



# Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi

*Araştırma Makalesi*

## Yüzey Yanıt Metodolojisi ile Biberiye Yapraklarından Rosmarinik Asit Ekstraksiyonunun Optimizasyonu

İbrahim BULDUK<sup>a\*</sup>, Süleyman GÖKCE<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Uşak Üniversitesi Sağlık Yüksek Okulu TR 64200, Uşak, Türkiye

<sup>b</sup>Uşak Üniversitesi Bilimsel Analiz ve Teknolojik Uygulama ve Araştırma Merkezi TR 64200, Uşak, Türkiye

\* Sorumlu yazarın e-posta adresi: İbrahim.bulduk@usak.edu.tr

### ÖZET

Rosmarinik asit, karnozol ve karnosik asit, biberiye (*Rosmarinus officinalis*) 'de bulunan önemli doğal antioksidandır. Rosmarinik asit (RA), Bu bileşiklerin, özellikle de Rosmarinik asitin biyolojik aktivitelerini rapor eden çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Rosmarinik asitin in-vitro çalışmalarda anti-HIV-1, antibakteriyel, antioksidan, anti-kanserojen ve anti-alerjik aktiviteler, antiviral özellikler gibi bazı biyolojik faaliyetleri olduğu bildirilmiştir. İn vivo çalışmalar da Rosmarinik Asit'in antialerjik, antitromboz ve antikanserojenik özellikler sergilediğini göstermiştir. Endüstri pek çok faydalı etkileri nedeniyle doğal gıda koruyucuları, antimikrobiyal ve antioksidanlar ile giderek daha fazla ilgilenmektedir.

Bu çalışmada, biyolojik olarak güçlü bir antioksidan olan rosmarinik asit bileşimi, Biberiye yapraklarından ekstrakte edildi. Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon ve Yüzey Yanıt Metodolojisi Biberiye yapraklarından antioksidanların ekstraksiyon koşullarını optimize etmek için kullanılmıştır. En yüksek Rosmarinik Asit düzeyi (% 6.77) için öngörülen optimum koşullar % 34.37 etanol konsantrasyonu, 37.15 dk ekstraksiyon zamanı ve 73.38°C ekstraksiyon sıcaklığı olarak tespit edilmiştir. Tahmin edilen optimum koşullarda, deneysel değerler tahmin edilen değerlere çok yakındı.

**Anahtar Kelimeler:** Biberiye; Rosmarinik Asit; Ekstraksiyon; Optimizasyon; Yüzey Yanıt Metodolojisi

## Optimization of Rosmarinic Acid Extraction from Rosemary Leaves by Surface Response Methodology

### ABSTRACT

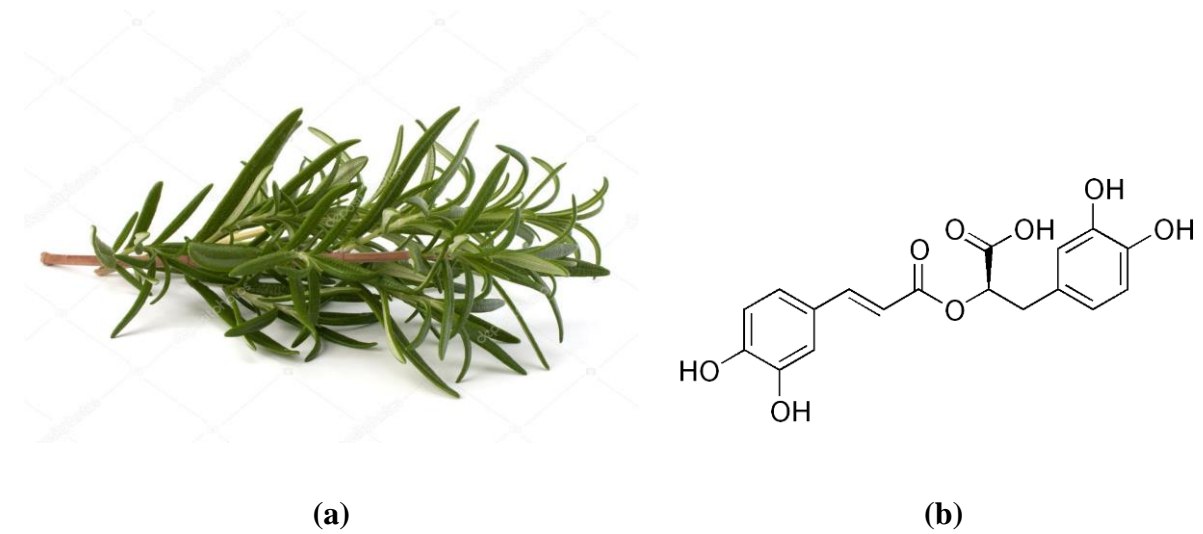
Rosmarinic acid (RA), carnosol and carnosic acid are important natural antioxidants found in rosemary (*Rosmarinus officinalis*). There are number of papers that report the biological activities of this compound, especially RA. RA has been reported to have some biological activities in vitro such as antiviral properties including anti-HIV-1, antibacterial, antioxidant, anti-carcinogenic, and anti-allergic activities. In vivo studies have shown that RA exhibit anti-allergic, anti-thrombotic, and anti-carcinogenic properties as well. Industry is increasingly interested in natural food preservatives, antimicrobial, and antioxidants due to their beneficial effects.

In this work, bioactive a potent antioxidant-rosmarinic acid (RA) compound was extracted from *Rosmarinus officinalis* leaves. Response surface methodology (RSM) has been used to optimize the extraction conditions of antioxidants from Rosemary leaf by using ultrasonic extraction. The predicted optimal conditions for the highest RA level(6.77 %) were found at 34.37 % ethanol, 37.15 min extraction time, and 73.38°C extraction temperature. In the predicted optimal conditions, the experimental values were very close to the predicted values.

