gerekse tıbbi özelliklerinden dolayı şifalı bitki olarak kullanılabilirliğini ve zengin polifenolik bileşik, özellikle de fenolik asit kaynakları olduğunu göstermektedir (Castronuovo ve ark., 2019; Kwee ve Niemeyer, 2011). Fesleğen (*Ocimum basilicum* L.) bitkisi ekstraktları vitaminler, mineraller, hidroksisinnamik asitler, hidroksibenzoik asitler ve flavonoidler vb. fenolik maddeler gibi insan sağlığına faydaları olan çok çeşitli bileşikler içermektedir. İçerdiği bu zengin fenolik bileşenler nedeniyle önemli antioksidan aktivite göstermekte ve hastalıklarla mücadele potansiyeline katkıda bulunabilen zengin antioksidan kaynakları sebebi ile fonksiyonel gıda olarak kabul edilmektedir (Carvalho ve ark., 2016; Teofilović ve ark., 2021).

Geleneksel olarak süs bitkisi olmasının yanı sıra fesleğen (*Ocimum basilicum* L.), tıptan beslenmeye, tatlandırmaya kadar birçok alanda kullanılmaktadır (Złotek ve ark., 2016). Fesleğen bitkisinin çiçekleri ve yaprakları gıdalarda ve mutfak uygulamalarında baharat ve aroma verici olarak kullanılmakla birlikte yatıştırıcı, sindirim ve iltihap önleyici etkilerinden dolayı parfümeri, ilaç ve tıp endüstrileri gibi ekonomik açıdan önemli alanlarda, çoğunlukla diş veya ağız bakımı için yaygın olarak kullanılmaktadır (Castronuovo ve ark., 2019; Shanida ve ark., 2017, 2021). Fesleğen yaprakları içerdiği esansiyel ve uçucu yağların tıbbi özelliklerinden dolayı geleneksel tıpta spazm giderici, gaz giderici ve mideye özgü olarak algılanmakta ve mide bulantısı, dizanteri, gastroenterit veya karın kramplarını tedavi etmekte kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra fesleğenin bazı ksenobiyotiklere karşı koruyucu etkilerinin, merkezi sinir sistemini uyarma kapasitesinin ve radyasyondan koruyucu etkinliğinin olduğu da belirlenmiştir (Sajjadi, 2006; Uma Devi ve ark., 2000). Fesleğenin sağlığa faydaları ve anti-alerjik, antikanser, antimikrobiyal, antiseptik, spazm önleyici, mantar önleyici, antiviral, iltihap önleyici, analjezik, bağışıklık uyarıcı, yatıştırıcı ve antioksidan özellikleri, içerdiği polifenol ve aromatik bileşiklerinden kaynaklanmaktadır (Taie ve ark., 2010; Złotek ve ark., 2016).

Fesleğende bulunan ana fenolik bileşiklerin fenolik asitler, flavonol glikozitleri ve antosiyaninler olduğu belirlenmiştir. Her ne kadar fesleğende en yaygın ve aktif olarak bulunan fenolik bileşik Rosmarinik asit (RA) olsa da, fesleğenin farklı tür ve çeşitleri içerisinde sisorik, vanilik, *p*-kumarik, benzoik, hidroksibenzoik, şirincik, ferulik, protokateşik, kafeik ve gentisik asitler gibi diğer fenolik asitler de bulunmaktadır (Kwon ve ark., 2020; Makri ve Kintzios, 2008; Złotek ve ark., 2016).

Polifenoller sınıfına ait ve yapısal olarak bir kafeik asit dimeri (*R-O*-kafeol-3,4-dihidroksifenil-laktik asit) olan rosmarinik asit (RA) (Şekil 1) doğada biberiye, adaçayı, kekik, fesleğen gibi çok sayıda aromatik ve tıbbi bitkide yaygın olarak bulunmakta ve başta gıda ve kozmetik olmak üzere pek çok sektörde düşük toksisitesinin yanı sıra yüksek antibakteriyel ve antiviral etkisi ile doğal antioksidan formülasyonların geliştirilmesini sağlamaktadır (Alagawany ve ark., 2017; del Baño ve ark., 2003; Gao ve ark., 2005; Kintzios ve ark., 2003; Kwon ve ark., 2020). RA, lipoksijenaz (LOX) ve siklooksijenaz (COX) aktivitelerini inhibe edebilme özelliğinden dolayı bir anti-inflamatuar faktör olarak hareket edebilmektedir. Ayrıca, RA için antioksidan, astrenjan, antimitojenik, antibakteriyel, antiviral ve antidiyabetik özellikler de tanımlanmıştır (Makri and Kintzios, 2008; McCue and Shetty, 2004; Złotek ve ark., 2016).



Şekil 1. Rosmarinik Asitin kimyasal yapısı
Figure 1. Chemical structure of Rosmarinic Acid

Fesleğen bitkisinin gerek gıda gerekse ilaç ve tıp sektöründeki etkilerinden dolayı bitkinin içerdiği biyoaktif bileşiklerin basit ve etkili bir şekilde ekstraksiyonu oldukça önem taşımaktadır. Fesleğen bitkisindeki fenolik bileşimin antioksidan kapasite, biyoyararlılık ve biyoetkililik üzerinde güçlü bir etkiye sahip olduğu düşüncesiyle yapılan bu çalışmada, temel amaç bitkinin polifenolik içeriğini belirlemek ve bunun yanı sıra antioksidan, antibakteriyel ve antiviral özellikleri ile öne çıkan RA ile diğer antioksidan bileşenlerin fesleğen bitkisinden hidroalkolik çözücü ekstraksiyonu için bir yöntem geliştirmek ve optimize etmektir. Ekstraksiyon, besin ve sağlık kaynağı tıbbi-aromatik bitkilerin sahip olduğu bu değerli fenoliklerin tanımlanması ve miktarının belirlenmesi için önemli bir birincil adımdır (Biesaga, 2011). Geleneksel bir teknik olarak çözücü ekstraksiyon tekniği, biyoaktif bileşiklerin geri kazanılması için yaygın olarak kullanılmaktadır (Rahmanian ve ark., 2015).

Son yıllarda çevre bilincinin artması, toplumun yeşil teknolojiye olan ilgisini artırmıştır. Analitik kimya, çevrenin sürdürülebilir gelişiminde değerli bir rol oynar. Bu anlamda, mevcut ekstraksiyon tekniklerinin çevresel açıdan daha sürdürülebilir ekstraksiyon teknikleriyle değiştirilmesi, tüm sürecin yeşil tekniklere dönüşümü için önemli bir adımdır. Ayrıca gıda analizlerinde süreci daha yeşil hale getirmek için ana stratejilerden biridir. Mevcut bir ekstraksiyon yönteminden daha çevreci bir yöntem geçmek için işlem yaparken göz önünde bulundurulması gereken ana hususlardan biri çözücü seçimidir. Literatür, *Ocimum basilicum* bitkisinden polifenollerin ekstraksiyonu için organik çözücüler olarak metanol (MeOH) ve etanolün (EtOH) sulu çözücülerinin yaygın olarak kullanıldığını göstermiştir (Abaza ve ark., 2015; Tsakona ve ark., 2015).

Bu çalışmada, *Ocimum basilicum* bitkisinden biyoaktif değerli bileşiklerin geleneksel çözücü ekstraksiyon koşullarını (çözücü konsantrasyonu, sıcaklık, süre ve çözücü/katı oranı) optimize etmek için yanıt yüzeyi metodolojisi-döndürülebilir merkezi kompozit tasarımı (RSM-RCCD) kullanılmıştır. Bir procesteki gerçek bir problem genellikle birden fazla kalite özelliğine sahiptir. Eşzamanlı kalite özellikleri optimizasyonu için en çok tercih edilen yöntem, istenebilirlik fonksiyonu (Desirability) yaklaşımıdır.

Proses içi optimizasyonun temel sorunu, bir prosesin çok amaçlı özelliklerini en iyi temsil eden optimum çalışma koşullarını belirlemektir. Bu, RSM'de çok amaçlı bir optimizasyon problemi ve deneysel tasarımda önemli bir araştırma alanıdır (Chen ve ark., 2012; Karande ve ark., 2013). İstenebilirlik fonksiyonu yaklaşımı (Desirability), Harrington (1965) tarafından geliştirilmiştir ve endüstrideki çok amaçlı optimizasyon problemleriyle başa çıkmak için sıklıkla kullanılmıştır. Bu matematiksel boyut küçültme stratejisi, tahmin edilen birden çok yanıtı tek boyutsuz bir hedefe dönüştürmek için kullanılmaktadır. Bu tek amaç, daha sonra uzlaşmış bir çözüm sağlamak için maksimize ya da minimize edilir (Costa ve Lourenço, 2016). Bu çalışmada, TFM ve Rosmarinik Asit'in eşzamanlı maksimizasyonu ile TAA'nın minimizasyonu, Pareto-optimal bölge ve Harrington'un istenebilirlik fonksiyonu ile çözülen çok amaçlı bir optimizasyon probleminin amacı olmuştur.

