



**T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Yağı Alınmış Çörek Otu Tohumunda Biyoaktif Profilin Belirlenmesi ve
Timokinon Ekstraksiyonunun Matematiksel Modellemesi ile Solvent Tipi-
Polarite Optimizasyonu**

VAAD KANAS

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI

**Şanlıurfa
2025**



**T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Yağı Alınmış Çörek Otu Tohumunda Biyoaktif Profilin Belirlenmesi ve
Timokinon Ekstraksiyonunun Matematiksel Modellemesi ile Solvent Tipi-
Polarite Optimizasyonu**

Tez Danışmanı: Doç. Dr. EYYÜP KARAOĞUL

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI

Şanlıurfa

2025

TEŞEKKÜR

Bilgi, insanı geliştiren, toplumu dönüştüren ve medeniyetleri inşa eden en güçlü araçtır. Bu bilinçle çıktığım ilmî yolculukta ilerleme fırsatını bana nasip eden Yüce Allah'a sonsuz hamd ve şükrederim. Öncelikle, akademik bilgi birikimi, değerli yönlendirmeleri, sabrı ve beni her zaman motive eden rehberliğiyle bu süreçte bana yol gösteren çok kıymetli tez danışmanım Doç. Dr. Eyyüp KARAOĞUL'a en içten şükranlarımı sunarım. "İlim talebi asla bitmez ve bitmemelidir" sözünü her zaman tekrar eden kıymetli hocamın bu ifadesi, beni derinden motive etmiş ve hayatımda rehber edinmeme vesile olmuştur. Tez savunma jürimde yer alarak değerlendirmeleri ve önerileriyle çalışmama akademik derinlik kazandıran, tezime önemli katkılarda bulunan Prof. Dr. İbrahim HAYOĞLU'na ve Dr. Öğr. Üyesi Didem VEREP KOÇ'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Bilgi ve tecrübesini benimle cömertçe paylaşan, kıymetli zamanını ve emeğini esirgemeyen; desteğini ve moralini her daim yanımda hissettiren değerli Dr. Öğr. Gör. Gjulden NEDJIP Hocam'a da sonsuz şükranlarımı sunarım. Hayatım boyunca en büyük destekçilerim olan, dualarıyla, sevgileriyle ve sonsuz fedakârlıklarıyla her daim arkamda duran canım anneme ve babama, minnetimi ifade etmeye kelimeler yetmez. Onların varlığı ve inancı, bu başarının arkasındaki en büyük güçtür . Sevgili kardeşlerime, her birine ayrı ayrı gönülden teşekkür ederim. Bu süreç boyunca verdikleri içten destek ve samimi teşvikleri benim için son derece kıymetliydi. Laboratuvar sürecinde birlikte çalıştığım, bilgi ve deneyimlerini paylaşan ve bana birçok konuda yardımcı olan arkadaşlarım Hawsar, Gizem, Abdulhalık ve Merve'ye teşekkür ederim.

Son olarak, sevgisini, desteğini, duasını ve iyi dileklerini esirgemeyen; bir şekilde bu sürece katkı sunan herkese gönülden teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
SİMGELER.....	viii
KISALTMALAR	ix
1. GİRİŞ	1
2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	3
2.1. Çörek Otu Tohumu.....	3
2.1.1. Çörek Otu Tohumunun Biyolojik Özellikleri ve Tıbbi Kullanım Alanları ..	4
2.1.2. Çörek Otu Tohumunun Kimyasal Özellikleri.....	5
2.1.3. Çörek Otu Tohumu Küspesi.....	9
2.1.3.1. Çörek Otu Küspesi ve Değerlendirilme Alanlarına Odaklanan Önceki Çalışmalar	10
2.2. Timokinon (Thq)	13
2.2.1. Timokinonun Sağlık Üzerindeki Etkileri.....	14
2.2.2. Timokinonun Toksik Özelliği.....	16
2.3. Maserasyon Ekstraksiyon İşlemi.....	16
3. GEREÇ VE YÖNTEM	19
3.1. Gereç	19
3.2. YÖNTEM.....	19
3.2.1. Çörek Otu Tohumun Küspesine Uygulanan Ön İşlemler	19
3.2.2. Rutubet Tayini.....	20
3.2.3. Çörek Otu Küspesinin Maserasyon Yöntemi ile Ekstraksiyonu.....	20
3.2.4.Ekstraksiyon Verim Analizi.....	22
3.2.5. Çörek Otu Küspesinde Toplam Fenolik Madde Miktarı Analizi (TFM)...	23
3.2.6. Çörek Otu Küspesinde Toplam Flavonoid Miktarı Analizi (TF).....	24
3.2.7. Çörek Otu Küspesinde Antioksidan Analizi.....	26
3.2.7.1. DPPH ile Antioksidant Madde Analizi	26
3.2.7.2. ABTS ile Antioksidant Madde Analizi.....	27