**Keywords:** *Rosmarinus officinalis*; Rosmarinic Acid; Extraction; Optimization; Responce Surface Methodology

## I. GİRİŞ

**B**iberiye (*Rosmarinus officinalis*, Lamiaceae) kendine has kokusu ve iğnemsî yaprakları olan çok yıllık bir bitkidir. Akdeniz bölgesine özgüdür ve birçok başka bölgede yetiştirilmektedir. *R. officinalis*'in taze ve kurutulmuş yaprakları, güçlü aromatik kokusu nedeniyle farklı gıda ürünlerinde lezzetlendirici olarak yaygın şekilde kullanılır. Biberiye yapraklarının uçucu yağları, çeşitli kolonya, banyo esansları, saç losyonları, şampuanlar ve dezenfektanların bir bileşeni olarak üretilen kozmetik ürünleri endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Aromaterapi uygulamasının yanısıra biberiye yaprağı ekstraktlarının ana bileşenleri, karnozik asit ve rosmarinik asittir. Rosmarinik asit, antioksidan[1,2], anti-inflamatuar[3], antimutajenik[4], antianjiyojenik[5], anti-apoptotik[6], antifibrotik[7], kemoprotektif[8], nöroprotektif[9], atopik dermatitin azaltılması[10], keratinositlerin fotoproteksiyonu[11] ve Alzheimer hastalığının önlenmesi[12] gibi bir dizi biyolojik aktiviteye sahiptir. Gıdalarda doğal antimikrobiyal ve asidoksidanların kullanılması konusunda giderek artan bir ilgi vardır[13,14]. Biyoaktif bileşikler elde etmek için çevre dostu proseslerin kullanılması sürdürülebilir sebepler yüzünden (yüksek ekonomik maliyetine rağmen) dikkat çekmektedir. Bu tür prosesler aynı zamanda tarımsal katı atıklar ve genellikle güvenli olarak tanınan solvent uygulamalarının kullanımını da içerir[15,16]. İçerisinde yeni teknolojilerin de bulunduğu biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonu ile ilgili araştırmalar giderek artmaktadır. Biberiye yaprakları ve Rosmarinik asitin molekül yapısı Şekil 1 de gösterilmiştir.



Şekil 1. a) Biberiye yaprakları b) Rosmarinik Asitin Molekül Yapısı

Geleneksel yöntemlerde, ısıl rifleks ekstraksiyonu (HRE), Maserasyon ekstraksiyon (ME), Karıştırma ekstraksiyonu (SE) ve Soxhlet ekstraksiyonu (SLE) rosmarinik asidin kıyaslama ekstraksiyon teknikleri idi. Ancak uçucu ve tehlikeli çözücülerin kullanımı, uzun ekstraksiyon zamanı ve daha fazla enerji kaybı gibi bu yöntemlerin birçok dezavantajı vardır.

Yukarıda belirtilen problemlerin üstesinden gelmek için, çevre dostu teknikler daha çekici olmuştur. Ultrason Destekli Ekstraksiyon(UAE)[17] ve Mikrodalga Ekstraksiyon(MAE)[18,19] uygulamaları çok daha fazla dikkat çekmektedir. Bu iki yöntem arasında UAE ticari üretim için daha kolay ölçeklenebilir yöntemdir[17]. Ayrıca basit işlem, daha kısa sürede yüksek tekrarlanabilirlik, düşük çözücü tüketimi ve sıcaklık ve daha düşük enerji girişi sunabilen umut verici bir ekstraksiyon tekniği olan Ultrason Destekli Ekstraksiyon (UAE) analitleri pek çok matrisden ekstrakte etmek için yaygın olarak kullanılmıştır[20,21]. Ekstraksiyonun ultrasonla zenginleştirilmesi, hücre duvarlarının parçalanmasına, parçacık boyutunun düşürülmesine ve hücre içeriğinin kavitasyonlarla üretilen kabarcıkların çökmesine bağlı olarak çözücüye kütle transferinin artırılmasına katkı sağlamaktadır[22,23]. Hızlı, ucuz, yüksek verimli ve çevre dostu olan UAE bitki materyalinin işlenmesinde ve bitkilerin farklı bölümlerinden analitlerin ekstraksiyonunda geleneksel ekstraksiyon tekniklerine alternatiftir.

Bu çalışmanın amacı, Biberiye yapraklarından rosmarinik asit ekstraksiyonu için hızlı, etkili, doğrulanmış ve çevre dostu Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon(UAE) yaklaşımını geliştirmek ve sonuçları geleneksel yöntemlerle karşılaştırmaktır. Burada, UAE prosedürünün etkin parametrelerinin performansını sistematik olarak araştırılmıştır. Ekstraksiyon koşullarının optimizasyonundan sonra önerilen ekstraksiyon tekniği Biberiye yapraklarından rosmarinik asidin etkin ve mükemmel ekstraksiyonudur.

## II. MALZEME VE YÖNTEM

### *A. REAKTİFLER VE MALZEMELER*

Biberiyenin kurutulmuş ve öğütülmüş yaprakları yerel bir aktardan satın alınarak kullanıma kadar serin ve karanlık bir yerde muhafaza edildi. Deneylerde kullanılan tüm kimyasallar analitik kalitede kullanılmıştır. Etanol Merck (Darmstadt Germany) Firmasından satın alındı ve kütlece >% 99,5 saflık derecesinde kullanıldı. Sodyum nitrit, sodyum molibdat, sodyum hidroksit ve Rosmarinic asit (>% 98), Sigma Aldrich Firmasından (Steinheim, Almanya) satın alındı. Analizde kullanılacak çözeltileri hazırlamak için bir Millipore Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, ABD) su saflaştırma sistemince üretilen deiyonize (İletkenlik: <18 mΩ) su kullanılmıştır.

### *B. ULTRASONİK DESTEKLİ EKSTRAKSİYON*

Ultrasonik destekli ekstraksiyon Wisebath marka 50 kHz frekanslı ultrasonik banyo kullanılarak gerçekleştirildi. 100 mL hacimli erlenlerin içerisine öğütülmüş numuneden 200 mg tartılarak aktarıldı. Üzerine deney programında belirtilen miktarda ve yine belirtilen pH'da solvent ilave edildi. Erlenin ağzı alüminyum folyo ile kapatılıp lastikle sabitlendi.