Materyal ve Yöntem

Materyal

Bitki Materyali

Sivas (Gürpınar)-Türkiye'den toplanan *Ocimum basilicum* L. bitki örnekleri, Eczacı Doç.Dr. İsmihan Göze (Göze Eczanesi, Sivas) tarafından sağlanmıştır. No:11013 kayıt numarası ile Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Biyoloji Bölümü Herbaryumuna kaydedilmiştir. Yenilebilir kısımlar (esas olarak yapraklar) gövdelerden ayrılmıştır. Daha sonra fesleğen yaprakları yıkanmış, temizlenmiş ve kurutma kağıtları üzerinde 10 gün boyunca havasız ve gölgeli bir yerde kütle oluşturmadan homojen dağıtılarak kurutulmuştur. Fesleğen bitkisinden fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu için optimum partikül boyutu 0,5 mm olarak belirlenmiş ve kurutulup öğütülen fesleğenler, ekstraksiyon, spektroskopik ve kromatografik analizler için kullanılana kadar cam kavanozlarda ve karanlıkta saklanmıştır.

Kimyasallar

Standart Rosmarinik Asit Fluka'dan (Steinheim, Almanya) satın alınmıştır. Diğer fenolik madde standartları, MeOH, EtOH, asetonitril ve Folin-Ciocalteu fenol reaktifi (FCR), Troloks Sigma'dan (St.Louis, MO, ABD), sodyum karbonat (Na_2CO_3), Sigma-Aldrich'ten (Steinheim, Almanya), asetik asit, trifloroasetik asit ise Merck'ten (Darmstadt, Almanya) temin edilmiştir. Yapılan çalışmada kullanılan su, Human Power II (Seul, Kore) cihazı kullanılarak saflaştırılmıştır (18.2M Ω). Kromatografik analizlerde kullanılan çözücülerin tümü HPLC derecesindedir. Diğer tüm kimyasallar analitik saflıktadır.

Yöntem

Çözücü (EtOH/H₂O) ekstraksiyonu

Ekstraksiyon için öğütülmüş fesleğen örnekleri 1,00 g tartılmıştır. EtOH/H₂O ekstraksiyonları için 50 mL koyu (amber) cam şişeler kullanılmıştır. Isıtma ve karıştırma işlemleri Heidolph MR multi manyetik karıştırıcı ısıtıcılarda karıştırma hızı 100 rpm' de gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon öncesinde fesleğen bitkilerine kurutma ve öğütme dışında herhangi bir ön işlem uygulanmamıştır. Fesleğen örneklerinin farklı oranlarda EtOH/H₂O karışımı ile ekstraksiyonu sonrasında, bitki örnekleri kaba filtre kağıtlarından süzülüş, elde edilen ekstraktın hacmi ölçülmüş ve son hacim EtOH/H₂O çözücü karışımları ile 50mL'ye tamamlanmıştır.

Ekstraksiyon için deneysel tasarım yapılmış ve 21 deney noktası belirlenmiştir. Deney tasarımı ve optimizasyon çalışması için Stat-Ease Design-Expert 12.0.0 yazılım programı kullanılmıştır. EtOH/H₂O çözücü karışımının farklı oranları, sıcaklık, süre ve çözücü/katı oranı çözücü ekstraksiyonu için bağımsız değişkenler olarak belirlenmiştir. Bağımsız değişkenlerin çalışma aralığı ve kodlanmış seviyeleri Çizelge 1'de gösterilmektedir. Her bir bağımsız değişken için çalışma aralığı literatür bilgisine ve ön çalışmalara dayandırılmıştır. EtOH/ H₂O çözücü konsantrasyonu, sıcaklık, ekstraksiyon süresi ve çözücü/katı oranı sırasıyla %7,5-77,5 (%v/v), 20-60°C, 30-150 dk, 2,5-32,5 mL/g olarak belirlenmiştir. Toplam fenolik madde miktarı (Y₁), Toplam antioksidan aktivite (Y₂) ve Rosmarinik asit miktarı (Y₃) bağımlı yanıt değişkenleri olarak kullanılmıştır.

Çizelge 1. Üç bağımlı değişken için dört faktörlü CCRD (Döndürülebilir Merkezi Kompozit Tasarım) dar tasarımı kullanılarak kullanılan bağımsız değişkenlerin etkinlik aralığı ve kodlanmış seviyeleri

Table 1. Experimental range and coded levels of independent variables used in the four-factor small CCRD (Central Composite Rotatable Design) for three dependent variables

Bağımsız değişkenler	Kodlanmış seviyeler ve Etkinlik aralığı				
	-2 (α)	-1	0	+1	+2 (α)
X ₁ : EtOH konsantrasyonu (% v/v)	7,5	25	42,5	60	77,5
X ₂ : Sıcaklık (°C)	20	30	40	50	60
X ₃ : Ekstraksiyon süresi (dk)	30	60	90	120	150
X ₄ : Çözücü/katı oranı (mL/g)	2,5	10	17,5	25	32,5

Toplam Fenolik Madde (TFM) miktarının belirlenmesi

Fesleğen bitkisi ekstraktlarının Toplam fenolik madde miktarı Folin-Ciocalteu yöntemine göre Vural ve ark., (2020) tarafından tarif edildiği gibi belirlenmiştir. TFM absorbansı 765 nm'de Shimadzu 1700 Pharma Spec UV-Vis Spektrofotometre ile ölçülmüştür. Analiz için 40 µL fesleğen bitki ekstresi 4,28 mL distile su ile seyreltilmiş ve ardından 100 µL Folin-Ciocalteu reaktifi (2N) ile karıştırılmıştır. Karışım karanlıkta 5 dk süre bekletilmiş ve ardından 600 µL %20'lik Na₂CO₃ eklenerek çalkalanmıştır. Karışım 40°C sıcaklıkta 75 dakika inkübe edilmiştir.

TFM miktarı, gallik asit eşdeğeri (GAE) olarak hesaplanmıştır. Standart gallik asit kullanılarak elde edilen kalibrasyon eğrisi, 25 ile 3000 mg/L konsantrasyon aralığında hazırlanmış ve regresyon katsayısı 0.9989 hesaplanmıştır. Sonuçlar, bitki gramı başına mg gallik asit eşdeğeri (GAE) olarak ifade edilmiştir.

Toplam Antioksidan Aktivite (TAA) tayini

Fesleğen bitkisinde TAA, Yu ve ark., (2005) önerdiği yöntemde bazı değişiklikler ile 2,2,-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Yu ve ark., 2005). Analizde 300 µL fesleğen ekstraktı, 2,7 mL DPPH (6.10⁻⁵ M) ile karıştırılarak, karanlıkta 30°C sıcaklıkta, 40 dakika bekletilmiştir. Elde edilen karışımın absorbansı, DPPH içermeyen boş bir numuneye karşı 520 nm'de Shimadzu 1700 Pharma Spec UV-Vis Spektrofotometre kullanılarak ölçülmüştür.

Antioksidan aktivite (AA, (% inhibisyon), aşağıdaki denklem (1) kullanılarak hesaplanmıştır.

$$AA = [(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}}] \times 100 \quad (1)$$

A_{kontrol} : Kontrol numunesinin absorbansdır (numunesiz DPPH solüsyonu)

A_{örnek} : Fesleğen bitki ekstresi içeren numunenin absorbansdır.

Yarı maksimum inhibitör konsantrasyon (IC₅₀), bir maddenin belirli bir biyolojik veya biyokimyasal işlevi inhibe etme gücünün bir ölçüsüdür. Hesaplanan %İnhibisyon (DPPH); antioksidan derişimiyle doğru orantılı olduğundan, başlangıç DPPH derişiminde %50 azalmaya neden olan derişim IC₅₀ olarak da tanımlanır (Sanchez-Moreno ve ark., 1998). Hesaplanan IC₅₀ değerleri Troloks eşdeğeri mg/mL olarak hesaplanmıştır ve sonuçlar mgTroloks/g olarak verilmiştir. Toplam antioksidan aktivitesinde hesaplanan IC₅₀ değeri ne kadar düşüğe örneklerin antioksidan aktivitesi o kadar yüksektir. Bu amaçla optimizasyon kısıtlarında TAA bağımlı yanıt değişkeni minimize edilmiştir.