3.2.7.3. CUPRAC ile Antioksidan Madde Analizi	29
3.2.8. Çörek Otu Küspesinin Ekstraktının LC-MS/MS ile Fenolik Kompozisyon Analizi	31
3.2.9. İstatistiksel Analiz	31
4. BULGULAR	33
4.1. Çörek Otu Tohum Küspesinin Ekstraksiyonunda Polarite ve Çözücü Türünün % Verim, Toplam Fenolik Madde ve Toplam Flavonoid Madde Üzerine Etkisi ..	33
4.2. Çörek Otu Tohum Küspesinin Ekstraksiyonunda Polarite ve Çözücü Türünün Antioksidan Aktivite Üzerine Etkisi	34
4.3. Çörek Otu Tohum Küspesinin Ekstraksiyonunda Polarite ve Çözücü Türünün Fenolik Bileşen Kompozisyonu Üzerine Etkisi	42
4.4. Antioksidan, Toplam Fenolik Madde, Toplam Flavanoid Madde ve Fenolik Bileşen Kompozisyonu Bakımından, Çörek Otu Tohum Küspesi için Optimum Ekstraksiyon Yönteminin Belirlenmesi	44
5. TARTIŞMA	58
6. SONUÇLAR	61
7. ÖNERİLER	62
8. KAYNAKLAR	63

ÖZET
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Yağı Alınmış Çörek Otu Tohumunda Biyoaktif Profilin Belirlenmesi ve
Timokinon Ekstraksiyonunun Matematiksel Modellemesi ile Solvent Tipi -
Polarite Optimizasyonu**

VAAD KANAS

HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Yıl:2025, sayfa: 80

Bu çalışma, *Nigella sativa L.* (çörek otu) tohumlarından yağ çıkarıldıktan sonra geriye kalan küspe materyalinin kimyasal bileşimini analiz etmeyi ve özellikle timokinon (Thq) gibi biyolojik olarak aktif bileşiklerin ekstraksiyon verimliliğini optimize etmeyi amaçlamaktadır. Çörek otu, tarih boyunca hem geleneksel tıpta hem de modern sağlık uygulamalarında yaygın olarak kullanılan ve antioksidan, antibakteriyel, antiviral ve antiinflamatuvar özellikleriyle bilinen bir bitkidir. Bitkinin en çok araştırılan kısmı olan uçucu yağı, sağlık üzerindeki olumlu etkileri nedeniyle birçok bilimsel çalışmaya konu olmuştur. Ancak, yağ çıkarıldıktan sonra elde edilen küspe genellikle hayvan yemi olarak değerlendirilmekte ve içeriğinde bulunan yüksek miktarda karbonhidrat, protein, lif ve biyoaktif bileşikler göz ardı edilmektedir. Bu bağlamda çalışmanın temel amacı, çörek otu küspesinin yalnızca bir yan ürün olmadığını, aksine gıda ve ilaç endüstrilerinde değerlendirilebilecek potansiyel bir hammadde kaynağı olduğunu ortaya koymaktır. Araştırmada, timokinon ve diğer aktif bileşiklerin varlığı, miktarı ve optimum ekstraksiyon koşulları bilimsel yöntemlerle belirlenmiştir. Elde edilen bulgular, çörek otu küspesinin katma değeri yüksek bir ürün olarak değerlendirilmesi açısından önemli bir bilimsel boşluğu doldurmakta ve ilgili sektörler için yeni fırsatlar sunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Çörek otu küspesi, timokinon, ekstraksiyon optimizasyonu, kimyasal karakterizasyon, Antioksidan aktivite

ABSTRACT
MASTER THESIS

**Bioactive Profile Characterization of Defatted Black Cumin (*Nigella sativa*)
Seeds and Mathematical Modeling of Thymoquinone Extraction with Solvent
Type-Polarity Optimization**

VAAD KANAS

HARRAN UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF FOOD ENGINEERING

YEAR:2025, Page: 80

This study aims to analyze the chemical composition of the residual press cake obtained after oil extraction from *Nigella sativa* L. (black cumin) seeds and to optimize the extraction efficiency of biologically active compounds, particularly thymoquinone (Thq). Black cumin is a plant that has been widely used throughout history in both traditional medicine and modern health applications, known for its antioxidant, antibacterial, antiviral, and anti-inflammatory properties. While the most studied part of the plant is its essential oil—due to its positive health effects—the press cake remaining after oil extraction is often undervalued and primarily used as animal feed, despite its rich content of carbohydrates, proteins, fiber, and bioactive compounds. In this context, the main objective of this study is to demonstrate that black cumin press cake is not merely a by-product, but a potential raw material that can be utilized in the food and pharmaceutical industries. The presence, concentration, and optimal extraction conditions of thymoquinone and other active compounds were determined using scientific methods. The findings fill a significant gap in the literature by highlighting the value-added potential of black cumin press cake and offer new opportunities for related industries.