Ultrasonik banyonun sıcaklığı ve süresi ayarlandı. Standart ultrasonik koşullar için erlenler ultrasonik banyo içerisine yerleştirildi. Banyodaki su ile erlen içerisindeki çözelti seviyesi aynı tutuldu. Ve ultrasonik banyo çalıştırıldı. Ekstraksiyon işlemi tamamlandıktan sonra kapilerin tıkanmasını önlemek amacıyla çözelti önce Whatman marka filtre kâğıdı ile sonrasında 0.45 mikronluk membran filtre ile süzüldü.

### C. EKSTRAKTLARDA ROSMARİNİK ASİT İÇERİĞİNİN BELİRLENMESİ

Ekstraktlardaki Rosmarinik asit içeriği kolorimetrik yükseltgeme/indirgeme reaksiyonuna dayalı UV Spektrofotometrik yöntemle belirlendi. Aşağıda belirtilen prosedür kullanıldı.

Stok Solüsyon: Biberiye yaprağı ekstraktı.

Test Solüsyonu: Stok çözeltisinin 1 ml'sine 2 ml 0.5 M hidroklorik asit ile 2 ml 10 g sodyum nitrit ve 10 g sodyum molibdatın 100 ml su içinde çözülmesi ile hazırlanan çözelti ilave edildi. Sonra 2 ml seyreltik sodyum hidroksit çözeltisi eklendi ve su ile 10 ml'ye seyreltildi. Çözelti iyice karıştırıldı.

Absorbans Ölçümü: Test solüsyonunun 505 nm' de absorbansı spektrofotometre(Varian Cary 50, Australia) ile hemen ölçülür. Aşağıdaki ifadeden rosmarinik asit olarak ifade edilen toplam hidrokisisinnamik türevleri (THTC) içeriği hesaplanır.

$$\% \text{RAE} = (A \times 2,5) / m$$

A: Test solüsyonunun 505 nm' de absorbansı

m: Numunenin kütlesi (g.)

### D. DENEYSEL TASARIM

Yüzey yanıt metodolojisi için üç faktör, faktörlerin düzeyleri (Düşük, Orta ve Yüksek) ve tasarım noktaları kod değerleri içinde Tablo 1 de gösterilmiştir. Deneyle Design-Expert programı tarafından rastgele seçilen on yedi deneysel nokta kullanıldı ve yanıtlar kaydedildi (Tablo 2). Toplam Hidrokisisinnamik Asit Türevleri(THDC % DM) üzerine değişkenlerin etkisini araştırmak üzere üç değişkenli Box-Behnken(BBD) gerçekleştirildi. Değişkenler; x1 (solvent konsantrasyonu, hacimce %), x2 (ekstraksiyon zamanı, dk.) ve x3 (ekstraksiyo sıcaklığı, 0C). Box-Behnken(BBD) tasarımını uygulamak için Design-Expert 8.0.7.1 Programı (Deneme versiyonu; Stat-Ease Inc. Minneapolis, MN, USA) kullanıldı. Karelerin saf hata toplamını değerlendirmek için merkez değerlerde beş tekrarlı on yedi deney gerçekleştirildi. Her bir numune için üç tekrarlı analiz yapıldı.

Deneysel veriler kuadratik modele uydurulmuştur. Önerilen kuadratik model, Eşitlik (1) ile aşağıdaki gibi gösterildi:

$$Y = \beta_0 \pm \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i \pm \sum_{l=1}^3 \beta_l X_l^2 \pm \sum_{l=1}^2 \sum_{j=2}^3 \beta_{lj} X_l X_j \quad (1)$$

Burada Y yanıt,  $\beta_0$  genellikle kesişim olarak tanımlanan sabit katsayıdır,  $X_i$  ( $i = 1-3$ ) kodlanmamış değişkendir,  $\beta_i$  doğrusal,  $\beta_{ii}$  kuadratik ve  $\beta_{ij}$  ( $i$  ve  $j = 3$ ) ikinci dereceden etkileşim katsayılarıdır.

**Tablo 1.** UAE ile biberiye yaprağı optimizasyonu için RSM'de kullanılan semboller ile bağımsız değişkenlerin değerleri ve kodlanmış biçimleri.

Bağımsız Değişkenler	Birimler	Değişkenlerin Sembolleri	Kod Düzeyleri		
			-1	0	1
Etanol Kons.	% (v/v)	( $x_1$ )	25	50	75
Ekstraksiyon Zamanı	dk	( $x_2$ )	15	30	45
Ekstraksiyon Sıcaklığı	$^{\circ}\text{C}$	( $x_3$ )	25	50	75

#### D. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Üçlü deneylerin ortalamaları üzerine istatistiksel analizler InStat® yazılım sürüm 3.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA), varyans analizi (ANOVA) prosedürü kullanılarak gerçekleştirildi. Ayrıca, Design-Expert programı kullanılarak değişkenler ile yanıt arasındaki etkileşimi saptamak için Anova testi uygulandı. Her örnek için üç tekrar analizi yapılmıştır.

### III. BULGULAR VE TARTIŞMA

#### A. UAE PERFORMANSI ÜZERİNE PROSES DEĞİŞKENLERİNİN ETKİSİ

Design Expert 8.0.7.1 ile tasarlanan Box-Behnken tasarım deneylerinin deneysel koşulları Tablo 2'de gösterilmektedir. Sonuçlar, ekstraksiyon süresinin (15-45 dakika), sıcaklığın (25-75 $^{\circ}\text{C}$ ) ve EtOH konsantrasyonunun (% 25-75, v/v) UAE ile ekstrakte edilen biberiye yaprağının THTC'sini etkilemektedir.

**Tablo 2.** Box-Behnken Bağımsız değişkenlerin ( $x_1$ ,  $x_2$ ,  $x_3$ ) tasarımı ve yanıt değişkenli toplam hidrokisisinamik türevleri (THTC) için deney sonuçları.