HPLC analizi

Elde edilen ekstraktlarda, Rosmarinik Asit'in kantitatif tayini Shimadzu HPLC-PDA sistemi (Shimadzu, Japonya) kullanılarak yapılmıştır. Kullanılan cihaz, bir otomatik örnekleyici SIL-10AXL, kolon fırını CTO-10A, pompa LC20AT, fotodiyot dizi dedektörü SPD10AVP, CBM-20A kontrol ünitesine bağlı Shimadzu LC Solution yazılımı tarafından kontrol edilen bir sistemden oluşmaktadır. 35°C'de bir Inertsil C18 kolonu (ODS4- 250 × 4.6 mm i.d., 5 µm partikül boyutu) ile iyi bir ayırım elde edilmiştir. Referans standartların ve numunelerin UV-Vis absorpsiyon spektrumları 190 ila 550 nm aralığı taranarak belirlenmiştir. RA için kantitatif tayin 330 nm dalga boyunda yapılmıştır. HPLC analizinde gradient yöntem uygulanmış ve iki fazlı çözücü sistemi ile mobil faz hazırlanmıştır: A (su içinde %0,1 trifloroasetik asit) ve B (asetonitril içinde %0,1 trifloroasetik asit). Gradient mobil faz programı; 3 dk boyunca doğrusal akışla %95A, 10 dk içinde %80 A, 20 dk içinde %60A, 20 dk %20A ve tekrar %95A'ya dönüş olarak belirlenmiştir. Akış hızı 1,0 mL/dak ve enjeksiyon hacmi 20 µL olarak belirlenmiştir (Shanaida ve ark., 2021).

HPLC analizinde RA'in özgülüğü, RA tepe noktasının alıkonma süresinin, RA standart çözeltisinin kromatogramındaki alıkonma süresinin çakışmasıyla ve PDA dedektörde spektrum taramasına dayalı pik saflığı kontrolü yapılarak doğrulanmıştır. Sistem uygunluğu için altı tekrarlı çalışılmıştır. Regresyon denklemi, RA referans standardının on konsantrasyonu için kalibrasyon eğrisinden hesaplanmıştır. Tespit limiti (LOD) ve tayin limiti (LOQ), sırasıyla 3 ve 10 sinyal gürültü oranı için hesaplanmıştır. Elde edilen ekstraktlarda RA içeriğinin analizi için geliştirilen HPLC yöntemi, tespit limiti (LOD), tayin limiti (LOQ), kesinlik, doğruluk gibi parametrelere göre doğrulanmıştır (Çizelge 4).

DeneySEL Tasarım ve İstatistiksel Analiz

Yapılan çalışmada EtOH/H₂O çözücü sistemi ile fesleğen (*Ocimum basilicum* L.) bitkisinden polifenollerin ekstraksiyonu için deneysel tasarım yöntemlerinden sistemi etkileyen en önemli değişkenler ve birbirleriyle etkileşimleri belirlenmiştir. EtOH/H₂O çözücü ekstraksiyonunda elde edilen fesleğen ekstraktlarından polifenollerin deneysel tasarım çalışmaları yanıt yüzeyi metodolojisi, modelleme çalışmaları en küçük kareler (LS) yaklaşımı kullanılarak ve optimizasyon çalışmaları İstenebilirlik (Desirability) fonksiyonu sonrası Pareto seti oluşturularak gerçekleştirilmiştir. 21 deneysel çalışmadan oluşan dört faktörlü, dönebilen, beş seviyeli merkezi kompozit dönebilen tasarım (CCRD- ortogonal tasarım) kullanılmıştır. RSM, Stat-Ease Design Expert 12.0.0 yazılımı (Stat-Ease Inc., Minneapolis, ABD) kullanılarak yapılmıştır. Bağımsız değişkenlerin kodlanan düzeyleri Çizelge 1'de verilmiştir. EtOH/H₂O ekstraksiyonu için incelenen dört bağımsız

değişken, EtOH konsantrasyonu (X_1 , % (v/v), %7,5 ile 77,5 arasında), sıcaklık (X_2 , °C, 20 ile 60 C arasında), süre (X_3 , dk, 30 ile 150 dk arasında), çözücü/katı oranı (X_4 , mL/g, 2,5 ile 32,5 mL/g arasında) olarak belirlenmiştir. Her faktör beş düzeyde kodlanmıştır (Çizelge 1). Karşılık gelen yanıt değişkenleri, Toplam fenolik madde miktarı; mg GAE/g (Y_1), Toplam antioksidan aktivite; mgTroloks/g (Y_2) ve Rosmarinik asit miktarı; mg/g (Y_3) Çizelge 2 de gösterilmektedir. Deneysel veri seti, yanıtların davranışını görmek için tekrarlanan yanıt ölçümleriyle oluşturulmuştur.

İstatistiksel analizler Minitab 17 yazılımı (PC için sürüm 17, Minitab Inc., İngiltere) kullanılarak yapılmıştır. Tüm analizler üç tekrarlı yapılmış ve deneysel sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak ifade edilmiştir. Her yanıt faktörü için tasarım matrisi ve her terimin uygunluğu, varyans analizi ile kontrol edilmiştir. Modelin istatistiksel anlamlılığını değerlendirmek için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulanmıştır (Çizelge 3). Bu yöntemde, her bir faktörün yanıt değişkenleri üzerindeki doğrusal, ikinci dereceden ve içsel etkileşim etkilerinin istatistiksel olarak anlamlılığı, %95 güven düzeyinde Fischer F testi uygulanarak belirlenmiştir. İstatistiksel anlamlılık $P \leq 0,05$ olarak belirlenmiştir. Korelasyon katsayısı analizi Minitab 17 yazılımı kullanılarak yapılmış bireysel lineer ve etkileşim terimlerinin regresyon katsayıları belirlenmiştir. Katsayılar, bağımsız değişkenlerin yanıt değişkenleri üzerindeki etkisini göstermek için RSM kullanımı ile yüzey grafikleri oluşturmakta kullanılmıştır.

Geriye doğru eliminasyon regresyonu (Backward Elimination), istatistiksel olarak anlamlı olmayan faktörleri tam modelden aşamalı bir şekilde çıkararak iyileştirmek için kullanılmıştır. P değeri $\leq 0,05$ olan modeller ve faktörler anlamlı kabul edilmiştir.

Modelleme

Veri setinin modelleme aşamasında en küçük kareler (LS) yöntemi kullanılmıştır. CCD tasarımına karşılık gelen ikinci dereceden bir polinom regresyon modeli aracılığıyla tahmin edilen doğrusal regresyon modeli, aşağıdaki Denklem (2)'de gösterildiği gibi kullanılmıştır. Bilinmeyen model parametreleri, LS yaklaşımına göre tahmin edilmiştir.

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^4 \beta_i x_i + \sum_{i,j=1}^4 \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{i=1}^4 \beta_{ii} x_i^2 + \varepsilon \quad (2)$$

Burada; y yanıt değişkenlerini temsil eder, β_0 bir sabittir, β_i , β_{ii} , β_{ij} sırasıyla doğrusal, ikinci dereceden ve etkileşimli katsayılardır. x_i ve x_j bağımsız değişkenlerdir.

Optimizasyon ve Doğrulama

Optimizasyon çalışmasında sistemi karakterize eden tüm yanıtlar bir arada ele alınmış ve çok amaçlı pareto bölgeleri yardımıyla çok yanıtli optimizasyon çözülmüştür. Pareto optimal bölge tahminleri TFM(mgGAE/g), TAA(mgTroloks/g) ve RA(mg/g) bağımlı yanıt değişkenlerinin optimum ekstraksiyon koşullarını bulmak için istenebilirlik fonksiyonu (Derringer ve Suich, 1980) kullanılmıştır.

Optimizasyon çalışması için Y_1 'i (TFM(mgGAE/g)) ve Y_3 'ü (Rosmarinik Asit(RA, mg/g)) maksimize eden ve

Y_2 'yi (TAA(mgTroloks/g)) minimize eden bir metodoloji kullanılmıştır. Bağımsız değişkenler [X_1, X_2, X_3, X_4] çalışma aralığı içinde tutulmuştur. Doğrulama çalışmaları için, optimum koşulları temsil eden çözüm noktasında deneyler yapılmış ve sonuçlar modellerden tahmin edilen değerlerle karşılaştırılmıştır (Çizelge5).

Bulgular ve Tartışma

Modellerin Uygunluğu

CCRD metodolojisi kullanılarak 21 deneysel çalışma yapılmış, deneysel verilere çoklu regresyon analizi uygulanmış ve elde edilen regresyon katsayıları kullanılarak yüzey merkezli tasarım için ikinci dereceden bir model denklemi oluşturulmuştur. Bağımsız proses değişkenlerinin değerleri (X_1, X_2, X_3, X_4) ve yanıt değerleri (Y_1, Y_2, Y_3) Çizelge 2'de gösterilmiştir. *Ocimum basilicum* ekstraktlarının yanıt değişkeni deneysel değerleri, ikinci dereceden polinom denklemlerine uygun olarak regresyon analizi ile belirlenmiştir.

EtOH/H₂O çözücü ekstraksiyonu ile elde edilen TFM, TAA ve RA miktarı için ANOVA sonuçları Çizelge 3'de görülmektedir. Üç model sırasıyla, <0,0001; 0,0095 ve <0,0001'lik düşük P değerleri ve 14,72; 7,76 ve 14,24 olan yüksek F değerleriyle oldukça anlamlı bulunmuştur ve bu değerler modellerin TFM, TAA ve RA miktar tahmini için güvenilirliğini doğrulamıştır. Ayrıca korelasyon katsayısı (R^2) değerleri sırasıyla 0,9233, 0,9476 ve 0,9210 olup 1'e çok yakın bulunmuştur (Çizelge 3). Modeller, yanıtlara anlamsız bir uyum eksikliği göstermiştir. EtOH/H₂O çözücü ekstraksiyonu için ikinci dereceden polinom modelleri 3, 4 ve 5 numaralı denklemlerle ifade edilmiştir.