Çalışma	( $x_1$ )	( $x_2$ )	( $x_3$ )	Toplam	Numune	
	Etanol Kons. %	Zaman dk.	Sıcaklık $^{\circ}\text{C}$	Hidroksisinnamik Asit Türevleri (% RA, KB)	Kütlesi gr.	Absorbans
1	25	30	25	0.369	0.1015	0.015
2	50	30	50	4.280	0.1052	0.180
3	50	30	50	4.224	0.1031	0.174
4	50	15	25	0.771	0.1037	0.032

5	25	45	50	1.650	0.1049	0.069
6	50	30	50	4.132	0.1052	0.183
7	75	30	25	1.991	0.1042	0.083
8	50	30	50	4.013	0.1021	0.164
9	75	45	50	1.261	0.1073	0.054
10	75	15	50	1.200	0.1038	0.050
11	50	15	75	2.750	0.1046	0.115
12	50	45	75	6.071	0.1009	0.248
13	75	30	75	4.193	0.1054	0.177
14	50	45	25	0.025	0.1030	0.001
15	25	15	50	1.015	0.1034	0.042
16	50	30	50	3.950	0.1058	0.167
17	25	30	75	6.698	0.1019	0.273

Veriler ortalama (n=3)±SD olarak ifade edilmiştir.

KM; Kuru madde,

RA; Rosmarinik asit eşdeğeri.

### B. EKSTRAKSİYON ZAMANI

Burada UAE prosesinin mekanizması iki ana aşamaya sahiptir. Birincisi yıkama olarak da adlandırılır ve bitki matriksinin yüzeylerindeki çözünür bileşenlerin çözünmesi gerçekleşir. İkincisi, çözünen maddenin bitki matrisinden yavaş ekstraksiyon olarak bilinen difüzyon ve ozmotik işlemlerle çözücüye kütle transferidir[24-27]. Bu iki olgu Tablo 2 de açıkça görülmektedir. Yıkama, ekstraksiyonun başında hızlı bir artış ile gerçekleşmektedir. 37.15 dakikadan sonra yavaş ekstraksiyon üç konsantrasyonda azalma ile gözlemlenmiştir. Tüm numunelerin THTC' si 37.15 dakikaya kadar zamanın bir fonksiyonu olarak istikrarlı biçimde artmıştır. Tüm numunelerin THTC' si 37.15 dakika sonra azalmıştır. Ekstraksiyon süresinin artırılması, belirli bir zaman değerinde daha yüksek bir THTC' ye neden olur. Bitki matriksindeki çözünen madde ve ekstraksiyon çözültisindeki çözünen madde, Fick' in ikinci difüzyon yasasında açıklandığı gibi birbiriyle denge halindedir[28]. Ekstraksiyon veriminin ekstraksiyon zamanıyla değişimi Şekil 2 de gösterilmiştir.

### C. EKSTRAKSİYON SICAKLIĞI

Her bir çözücü sistemi için ekstraksiyon ilgili çözücünün kaynama noktası kısıtlamaları nedeniyle 25 ila 75°C arasında değişen sıcaklıklarda gerçekleştirildi. Her üç çözücü konsantrasyonunun THTC içeriği sıcaklığın bir fonksiyonu olarak sabit bir şekilde yükseldi (Tablo 2). Genelde, yüksek

sıcaklıktaki ekstraksiyonlar bitki matrisinin aktif bölgelerinden çözülmüş maddenin çözünürlüğünün artması nedeniyle kütle transferi ve ekstraksiyon performansını artırır. Bu da çözülmüş buhar basıncının yükselmesi ile açıklanabilir. Daha yüksek sıcaklıklarda aktif bileşiğin artan üretimi, hem kütle transferinin artması hem de çözücü viskozitesi azalması ve yüzey gerilimi sonucudur. Bu olgu Juntachote tarafından da bildirilmiştir[29]. Ekstraksiyon veriminin ekstraksiyon sıcaklığıyla değişimi Şekil 3 de gösterilmiştir.

#### *D. SOLVENT KONSANTRASYONU*

% 34.37 EtOH konsantrasyonlu ekstraksiyon solventi en yüksek THTC seviyesini vermişken % 75 EtOH konsantrasyonlu ekstraksiyon solventi en düşük THTC seviyesini vermiştir. Bu, düşük konsantrasyonda EtOH' nın düşük viskozitesi ile açıklanabilir; bu da, matriksin şişmesi ile bitki yapısını değiştirerek solventin bitkiye daha iyi nüfuz etmesini sağlar. Buna göre su bitkiyi şişirme maddesi olarak etki ediyorken, etanol, çözünen madde ve bitki matriksi arasındaki bağlanmayı bozmak üzere kullanılmıştır[30,31]. Ekstraksiyon veriminin çözücü konsantrasyonu ile değişimi Şekil 4 de gösterilmiştir.

Bu nedenle, çözücü ajan olarak su ve EtOH karışımı, kullanılan tüm solventlerin hidroksisinnamik türevlerini ekstrakte etmek için en iyi performansı sergilemiş olması ve bir başka muhtemel açıklama, suyun yüksek dielektrik sabiti olup, suyun EtOH ile çözeltisi polarite indekslerini arttırmasıdır[32].

#### *E. RSM İLE UAE NİN OPTİMİZASYONU*

Yazılımdan Yüzey Yanıt Metodolojisi kullanarak, aşağıda verilen ikinci dereceden bir model elde edildi:

UAE ile ekstrakte edilen Biberiye yapraklarının Toplam Hidroksisinnamik asit Türevleri Konsantrasyonu için optimum koşulları belirlemek adına Denklem 2 ye göre yüzey yanıt grafikleri oluşturuldu. tarafından çıkarılan biberiye yaprağı THTC için optimum koşulları belirlemek için Karşılıklı yüzey grafikleri denklem 2' ye göre oluşturuldu( Şek. 5, Şek. 6 ve Şek. 7) Şekil 5, biberiye yaprağı ekstraktlarının THTC' sinde EtOH konsantrasyonunun ve ekstraksiyon süresinin etkisini göstermektedir. Optimal ekstraksiyon koşulları, ekstraksiyon verimini en üst düzeye çıkarmak için Design-Expert yazılımında optimizasyon seçimi kullanılarak bulunmuştur. Bu değer 37.15 dakika ekstraksiyon süresi, 73.38°C ekstraksiyon sıcaklığı ve % 34.37 etanol konsantrasyonunda ölçülmüştür. Maksimum ekstraksiyon verimi bu çalışma koşulları altında % 6.77 RAE olarak bulunmuştur.

#### *F. MODEL BELİRLEME*

Ekstraksiyon verimi için Design Expert 8.0.7.1 in kuadratik denklemleri için ANOVA testi sonuçları Tablo 3 te verilmiştir. Regresyon analizleri % 95 güven aralığında yapılmıştır. ANOVA'ya göre, Modelin F-Değerinin 81.60 olması, türetilmiş modelin anlamlı olduğunu ortaya koymuştur.  $x_2$ ,  $x_3$ ,  $x_1x_3$ ,  $x_2x_3$ ,  $x_1^2$ ,  $x_2^2$  terimleri uygun model terimleridir. Tablo 3 te görüldüğü gibi ekstraksiyon sıcaklığı

( $x_3$ ) ekstraksiyon verimi üzerinde en uygun değişkendir. Uyum eksiklięi F değerinin 9.21 olması uygun olduğunu göstermiştir.

**Tablo 3.** Ekstraksiyon verimi İçin Design Expert 8.0.7.1 nin *Quadratik Denklemleri İçin Varyans(ANOVA) Analizleri.*

<b>Kaynak</b>	<b>Kareler Toplamı</b>	<b>Df</b>	<b>Kareler Ortalaması</b>	<b>F Değeri</b>	<b>p-Değeri Prob &gt; F</b>
Model	63.78	9	7.09	81.60	< 0.0001
$x_1$ -EtOH Kons.	0.15	1	0.15	1.70	0.2334
$x_2$ -Zaman	1.34	1	1.34	15.40	0.0057
$x_3$ -Sıcaklık	34.26	1	34.26	394.55	<0.0001
$x_1 x_2$	0.082	1	0.082	0.95	0.3625
$x_1 x_3$	4.26	1	4.26	49.03	0.0002
$x_2 x_3$	4.14	1	4.14	47.62	0.0002
$x_1^2$	3.92	1	3.92	45.14	0.0003
$x_2^2$	14.78	1	14.78	170.17	<0.0001
$x_3^2$	0.10	1	0.10	1.21	0.3081
Artık Değer	0.61	7	0.087	-	-
Uyum Eksiklięi	0.53	3	0.18	9.21	0.0287
Hata	0.077	4	0.019	-	-
Düzeltilmiř Toplam	64.38	16	-	-	-

df, Bağımsızlık Derecesi

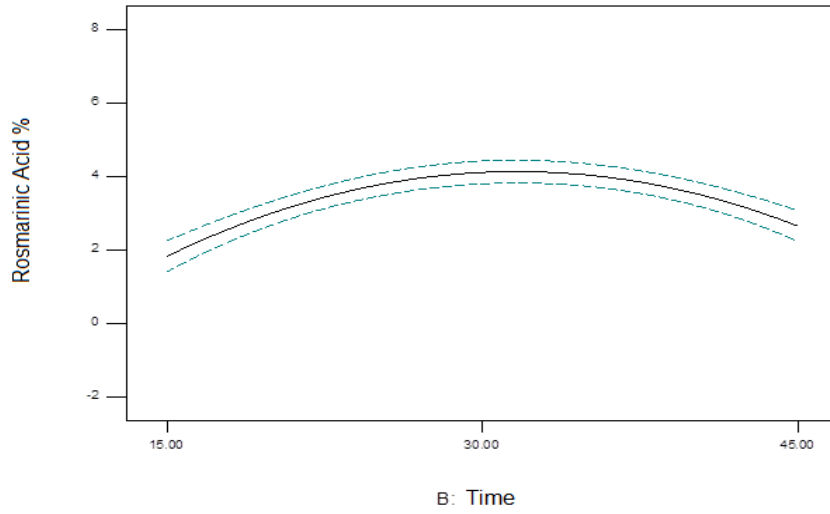
Cor, Ortalama için düzeltilmiř tüm bilgilerin toplamaları.

P>0.05 durumunda parametrenin önemsiz olduğunu gösterir.

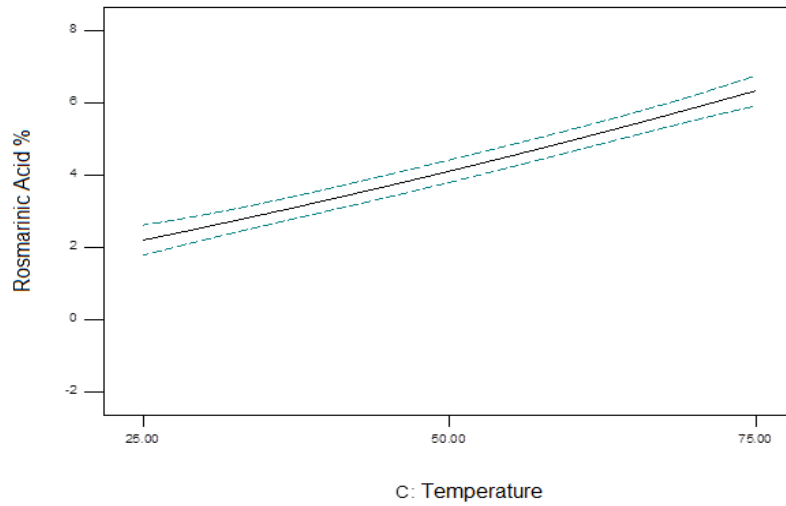
Yakın ve daha yüksek çoklu katsayılar (Belirleme katsayısı, Düzeltilme katsayısı ve Hesaplama katsayısı) modelin yüksek doğruluğuna işaret etmektedir. Düzeltilmiř katsayıyı da gerçek ve öngörülen veriler arasında yüksek bir korelasyon olduğunu gösterir. Çalışmamızda, Belirleme katsayısı (0.9906), Düzeltilme katsayısı(0.9784) ve Hesaplama katsayısı (0.8662) değerleri türetilen modelin doğruluğunu göstermektedir. Bu yüzden,