Yanıt Yüzeylerinin Analizi

Proses parametrelerinin (çözücü konsantrasyonu, sıcaklık, süre ve çözücü/katı oranı) EtOH/H₂O çözücü ekstraksiyon performansı üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Model denklemlerinin yanıt yüzeylerinin izohips eğrilerini ve yüzey grafiklerini bulmak ve bağımsız değişkenler için optimum değerleri belirlemek için yanıt yüzey metodolojisine uygun deneysel tasarım yapılmıştır. EtOH/H₂O çözücü ekstraksiyonundan elde edilen ekstraktların TFM, TAA ve RA miktarı üzerindeki bağımsız değişkenlerin etkisini ifade etmek için oluşturulan üç boyutlu (3B) yüzey yanıt grafikleri Şekil 2'de verilmiştir.

Çözücü (EtOH/H₂O) konsantrasyonu

O. basilicum L. bitkisinden polifenolik bileşiklerin ekstraksiyonunda yaygın olarak kullanılan çözücüler MeOH/H₂O ve EtOH/H₂O hidroalkolik çözücü sistemleridir. MeOH genellikle polifenollerin ekstraksiyonunda daha yaygın olarak kullanılsada, (Kapasakalidis ve ark., 2006) ana dezavantajı eczacılık ve gıda endüstrisinde insan tüketimi için toksik kabul edilmesidir (Japón-Luján ve ark., 2006). Bu nedenle GRAS kabul edilen EtOH çözücüsünün ekstraksiyon proseslerinde kullanımı oldukça önem kazanmıştır.

$$Y_1(\text{TFM (mg/g)}) = +157,88 + 34,83 X_1 - 3,41 X_2 + 9,76 X_3 - 13,27 X_4 - 23,59 X_1 X_2 - 9,32 X_1^2 - 6,90 X_2^2 - 9,15 X_3^2 - 6,37 X_4^2 \quad (3)$$

$$Y_2(\text{TAA (IC}_{50} \text{ mg/mL)}) = +5,28 + 3,50 X_1 + 0,8275 X_2 - 0,7550 X_3 + 0,3075 X_4 + 1,82 X_1 X_2 - 0,9697 X_1^2 - 0,9560 X_2^2 - 1,01 X_3^2 \quad (4)$$

$$Y_3(\text{RA (mg/g)}) = +8,13 + 2,57 X_1 + 0,08 X_2 + 0,925 X_3 - 1,39 X_4 - 1,96 X_1 X_2 - 1,22 X_3 X_4 - 0,7386 X_1^2 - 0,8473 X_2^2 - 0,5911 X_3^2 \quad (5)$$

Çizelge 2. EtOH/H₂O çözücü sistemi için deneysel tasarım ve bağımlı değişkenlerin deneysel sonuçları

Table 2. Experimental design and observed responses for EtOH/H₂O solvent system

DN	Bağımsız Değişkenler				Bağımlı Değişkenler		
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	Y ₁	Y ₂	Y ₃
	EtOH Kons.	Sıcaklık	Ekstraksiyon Süresi	Çözücü/Katı oranı	TFM	TAA	Rosmarinik asit
	(%v/v)	(°C)	Dk	(mL/g)	mg GAE/g	IC ₅₀ (mgTroloks/mL)	mg/g
1	42,5	40	90	17,5	157,85±1,24	4,25±0,76	8,71±0,56
2	42,5	40	90	17,5	157,89±1,18	4,05±0,44	8,72±0,65
3	42,5	40	90	17,5	157,86±1,99	4,56±0,65	8,74±0,72
4	25	30	120	10	98,65±1,07	11,56±1,02	3,67±0,11
5	25	30	60	10	65,98±0,67	13,78±1,09	1,35±0,78
6	77,5	40	90	17,5	198,45±2,67	1,23±0,07	10,23±1,01
7	42,5	60	90	17,5	138,25±1,10	8,76±0,67	6,22±0,45
8	60	30	60	25	165,98±0,87	7,45±0,98	9,34±0,78
9	42,5	40	90	17,5	157,93±1,19	8,56±1,08	8,74±0,45
10	60	50	60	10	125,65±0,87	5,99±0,65	4,98±0,23
11	60	50	120	10	145,87±1,76	7,47±0,98	9,87±0,65
12	7,5	40	90	17,5	56,34±0,98	15,24±1,87	0,98±0,01
13	42,5	20	90	17,5	135,87±2,03	5,45±0,45	4,12±0,08
14	42,5	40	90	2,5	165,74±0,99	7,89±0,76	9,89±0,84
15	25	50	60	25	100,25±1,14	10,22±1,45	4,15±0,11
16	42,5	40	90	32,5	112,65±1,76	9,12±0,76	4,32±0,17
17	42,5	40	150	17,5	157,34±2,11	7,45±0,34	8,74±0,56
18	25	50	120	25	75,98±0,67	11,15±1,29	1,67±0,98
19	60	30	120	25	176,46±2,23	2,98±0,28	9,23±1,01
20	42,5	40	30	17,5	98,79±1,09	11,35±1,32	3,65±0,23
21	42,5	40	90	17,5	157,87±1,14	4,98±0,56	8,67±0,35

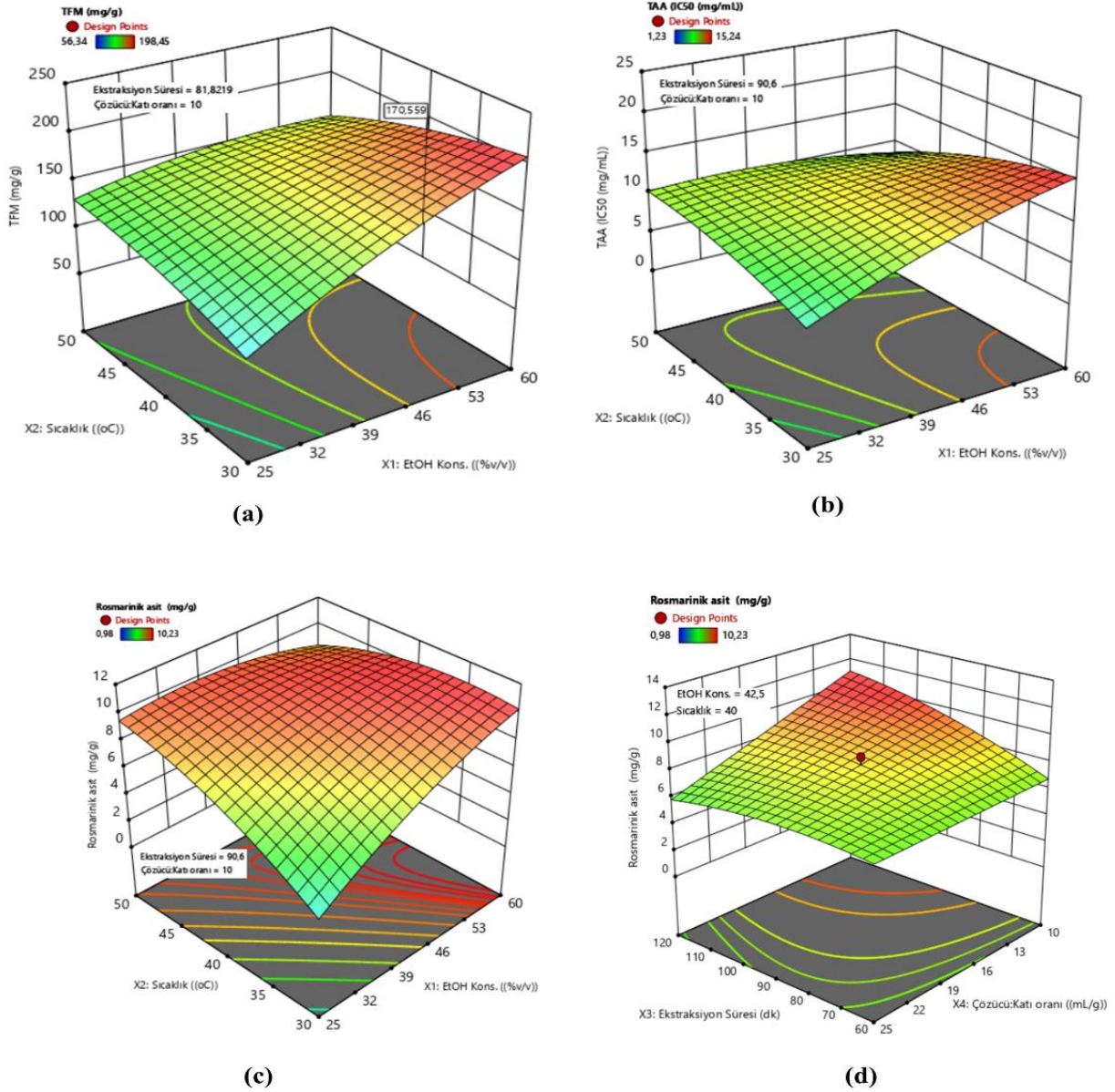
DN: Deneysel no, Analitik sonuçlar, üç tekrarı ortalamasıdır (ortalama ± standart sapma)