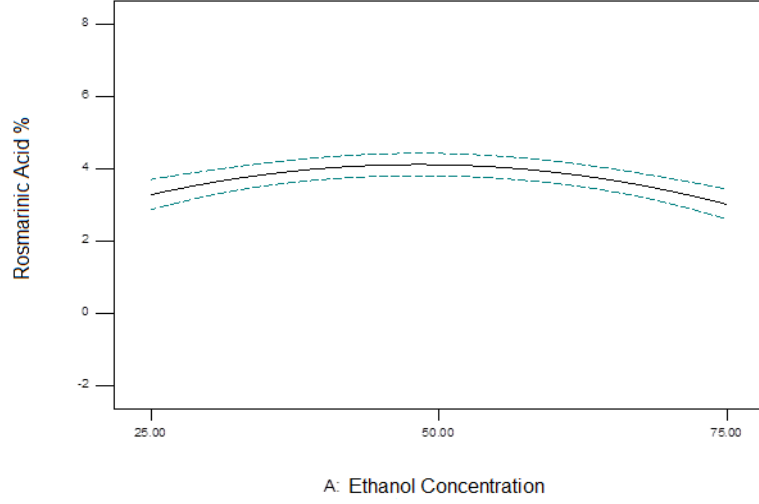
Yüzey yanıt modellemesi, UAE ile Biberiye yaprağından THDC'yi tahmin etmek için yeterince başarıyla gerçekleştirilebilir. Değişim katsayısının düşük değeri, deney sonuçlarının daha yüksek hassasiyetini ve güvenilirliğini gösterir. Çalışmamızda katsayı değeri 10.31 bulundu. Şekil 8, UAE ile elde edilen biberiye yaprağı ekstraktlarının THDC' si ile ilgili Denklem 2' den hesaplanan deneysel ve öngörülen veriler arasındaki korelasyonu göstermektedir. Modelden hesaplanan öngörülen sonucun, çalışma koşulları aralığındaki deney verileri ile iyi uyum içinde olduğu görülmektedir. Deneysel olarak elde edilen ekstraksiyon verimi değerleri ile model denklemini kullanarak hesaplanan değerler arasındaki ilişki Şekil 8 de görülmektedir.



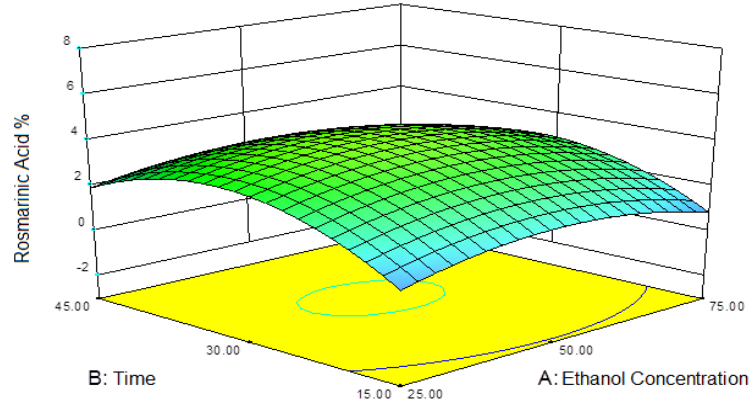
**Şekil 2.** Biberiye yaprağı ekstraksiyon veriminin ekstraksiyon zamanıyla ( $x_2$ ) değişimi.



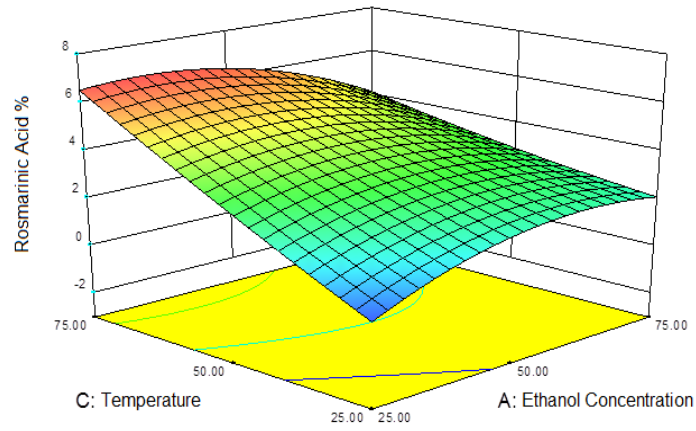
**Şekil 3.** Biberiye yaprağı ekstraksiyon veriminin ekstraksiyon sıcaklığıyla ( $x_3$ ) değişimi.



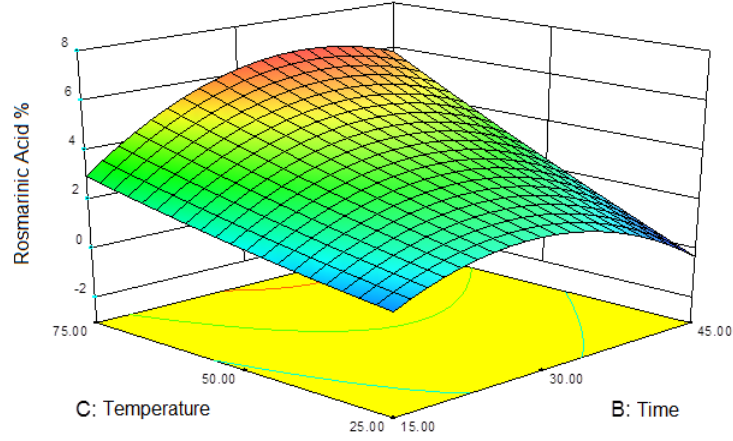
Şekil 4. Biberiye yaprağı ekstraksiyon veriminin etanol konsantrasyonu( $x_1$ ) ile değişimi.