Çizelge 3. EtOH/H₂O çözücü sisteminde, CCRD (dönebilen merkezi kompozit tasarım) yanıt yüzey modeli kullanılarak TFM, TAA ve Rosmarinik Asit miktarı için ANOVA sonuçları (Geri Eliminasyon Regresyonu) ve ikinci dereceden polinom denklemleri

Table 3. ANOVA results and second order polynomial equation for TFM, TAA, Rosmarinic acid amount using quadratic CCRD response surface model for MeOH/H₂O solvent system (Backward Elimination Regression)

	Y ₁ = TFM (mgGAE/g) ¹				Y ₂ = TAA (IC ₅₀ mgTroloks/mL) ²				Y ₃ = Rosmarinik asit (mg/g) ³			
	KT	SD	F	P	KT	SD	F	P	KT	SD	F	P
M	27443,16	9	14,72	< 0,0001	278,43	9	7,76	0,0095	181,09	9	14,24	< 0,0001
X ₁	19412,85	1	93,73	< 0,0001	98,14	1	38,27	0,0008	105,47	1	74,67	< 0,0001
X ₂	186,05	1	0,8983	0,3636	0,4418	1	0,1723	0,6925	0,1024	1	0,0725	0,7927
X ₃	1524,90	1	7,36	0,0202	17,62	1	6,87	0,0395	13,69	1	9,69	0,0099
X ₄	1409,27	1	6,80	0,0243	15,57	1	6,07	0,0488	15,51	1	10,98	0,0069
X ₁ X ₂	2225,48	1	10,74	0,0074	31,84	1	12,42	0,0125	15,33	1	10,85	0,0072
X ₃ X ₄	-	-	-	-	-	-	-	-	12,00	1	8,50	0,0141
X ₁ ²	2179,27	1	10,52	0,0078	23,60	1	9,20	0,0230	14,36	1	10,16	0,0086
X ₂ ²	1195,62	1	5,77	0,0351	22,94	1	8,95	0,0243	18,90	1	13,38	0,0038
X ₃ ²	2101,63	1	10,15	0,0087	25,72	1	10,03	0,0194	9,20	1	6,51	0,0269
X ₄ ²	1017,85	1	4,91	0,0486	12,96	-	-	-	-	-	-	-
AK	2278,30	11	-	-	15,38	11	-	-	15,54	11	-	-
UE	2278,30	7	0,325	0,4651	15,23	7	0,9151	0,7814	15,53	7	0,231	0,356
H	0,0040	4	-	-	0,1537	4	-	-	0,0033	4	-	-
DT	29721,46	20	-	-	293,82	20	-	-	196,62	20	-	-
R ²	-	-	0,9233	-	-	-	0,9476	-	-	-	0,9210	-
R ² D	-	-	0,8606	-	-	-	0,8255	-	-	-	0,8563	-
ÖMT	X ₁ ,X ₃ ,X ₄ ,X ₁ X ₂ ,X ₁ ² ,X ₂ ² ,X ₃ ² ,X ₄ ²	-	-	-	X ₁ ,X ₃ ,X ₄ ,X ₁ X ₂ ,X ₁ ² ,X ₂ ² ,X ₃ ²	-	-	-	X ₁ ,X ₃ ,X ₄ ,X ₁ X ₂ ,X ₃ X ₄ ,X ₁ ² ,X ₂ ² ,X ₃ ²	-	-	-
İPD	TFM(mg/g)=+157,88+34,83X ₁ -3,41X ₂ +9,76X ₃ -13,27X ₄ -23,59X ₁ X ₂ -9,32X ₁ ² -6,90X ₂ ² -9,15X ₃ ² -6,37X ₄ ²	-	-	-	TAA(IC ₅₀ mg/mL)=+5,28+3,50X ₁ +0,8275X ₂ -0,7550X ₃ +0,3075X ₄ -1,82X ₁ X ₂ -0,9697X ₁ ² -0,9560X ₂ ² -1,01X ₃ ²	-	-	-	Rosmarinikasit(mg/g)=+8,13+2,57X ₁ +0,08X ₂ +0,925X ₃ -1,39X ₄ -1,96X ₁ X ₂ -1,22X ₃ X ₄ -0,7386X ₁ ² -0,8473X ₂ ² -0,5911X ₃ ²	-	-	-

¹Geri Eleme Regresyonundan sonra eklenen Hiyerarşik Terimler: X₁X₃; X₁X₄; X₂X₃; X₂X₄; X₃X₄; ²Geri Eleme Regresyonundan sonra eklenen Hiyerarşik Terimler: X₁X₃; X₁X₄; X₂X₃; X₂X₄; X₃X₄; KT: Kareler toplamı, M: Model, SD: Serbestlik derecesi, df, F: F değeri, P: değeri (P)>F, X₁: X₁-EtOH Kons., X₂: X₂-Sıcaklık, X₃: X₃-Ekstr.Süresi, X₄: X₄-Çözücü/Katı oranı, AK: Arta Kalan, UE: Uyum Eksikliği, H: Hata, DT: Düzeltilmiş toplam, R²D: R²Düzeltilmiş, ÖMT: Önemli Model Terimleri, İPD: İkinci dereceden polinom denklemi



Şekil 2. EtOH/H₂O çözücü ekstraksiyonunda *Ocimum basilicum* L. ekstraktlarının TFM, TAA ve Rosmarinik Asit değişkenlerine ait yanıt yüzey grafikleri (a) TFM için EtOH konsantrasyonu ve sıcaklık (b) TAA için EtOH konsantrasyonu ve sıcaklık (c) Rosmarinik Asit için EtOH konsantrasyonu ve sıcaklık (d) Rosmarinik Asit için ekstraksiyon süresi ve çözücü katı oranı, arasındaki ilişki.

Figure 2. Response surface graphs of TPC, TAA and Rosmarinic Acid variables of *Ocimum basilicum* L. extracts in EtOH/H₂O solvent extraction as affected by (a) EtOH concentration and temperature for TPC (b) EtOH concentration and temperature for TAA (c) EtOH concentration for Rosmarinic Acid and temperature (d) extraction time and solvent solids ratio for Rosmarinic Acid.

O. basilicum L. bitkisinden polifenolik maddelerin ekstraksiyonunda literatürde çoğunlukla MeOH çözücüsü kullanılmıştır. Castronuovo ve ark., (2019) tarafından yapılan çalışmada fesleğende (*O. basilicum* L.) %80 MeOH/H₂O kullanılarak 200 rpm de oda sıcaklığında 2 saat süresince gerçekleştirilen maserasyon ile farklı gölgeleme stratejilerinin bitkinin antioksidan aktivitesi ve fenolik profili üzerindeki etkisi araştırılmış ve örneklerin TFM değerlerinin 54,1±3,5 ile 48,8±2,0 mg GAE/g arasında değiştiği, en yüksek antioksidan aktivite değerinin IC₅₀ üzerinden 175,4±14,7 µg/mL olarak gölgeleme yapılmayan örnekte saptandığı görülmüştür.

En yüksek hava sıcaklığına ve en yüksek toplam ışımaya maruz kalan bitkilerin, en yüksek antioksidan aktiviteyi ve fenolik bileşik içeriğini gösterdiği belirtilmiştir. Yine, Kwee ve Niemeyer (2011) tarafından 15 farklı fesleğen çeşidinin fenolik kompozisyonu ve antioksidan özellikleri üzerine fesleğen çeşidinin etkilerinin incelendiği çalışmada, 0,10-0,15 g numunelerin kurutulduktan sonra oda sıcaklığında 15 saat çalkalanarak 1,0 mL %80 MeOH içinde ekstrakte edilmesi ayrıca düşük fenolik seviyelere sahip bazı çeşitlerin aynı protokol kullanılarak 0,5 mL %80 MeOH içinde tekrar ekstraksiyonu sonucunda örneklerin TFM değerleri 3,47 – 17,58 mg GAE/g aralığında saptanmıştır.