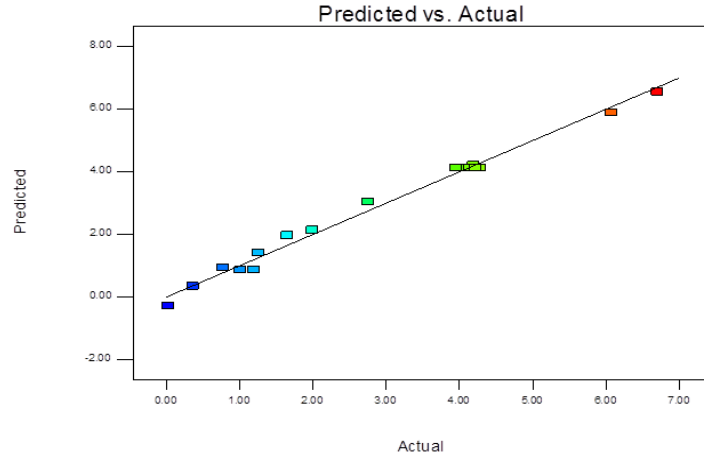
Şekil 5. Etanol konsantrasyonu ( $x_1$ ) ve ekstraksiyon zamanı ( $x_2$ ) nin fonksiyonu olarak Biberiye yapraklarının ekstraksiyon verimi için Yüzey Yanıt Grafiği.



Şekil 6. Etanol konsantrasyonu( $x_1$ ) ve ekstraksiyon sıcaklığı( $x_3$ ) nin fonksiyonu olarak Biberiye yapraklarının ekstraksiyon verimi için Yüzey Yanıt Grafiği.



**Şekil 7.** Ekstraksiyon zamanı( $x_2$ ) ve ekstraksiyon sıcaklığı( $x_3$ ) nın bir fonksiyonu olarak Biberiye yapraklarının ekstraksiyon verimi için Yüzey Yanıt Grafiği.



**Şekil 8.** Deneysel olarak elde edilen ekstraksiyon verimi değerleri ile model denklemleri kullanılarak hesaplanan değerler arasındaki ilişki.

#### IV. SONUÇ

Rosmarinic asit (RA), karnozol ve karnozik asit, biberiye'de (*Rosmarinus officinalis*) bulunan önemli doğal antioksidanlardır. Rosmarinic acid (RA). Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon ile maksimum ekstraksiyon performansını başarmak için %34.37 EtOH, 37.15 dk. ekstraksiyon zamanı ve 73.380C ekstraksiyon sıcaklığı optimum işletme koşulları olarak kullanılmalıdır. Bu çalışmada kullanılan iki parametre (ekstraksiyon zamanı ve ekstraksiyon sıcaklığı), biberiye yaprağı ekstraktlarında THTC' nin ekstraksiyon verimliliği üzerinde belirgin bir etkiye sahiptir ( $p < 0.005$ ). Ekstraksiyon sıcaklığının etkisi, çözücü konsantrasyonunun veya zamanın etkisinden daha büyüktür.

**TEŞEKKÜR:** Bu çalışmanın tamamlanmasında katkılarından dolayı Uşak Üniversitesi Bilimsel Analiz ve Teknolojik Uygulama ve Araştırma Merkezine teşekkür ederiz.

## V. KAYNAKLAR

- [1] Shanlou, Q.; Weihua, L.; Ryoko, T.; Miyako, H.; Keiko, M.; Fumio, T.; Yukio, N.; Masataka, Y. Rosmarinic acid inhibits the formation of reactive oxygen and nitrogen species in RAW264.7 macrophages. *Free Radic. Res.* 2005; 39. 995–1003.
- [2] Sui, X.; Liu, T.; Ma, C.; Yang, L.; Zu, Y.; Zhang, L.; Wang, H. Microwave irradiation to pretreat rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) for maintaining antioxidant content during storage and to extract essential oil simultaneously. *Food Chem.* 2012; 131. 1399–1405.
- [3] Osakabe, N.; Takano, H.; Sanbongi, C.; Yasuda, A.; Yanagisawa, R.; Inoue, K.; Yoshikawa, T. Anti-inflammatory and anti-allergic effect of rosmarinic acid (RA); inhibition of seasonal allergic rhinoconjunctivitis (SAR) and its mechanism. *Biol. Factors* 2004; 21. 127–131.
- [4] Furtado, M.A.; de Almeida, L.C.F.; Furtado, R.A.; Cunha, W.R.; Tavares, D.C. Antimutagenicity of rosmarinic acid in Swiss mice evaluated by the micronucleus assay. *Mutat. Res. Gen. Toxicol. Environ.* 2008; 657, 150–154.
- [5] Huang, S.S.; Zheng, R.L. Rosmarinic acid inhibits angiogenesis and its mechanism of action in vitro. *Cancer Lett.* 2006; 239. 271–280.
- [6] Kim, D.S.; Kim, H.R.; Woo, E.R.; Hong, S.T.; Chae, H.J.; Chae, S.W. Inhibitory effects of rosmarinic acid on adriamycin-induced apoptosis in H9c2 cardiac muscle cells by inhibiting reactive oxygen species and the activations of c-Jun N-terminal kinase and extracellular signal-regulated kinase. *Biochem. Pharm.* 2005; 70, 1066–1078.
- [7] Li, G.S.; Jiang, W.L.; Tian, J.W.; Qu, G.W.; Zhu, H.B.; Fu, F.H. In vitro and in vivo antifibrotic effects of rosmarinic acid on experimental liver fibrosis. *Phytomedicine* 2010; 17. 282–288.
- [8] Debersac, P.; Vernevaut, M.F.; Amiot, M.J.; Suschetet, M.; Siess, M.H. Effects of a water-soluble extract of rosemary and its purified component rosmarinic acid on xenobiotic-metabolizing enzymes in rat liver. *Food Chem. Toxicol.* 2001; 39. 109–117.
- [9] Fallarini, S.; Miglio, G.; Paoletti, T.; Minassi, A.; Amoroso, A.; Bardelli, C.; Brunelleschi, S.; Lombardi, G. Clovamide and rosmarinic acid induce neuroprotective effects in vitro models of neuronal death. *Br. J. Pharm.* 2009; 157. 1072–1084.
- [10] Lee, J.; Jung, E.; Koh, J.; Kim, Y.S.; Park, D. Effect of rosmarinic acid on atopic dermatitis. *J. Dermatol.* 2008; 35. 768–771.
- [11] Psotova, J.; Svobodova, A.; Kolarova, H.; Walterova, D. Photoprotective properties of *Prunella vulgaris* and rosmarinic acid on humankeratinocytes. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 2006; 84. 167–174.
- [12] Hamaguchi, T.; Ono, K.; Murase, A.; Yamada, M. Phenolic compounds prevent Alzheimer's pathology through different effects on the amyloid- $\beta$  aggregation pathway. *Am. J. Pathol.* 2009; 175. 2557–2565.