Çizelge 4. Rosmarinik asitin HPLC analizinde doğrusallık aralığı, regresyon denklemi, tespit limiti, tayin limiti ve kesinlik parametreleri

Table 4. Linearity range, regression equation, limit of detection, limit of quantification, and precision parameters in HPLC analysis of rosmarinic acid

Özellikler	Rosmarinik Asit	
Alıkonma zamanı (t _R)	36,50	
Doğrusallık aralığı ^a (µg/mL)	1-100	
Regresyon denklemi	Y=2,987 -12,56	
R ²	0,9989	
Tespit limiti ^b (LOD) (µg/mL)	0,008	
Tayin limiti ^b (LOQ) (µg/mL)	0,025	
RSD ^c (%)	Gün içi	0,45
	Günler arası	0,30

^aDoğrusallık aralığı için on kalibrasyon noktasında çalışılmıştır (n=10),

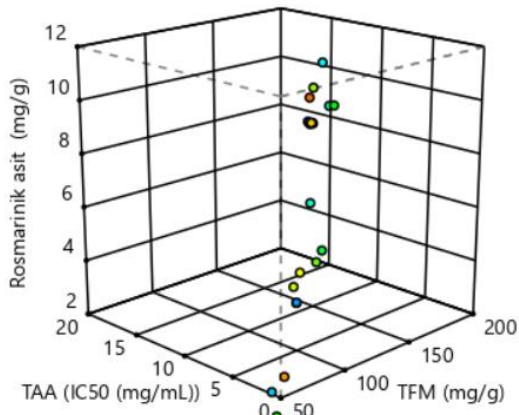
^bÜç tekrarlı çalışma yapılmıştır (n=3), ^cAltı tekrarlı çalışma yapılmıştır (n=6)

Çizelge 5. TFM, TAA ve Rosmarinik Asit (RA) için gözlemlenen (deneysel) ve modellerden tahmin edilen yanıt değerleri ve İstenebilirlik (Desirability) fonksiyonu ile en iyi uzlaşık çözüm.

Table 5. Best compromise solution with Desirability and observed (experimental), and predicted response values from models for TPC, TAA, and Rosmarinic Acid (RA).

Ekstraksiyon yöntemi		EtOH/H ₂ O
Optimizasyon Metodu	ID	0,753
Optimum noktada bağımsız değişkenlerin gerçek değerleri	X ₁	47,7
	X ₂	30,0
	X ₃	77,6
	X ₄	10
Gözlemlenen (deneysel) yanıt değerleri	TFM	171,46±1,87
	TAA	4,76±0,32
	RA	8,93±0,65
Tahmin edilen (modellerden hesaplanan) yanıt değerleri	TFM	172,26
	TAA	4,13
	RA	8,89

ID: İstenebilirlik (Desirability)



Şekil 3. Üç bağımlı değişken: TFM, TAA ve Rosmarinik Asit'in üç boyutlu (3D) ilişki grafiği (R²=0.975, P<0,01)

Figure 3. 3D (Three dimensional) relationship graph for three dependent variables: TPC, TAA and, RA (R²=0.975, P<0,01)

Rosmarinik asit seviyeleri ise çalışılan çeşitlerde 0,06 ile 6,09 mg/g aralığında saptanmış olup, DPPH antioksidan aktivite değerleri ise 3,36±0,50 ile 16,76±1,50 mmol/100 g dw arasında bulunmuştur. Ertürk ve ark. (2017), 3 g *Ocimum bacilicum* örneğini 50 mL %100 MeOH içinde çalkalayıcıda oda sıcaklığında 24 saat boyunca karıştırarak ekstrakte etmiş ve TFM değerini 731,22±6,250 mg GAE/100 g saptamıştır. Do ve ark. (2020) tarafından *Ocimum basilicum* yapraklarından fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu için farklı çözücüler denendikten sonra MeOH kullanılarak RSM metodu ile ekstraksiyon optimizasyonu çalışılmıştır. Literatürde *O. bacilicum* bitkisinden polifenollerin ekstraksiyonu için çok çalışma yapılmamıştır, yapılan çalışmalar MeOH çözücüsü üzerine odaklanmıştır ve optimum koşulları belirlenmiş Do ve ark. (2020) çalışması dışında bir çalışma bulunmamıştır. Bu nedenle çalışmamızda daha az toksik etkisi olduğu bilinen ve GRAS kabul edilen EtOH çözücüsü kullanılarak optimizasyon çalışmasının yapılması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, çalışmamız bilginimiz dahilinde literatürde ilk çalışma olacaktır.

Yaptığımız çalışmada EtOH/H₂O çözücü karışımı %7,5-77,5 arasında farklı konsantrasyonlarda kullanılmıştır. EtOH/H₂O çözücü sistemi için, çözücü konsantrasyonundaki değişiklik TFM (P<0,0001), TAA (P=0,0008) ve RA (P<0,0001) üzerinde önemli ölçüde etkili bulunmuştur (Çizelge 3). ANOVA sonuçlarından EtOH konsantrasyonu ile ekstraksiyon süresi arasında TFM, TAA ve RA yanıt değişkenleri için önemli bir etkileşim olduğu söylenemez. Aynı şekilde EtOH konsantrasyonu ile çözücü/katı oranı arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Her iki ilişki matrisi de geri eliminasyon regresyonu ile model denklemlerinden çıkarılmıştır (Çizelge 3). EtOH/H₂O çözücü sistemi için, çözücü konsantrasyonu ile sıcaklık arasında üç yanıt değişkeni içinde anlamlı bir ilişki olduğu gözlemlenmiştir (TFM P=0,0074; TAA P=0,0125 ve RA için P=0,0072).

Şekil 2(a), 2(b) ve 2(c), diğer bağımsız değişkenleri sabit seviyelerinde tutarken EtOH konsantrasyonu ve sıcaklığın TFM, TAA ve RA üzerindeki birleşik etkisini göstermektedir. EtOH çözücü konsantrasyonu ve sıcaklık arasındaki ilişki yanıt yüzey grafikleri ile değerlendirildiğinde, Şekil 2(a) grafiğinde çözücü konsantrasyonunun artan değerlerinde TFM'nin maksimize olduğu ancak sıcaklık değişiminden etkilenmediği görülmüştür. Benzer durum TAA içinde gözlemlenmiştir (Şekil 2b). TAA için minimizasyon amacı olduğundan EtOH konsantrasyonunun düşük değerlerinde optimum değere ulaşacağı görülmektedir. RA miktarına EtOH konsantrasyonu ile sıcaklık ilişkisinin etkisi incelendiğinde, yanıt yüzey grafiğinin bir maksimum tepe noktasına sahip olduğu görülmüş ve çözücü konsantrasyonunun ve sıcaklığın artan değerlerinde yanıt değişkeni değerinin arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 2c). İstenebilirlik yaklaşımı ile yapılan optimizasyon çalışması sonrasında elde edilen optimum ekstraksiyon koşulları; EtOH konsantrasyonu %47,7, sıcaklık 30,0°C, süre 77,6 dk ve çözücü/katı oranı 10 mL/g'dır.

Çözücü olarak MeOH kullanan Do ve ark. (2020)'nın sıcaklık ile ilgili elde ettiği sonuçlar çalışmamızla uyumlu olmakla beraber MeOH, EtOH'a göre farklı bir profil izlemiş ve verimli bir ekstraksiyon için yüksek MeOH konsantrasyonuna ihtiyaç duyulmuştur (Do ve ark., 2020).

Bu çalışma ile düşük EtOH konsantrasyonunda bir ekstraksiyon yöntemi önerilmiştir. Bu durum EtOH'ın sıcaklık değişimlerinde MeOH'dan daha uygun ve dengeli bir çözücü olduğu ve aynı zamanda bitki matrisini koruyucu etkisinin olduğu şeklinde açıklanabilir. Aynı zamanda MeOH/H₂O ve EtOH/H₂O sulu alkol çözeltileri sıra dışı özellikler sergilerler ve sulu çözeltilerinde alkolün kısmi molar hacmi düşük olduğunda sonuçlar teorik olarak beklenenden daha fazla farklılaşmaktadır (Moucka ve Nezbeda, 2011). Alkol moleküllerinin miktarı daha fazla olduğunda, alkil grubunun şekline ve alkol konsantrasyonuna bağlı olarak çeşitli yapılar da ortaya çıkmaktadır (Chodzinska ve ark., 2012).

Ekstraksiyon Sıcaklığı

Yapılan literatür çalışmalarında farklı çözücü maddeler ile ekstraksiyonda sıcaklığın artmasının ekstrakte edilen TFM miktarında artışa sebep olduğu görülmüştür (Do ve ark., 2020). Bununla birlikte EtOH/H₂O karışımlarında yapılan bir ekstraksiyon çalışmasında RA'in en verimli ekstraksiyonu için düşük sıcaklıklar önerilmektedir (Pagano ve ark., 2018). Fesleğenin soğuğa veya sıcağa maruz kalmasından sonra kısa sürede fenolik madde miktarında, antioksidan enzim yapısında meydana gelen değişimlerin incelendiği bir çalışmada fesleğen bitkisinde sıcaklık değişimleri antioksidan enzim yapısında ve fenolik madde miktarında değişikliklere sebep olmaktadır (Jakovljević ve ark., 2021). Fesleğen toplam ekstraktlarının süperkritik CO₂ ekstraksiyonu üzerindeki basınç ve sıcaklığın etkilerinin incelendiği bir diğer çalışmada da benzer şekilde ekstraksiyonun, sıcaklık arttıkça arttığı belirlenmiştir (Zeković ve ark., 2014). Her ne kadar fenolik maddelerin ekstraksiyonunda yüksek sıcaklıklar ile çalışmak daha iyi bir ekstraksiyona sebep olsa da fenolik maddelerin yüksek sıcaklıklardaki kinetik degradasyonu ve dolayısı ile antioksidan aktivitelerinin de yüksek sıcaklık derecelerinden etkileneceği de optimum sıcaklık belirlenirken göz önünde bulundurulması gereken faktörlerdendir (Zorić ve ark., 2014).

Yapılan çalışmada fesleğen bitkisinden fenoliklerin EtOH/H₂O ekstraksiyonu için 20 ile 60°C arasındaki sıcaklıklar kullanılmıştır. EtOH/H₂O solvent ekstraksiyonu için ekstraksiyon sıcaklığının etkisi TFM (mgGAE/g) (P=0,3636), TAA (IC₅₀ mgTroluks/mL) (P=0,6925), ve RA (mg/g) (P=0,7927) gibi tüm yanıt değişkenleri için anlamlı bir faktör olmadığı görülmüştür (Çizelge 3)'de elde edilen bu sonuç MeOH kullanılarak sıcaklığa karşı yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlarla uyum göstermemektedir (Do ve ark., 2020). Bununla birlikte, sıcaklığın içsel etkileşimli katsayısı TFM (P=0,0351), TAA (P=0,0243) ve RA (P=0,0038) için anlamlıdır. Bu çalışmada optimum ekstraksiyon sıcaklığı 30 °C olarak saptanmıştır. Genel olarak ekstraksiyon proseslerinde bu değer oldukça düşük bir sıcaklığa işaret etmektedir ve bulgularımıza benzer bir çalışmada %80 EtOH konsantrasyonunda, 25°C sıcaklık ekstraksiyon koşulu olarak kullanılmıştır (Majdi ve ark., 2020).

Ekstraksiyon Süresi

Ekstraksiyon süresi, polifenollerin bitkilerden ekstraksiyon verimini etkileyen önemli bir parametredir. Yapılan literatür çalışmalarında belirli bir süreye kadar (yaklaşık 3 saat) ekstraksiyon veriminin arttığı buna

rağmen belli bir süre sonunda verimin düşmeye başladığı görülmüştür (Do ve ark., 2020). Benzer şekilde Fesleğen toplam ekstraktlarının süperkritik CO₂ ekstraksiyonu üzerinde ekstraksiyon süresinin incelendiği çalışmada hızlı ekstraksiyon periyodunun ekstraksiyonun ilk 2 saatinde olduğu, sonrasında yavaş ekstraksiyon periyodunun başladığı ve elde edilen ekstraksiyon veriminin 2 saat sonrasında düştüğü belirlenmiştir (Zeković ve ark., 2014).

Fesleğen bitkisinden polifenolikler, EtOH/H₂O çözücü ekstraksiyonu ile 30 ila 150 dakika arasında değişen sürelerde ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon süresinin önemli doğrusal etkisi, EtOH/H₂O solvent ekstraksiyonunda TFM (mgGAE/g) (P=0,0202), TAA (IC₅₀ mgTroluks/mL) (P=0,0395), ve RA (mg/g) (P=0,0099) için elde edilmiştir. Ekstraksiyon süresi için EtOH/H₂O solvent ekstraksiyonu istatistiksel olarak anlamlı elde edilmiş olup ikili etkileşim açısından ekstraksiyon süresi ve çözücü/katı oranı sadece RA (P=0,0141) açısından anlamlı bulunmuştur. Bununla beraber ekstraksiyon süresinin içsel etkileşimli katsayısı TFM (P=0,0087), TAA (P=0,0194) ve RA (P=0,0269) için anlamlıdır (Çizelge 3). Bu çalışmada optimum ekstraksiyon süresi 77,6 dk olarak literatürle uyumlu olarak saptanmıştır.

Çözücü/Katı Oranı

Çözücü/katı oranı arttıkça, ekstraksiyon veriminin genellikle arttığı görülmüştür (Pinelo ve ark. 2005). Bununla beraber çözücü israfı dolayısıyla yüksek ekstraksiyon maliyeti de hesaba katılmalıdır (Dai and Mumper, 2010). Çalışmamızda EtOH/H₂O solvent ekstraksiyonunda 2,5 ile 32,5 ml/g aralığında değişen çözücü/katı oranı kullanılmış ve çözücü/katı oranının TFM (P=0,0243), TAA (0,0488) ve RA (P=0,0069) için anlamlı doğrusal etkisi bulunmuştur.

İkili etkileşimler açısından çözücü/katı oranı ile ekstraksiyon süresi arasında TFM ve TAA yanıt değişkenlerinin aksine RA (P=0,0141) yanıt değişkeni için önemli bir etkileşim olduğu saptanmıştır (Çizelge 3). Şekil 2(d), RA için çözücü/katı oranı ve ekstraksiyon süresi arasındaki etkileşim etkisini göstermektedir. Yüzey grafiği incelendiğinde çözücü/katı oranının azalan, sürenin artan değerlerinde RA değerinin arttığı görülmektedir. Bununla birlikte, çözücü/katı oranının içsel etkileşimli katsayısı sadece TFM (P=0,0486) için anlamlıdır. Bu çalışmada optimum çözücü/katı oranı 10 mL/g olarak saptanmıştır.

Optimizasyon ve Doğrulama

EtOH/H₂O çözücü ekstraksiyonunda tepki değişkenleri istenebilirlik fonksiyonu kullanılarak optimize edilmiş ve 0,753 istenebilirlik değeri saptanmıştır. Bu istenebilirlikte, ekstraksiyonun optimum koşulları; %47,7 EtOH konsantrasyonu, 30,0°C sıcaklık, 77,6 dk ekstraksiyon süresi ve 10 mL/g çözücü/katı oranı bulunmuştur. Optimum koşullar altında elde edilen deneysel sonuçlar TFM, TAA ve RA için sırasıyla 171,46±1,87 mg GAE/g, 4,76±0,32 mg Troluks/mL ve 8,93±0,65 mg/g'dir. Matematiksel modelden tahmin edilen sonuçlar ise sırasıyla (172,26 mg GAE/g), (4,13 mg Troluks/mL) ve (8,89 mg/g) olarak bulunmuştur. EtOH/H₂O çözücü ekstraksiyonu için TFM, TAA ve RA için gözlemlenen ve tahmin edilen yanıt değerleri karşılaştırıldığında, elde edilen sonuçlar, tahmin edilen değer, gözlenen değer aralığının alt veya üst sınırına yakın olduğunu göstermiştir (Çizelge 5).

Bu çalışmada, fesleğen yapraklarından elde edilen EtOH/H₂O ekstraktlarında TFM, TAA ile RA arasındaki yüksek korelasyonun ($R^2=0,975$) istatistiksel olarak anlamlı ($P<0,01$) ve pozitif bir korelasyon olduğu bulunmuştur (Şekil 3). Çoğunlukla TFM ve TAA arasındaki yüksek korelasyonu bildiren çalışmalar olmakla birlikte (Fu ve ark., 2011; Lagha-Benamrouchea ve Madania, 2013), RA ile bu üç cevap değişkeni arasında ilişki matrisi kuran bir çalışma bulunmamaktadır.

Sonuç

Bu çalışmada hem beslenme hem de geleneksel tıp açısından önemli olan fesleğen (*Ocimum basilicum* L.)'den, polifenollerin klasik yeşil çözücü ekstraksiyonu için kemometrik yaklaşımla optimum koşulları belirlenmiş bir yöntem geliştirilerek önerilmiştir. Fesleğen bitkisinden rosmarinik asit ve antioksidan özellikli bileşenlerin ekstraksiyonunda, dört faktörün üç yanıt değişkeni üzerindeki etkilerini araştırmak için yanıt yüzey yöntemi (CCD tasarımı) kullanılmış ve optimum noktalar istenebilirlik fonksiyonu kullanılarak bulunmuştur.

Literatürde çeşitli bitkilerden polifenollerin ekstraksiyonunda olumlu sonuçları saptanan EtOH/H₂O çözücü ekstraksiyon uygulamalarının, fesleğen bitkisinde yapılan çalışmalarda yaygın kullanılmadığının görülmesi sonucunda bu çalışmada yeşil çözücü olan EtOH/H₂O çözücü karışımı kullanılması ile fenolik bileşiklerin ekstraksiyonunun optimum koşulları belirlenmiştir. Bu çalışmanın, bitkiden ekstrakte edilen fenolik bileşiklerin miktar ve kalitesini önemli oranda etkileyen çözücü tipinin uygunluğunu ayrıca optimize edilmiş ekstraksiyon koşullarının saptanması ile yüksek antioksidan kaynağı olduğu düşünülen *Ocimum basilicum* bitkisinin endüstriyel uygulamalarda kullanımı için kaynak oluşturulacağı düşünülmektedir.