- [13] T. Ohlsson, N. Bengtsson, *Minimal Processing Technologies in the Food Industry*, CRC Press, 2002.
- [14] J. Pokorny, N. Yanishlieva, M.H. Gordon, *Antioxidants in Food: Practical Applications*, Taylor & Francis, 2001.
- [15] Navarrete, M. Herrero, A. Martín, M.J. Cocero, E. Ibáñez, Valorization of solidwastes from essential oil industry, *Journal of Food Engineering* 2011; 104.196–201.
- [16] N. Balasundram, K. Sundram, S. Samman, Phenolic compounds in plants andagri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potentialuses, *Food Chemistry* 2006; 99.191–203.
- [17] Ma, C.; Wang, S.; Yang, L.; Zu, Y. Ionic liquid-based ultrasonic-assisted extraction of camptothecin and 10-hydroxycamptothecin from samara of *Camptotheca acuminata*. *Chem. Eng. Process. Process Intensif.* 2012; 57–58, 59–64.
- [18] Wang, S.; Yang, L.; Zu, Y.; Zhao, C.; Sun, X.; Zhang, L.; Zhang, Z. Design and performance evaluation of ionic liquids-microwave based environmental-friendly extraction technique for camptothecin and 10-hydroxycamptothecin from samara of *Camptotheca acuminata*. *Ind. Eng. Chem. Res.* 2011; 50. 13620–13627. [19] Arslan Y., Katar D., Kayaçetin F., Subaşı İ. 2008. Afyon Alkoloitleri ve Önemi, *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi.* 17, (1-2).
- [19] Liu, T.; Sui, X.; Zhang, R.; Yang, L.; Zu, Y.; Zhang, L.; Zhang, Y.; Zhang, Z. Application of ionic liquids based microwave-assisted simultaneous extraction of carnosic acid, rosmarinic acid and essential oil from *Rosmarinus officinalis*. *J. Chromatogr. A*, 2011; 1218. 8480–8489.
- [20] Jiao, Y.; Zuo, Y. Ultrasonic extraction and HPLC determination of anthraquinones, aloemodine, emodine, rheine, chrysophanol, and physcione, in *Radix Polygoni multiflori*. *Phytochem. Anal.* 2009; 20, 272–278.
- [21] Zuo, Y.; Zhang, L.; Wu, J.; Fritz, J.W.; Medeiros, S.; Rego, C. Ultrasonic extraction and capillary gas chromatography determination of nicotine in pharmaceutical formulations. *Anal. Chim. Acta*, 2004; 526, 35–39.
- [22] Chemat, F.; Zill-e-Huma; Khan, M.K. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrason. Sonochem.* 2011; 18. 813–835.
- [23] Rodrigues, S.; Pinto, G.A.S. Ultrasound extraction of phenolic compounds from coconut (*Cocos nucifera*) shell powder. *J. Food Eng.* 2007; 80. 869–872.
- [24] Velickovic DT, Milenovic DM, Ristic MS and Veljkovic VB, Kinetics of ultrasonic extraction of extractive substances from garden (*Salvia officinalis* L.) and glutinous (*Salvia glutinosa* L.) sage. *Ultrason Sonochem* 2006; 13.150–156.
- [25] Velickovic DT, Milenovic DM, Ristic MS and Veljkovic VB, Ultrasonic extraction of waste solid residues from the *Salvia* sp. essential oil hydrodistillation. *Biochem Eng J* 2008; 13.150–156.
- [26] Vinatoru M, An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrason Sonochem* 2001; 8.303–313.

- [27] Toma M, Vinatoru M, Paniwnyk L and Mason TJ, Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. *Ultrason Sonochem* 2001; 8.137–142.
- [28] Lang Q and Wai CM, Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci Technol* 2006; 17.300–312.
- [29] Juntachote T, Berghofer R, Bauer F and Siebenhandl S, The application of response surface methodology to the production of phenolic extracts of lemon grass, galangal, holy basil and rosemary. *Int J Food Sci Technol* 2006; 41.121–133.
- [30] Lang Q and Wai CM, Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci Technol* 2006; 17.300–312.
- [31] Lang Q and Wai CM, Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies – A practical review. *Talanta* 2001; 53.771–782.
- [32] Spigno G and De Faveri DM, Microwave-assisted extraction of tea phenols: A phenomenological study. *J Food Eng* 2009; 93.210–217.
- [33] Pan G, Qiao J, Zhu C and Wang F, Optimization of microwaveassisted extraction technology of flavonoids from solid wastes (hawthorn seed), in *Proceedings of an International Conference on Computer Distributed Control and Intelligent Environmental Monitoring, Changsha, Hunan China; 19–20Feb. 2011*, ed.by Randall Bilof, IEEE Computer Society Conference Publishing Services (CPS) Los Alamitos, California, USA, pp. 541–544, 2011.
- [34] Zhu CH, Lu FP, Han ZL and Du LX, Statistical optimization of medium components for avilamycin production by *Streptomyces viridochromogenes* tu57-1 using surface methodology. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2007; 34.271–278.