Kaynaklar

Alagawany M, Abd El-Hack ME, Farag MR, Gopi M, Karthik K, Malik YS, Dhama K. 2017. Rosmarinic acid: Modes of action, medicinal values and health benefits. In *Animal Health Research Reviews* 18(2): 167–176. <https://doi.org/10.1017/S1466252317000081>

Carvalho SD, Schwieterman ML, Abrahan CE, Colquhoun TA, Folta KM. 2016. Light quality dependent changes in morphology, antioxidant capacity, and volatile production in sweet basil (*Ocimum basilicum*). *Frontiers in Plant Science*, 17:1328- <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01328>

Castronuovo D, Russo D, Libonati R, Faraone I, Candido V, Picuno P, Andrade P, Valentao P, Milella L. 2019. Influence of shading treatment on yield, morphological traits and phenolic profile of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *Scientia Horticulturae*, 254: 91–98. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.04.077>

Chodzinska A, Zdziennicka A, Janczuk B. 2012. Volumetric and surface properties of short chain alcohols in aqueous solution–air systems at 293 K. *Journal of Solution Chemistry*, 41: 2226–2245. doi:10.1007/s10953-012-9935-z

del Baño MJ, Lorente J, Castillo J, Benavente-García O, del Río JA, Ortuño A, Quirin KW, Gerard D. 2003. Phenolic diterpenes, flavones, and rosmarinic acid distribution during the development of leaves, flowers, stems, and roots of *Rosmarinus officinalis*. Antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(15): 4247–4253. <https://doi.org/10.1021/jf0300745>

Do TH, Truong HB, Nguyen HC. 2020. Optimization of Extraction of Phenolic Compounds from *Ocimum Basilicum* Leaves and Evaluation of Their Antioxidant Activity. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 54(2): 162–169. <https://doi.org/10.1007/s11094-020-02181-3>

Dudai N, Nitzan N, Gonda I. 2020. *Ocimum basilicum* L. (Basil). In J. Novak and W.-D. Blüthner (Eds.), *Medicinal, Aromatic and Stimulant Plants*. Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-030-38792-1_10

Fu L, Xu BT, Xu XR, Gan RY, Zhang Y, Xia EQ, Li HB. 2011. Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. *Food Chem*, 129: 345–350. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.04.079

Gao LP, Wei HL, Zhao HS, Xiao SY, Zheng RL. 2005. Antiapoptotic and antioxidant effects of rosmarinic acid in astrocytes. *Pharmazie*, 60(1): 62–65.

Jakovljević D, Momčilović J, Bojović B, Stanković M. 2021. The short-term metabolic modulation of basil (*Ocimum basilicum* L. cv. 'genovese') after exposure to cold or heat. *Plants*, 10(3): 590–606. <https://doi.org/10.3390/plants10030590>

Japón-Luján R, Luque-Rodriguez JM, Luque de Castro MD. 2006a. Dynamic ultrasound-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. *Journal of Chromatography A*, 1108: 76–82.

Kapasakalidis PG, Rastall RA, Gordon MH. 2006. Extraction of polyphenols from processed black currant (*Ribes nigrum* L.) residues. *J. Agric. Food Chem*. 54: 4016–4021.

Kintzios S, Makri O, Panagiotopoulos E, Scapeti M. 2003. In vitro rosmarinic acid accumulation in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *Biotechnology Letters*, 25(5): 405–408. <https://doi.org/10.1023/A:1022402515263>

Kwee EM, Niemeyer ED. 2011. Variations in phenolic composition and antioxidant properties among 15 basil (*Ocimum basilicum* L.) cultivars. *Food Chemistry*, 128(4): 1044–1050. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.011>

Kwon DY, Kim YB, Kim JK, Park SU. 2020. Production of rosmarinic acid and correlated gene expression in hairy root cultures of green and purple basil (*Ocimum basilicum* L.). *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 51(1): 35–43. <https://doi.org/10.1080/10826068.2020.1789990>

Lagha-Benamrouchea S, Madania K. 2013. Phenolic contents and antioxidant activity of orange varieties (*Citrus sinensis* L. and *Citrus aurantium* L.) cultivated in Algeria: Peels and leaves. *Ind Crops Products*, 50: 723–730. doi: 10.1016/j.indcrop.2013.07.048

Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. In *Pharmacognosy Reviews* 4 (8): 118–126. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>

Majdi C, Pereira C, Dias MI, Calhelha RC, Alves MJ, Rhourri-Frih B, Charrouf Z, Barros L, Amaral JS, Ferreira ICFR. 2020. Phytochemical Characterization and Bioactive Properties of Cinnamon Basil (*Ocimum basilicum* cv. 'Cinnamon') and Lemon Basil (*Ocimum x citriodorum*). *Antioxidants*, 9: 369. doi:10.3390/antiox9050369

Makri O, Kintzios S. 2008. *Ocimum* sp. (Basil): Botany, cultivation, pharmaceutical properties, and biotechnology. In *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants* 13(3) : 123–150. https://doi.org/10.1300/J044v13n03_10

McCue PP, Shetty K. 2004. Inhibitory effects of rosmarinic acid extracts on porcine pancreatic amylase in vitro. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 13(1): 101–106.

Moučka F, Nezbeda I. 2011 Water–methanol mixtures with non-Lorentz–berthelot combining rules: A feasibility study. *Journal of Molecular Liquids*, 159: 47–51. doi:10.1016/j.molliq.2010.05.005

Pagano I, Sánchez-Camargo A del P, Mendiola JA, Campone L, Cifuentes A, Rastrelli L, Ibañez E. 2018. Selective extraction of high-value phenolic compounds from distillation wastewater of basil (*Ocimum basilicum* L.) by pressurized liquid extraction. *ELECTROPHORESIS*, 39(15): 1884–1891 <https://doi.org/10.1002/elps.201700442>

- Sajjadi SE. 2006. Analysis of the essential oils of two cultivated basil (*Ocimum basilicum* L.) from Iran. *Daru Journal of Faculty of Pharmacy*, 14(3): 128–130.
- Shahidi F. 2004. Functional foods: Their role in health promotion and disease prevention. *Journal of Food Science*, 69(5): R146–R149. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb10727.x>
- Shanaida M, Golembiovskaja O, Jasicka-Misiak I, Oleshchuk O, Beley N, Kernychna I, Wiczorek P P. 2021. Sedative Effect and Standardization Parameters of Herbal Medicinal Product Obtained from the *Ocimum americanum* L. Herb. *European Pharmaceutical Journal*. 1-9. <https://doi.org/10.2478/afpuc-2020-0015>
- Shanaida M, Kernychna I, Shanaida Y. 2017. Chromatographic analysis of organic acids, amino acids, and sugars in *Ocimum Americanum* L. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, 74(2): 729–734.
- Taie HAA, Salama ZAER, Radwan S. 2010. Potential activity of basil plants as a source of antioxidants and anticancer agents as affected by organic and bio-organic fertilization. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 38(1): 119–127. <https://doi.org/10.15835/nbha3813534>
- Teofilović B, Grujić-Letić N, Karadžić M, Kovačević S, Podunavac-Kuzmanović S, Gligorić E, Gadžurić S. 2021. Analysis of functional ingredients and composition of *Ocimum basilicum*. *South African Journal of Botany*, 141: 227–234. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.04.035>
- Uma Devi P, Ganasoundari A, Vrinda B, Srinivasan KK, Unnikrishnan MK. 2000. Radiation protection by the *Ocimum flavonoids orientin and vicenin: Mechanisms of action*. *Radiation Research*, 154(4): 455–460. [https://doi.org/10.1667/0033-7587\(2000\)154\[0455:RPBTOF\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1667/0033-7587(2000)154[0455:RPBTOF]2.0.CO;2)
- Waterhouse AL. 2001. Unit II.1: Polyphenolics: Determination of total phenolics. In *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* 6 (1):1–4. <https://doi.org/10.1002/0471142913>
- Wildman REC. 2019. Nutraceuticals and Functional Foods. In *Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods* 3–22. <https://doi.org/10.1201/9780429195594-1>
- Yu J, Wang L, Walzem RL, Miller EG, Pike LM, Patil BS. 2005. Antioxidant activity of citrus limonoids, flavonoids, and coumarins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6): 2009–2014. <https://doi.org/10.1021/jf0484632>
- Zeković Z, Filip S, Vidović S, Jokić S, Svilović S. 2014. Mathematical modeling of *ocimum basilicum* L. supercritical CO₂ extraction. *Chemical Engineering and Technology*, 37(12): 2123–2128. <https://doi.org/10.1002/ceat.201400322>
- Złotek U, Szymanowska U, Karaś M, Świeca M. 2016. Antioxidative and anti-inflammatory potential of phenolics from purple basil (*Ocimum basilicum* L.) leaves induced by jasmonic, arachidonic and β -aminobutyric acid elicitation. *International Journal of Food Science and Technology*, 51(1): 163–170. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12970>
- Zorić Z, Dragović-Uzelac V, Pedisić S, Kurtanjek Ž, Garofulić I E. 2014. Kinetics of the degradation of anthocyanins, phenolic acids and flavonols during heat treatments of freeze-dried sour cherry *Marasca* paste. *Food Technology and Biotechnology*, 52(1): 101–108.