Keywords: Black cumin press cake, thymoquinone, extraction optimization, chemical characterization, antioxidant activite

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. (a) Nigella sativa bitkisi(Üçler, 2023), (b) Nigella sativa tohumları (Dubaj).	3
Şekil 2.2. Timokinon molekülünün kimyasal yapısı(İslam et al., 2016).	13
Şekil 2.3. Maserasyon(Kumar et al., 2023).	18
Şekil 3.1. Öğütülerek toz haline getirilen çörek otu tohum küspesi.	20
Şekil 3.2. Maserasyon ekstraksiyonu için RSM ile deneysel tasarımı	22
Şekil 3.3. Çörek otu tohum küspesinin maserasyon yöntemi ile ekstraksiyon işlemi.	22
Şekil 3.4. TFM analizi için oluşturulan Gallik asit kalibrasyon eğrisi.	23
Şekil 3.5. Çörek otu tohum küspesi ekstresinin toplam fenolik madde miktarının (TFM) analizi.	24
Şekil 3.6. Toplam flavanoid madde (TF) analizi için oluşturulan Quercetin kalibrasyon eğrisi.	25
Şekil 3.7. Çörek otu tohum küspesi ekstresinin flavanoid analizi.	26
Şekil 3.8. DPPH analizi için Trolox kalibrasyon eğrisi.	26
Şekil 3.9. Çörek otu tohum küspesi ekstresinin DPPH % inhibasyon antioksidant aktivite analizi.	27
Şekil 3.10. ABTS analizi için Trolox kalibrasyon eğrisi.	28
Şekil 3.11. ABTS yöntemi ile antioksidant kapasite analizi.	29
Şekil 3.12. CUPRAC için oluşturulan Trolox kalibrasyon eğrisi.	30
Şekil 3.13. CUPRAC yöntemi ile çörek otu küspe ekstresinin antioksidan madde analizi.	30
Şekil 4.1. Çörek Otu Tohum Küspesinin ekstraksiyonunda Polarite ve Çözücü Türünün etkisi: a) % Verim, b) Toplam Fenolik Madde Ve c) Toplam Flavanoid Madde.	33
Şekil 4.2. Çörek Otu Tohum Küspesinin ekstraksiyonunda Polarite ve Çözücü Türünün antioksidan aktivite üzerine etkisi: a)RSA-DPPH 15 ppm b) RSA-DPPH 10 ppm, c) RSA-DPPH 5 ppm, d) RSA-ABTS 15ppm, e) RSA-ABTS 10ppm, f) RSA- ABTS 5ppm ve g) Kabuledilebilirlik.	35
Şekil 4.3. Çörek Otu Tohum Küspesinin ekstraksiyonunda Polarite ve Çözücü Türünün antioksidan aktivite üzerine etkisi:a)KSRK-DPPH 15 ppm b) KSRK-DPPH 10 ppm, c) KSRK-DPPH 5 ppm, d) KSRK-ABTS 15 ppm, e) KSRK-DPPH 10 ppm ve f) KSRK-DPPH 5 ppm.	38
Şekil 4.4. Çörek Otu Tohum Küspesinin ekstraksiyonunda Polarite ve Çözücü Türünün antioksidan aktivite üzerine etkisi: a)IC50-DPPH 5-15ppm, b) IC50-ABTS 5-15ppm ve c) CUPRAC (mg/ Trolox/L).	40
Şekil 4.5. Çörek Otu Tohum Küspesinin ekstraksiyonunda Polarite ve Çözücü Türünün LC-MS/MS üzerine etkisi: a) Timokinon, b) Vanilik asit, c) Acetohydroxamic Acid, d) Kaempferol, e) Fumarik Asit ve f) 4- Hydroxybenzoik Acid	42

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Çörek otunun sistematik yeri(Tanker et al., 2004)	3
Çizelge 2.2. Nigella sativa'nın Kimyasal içeriği(Shah & Kasturi, 2003).....	6
Çizelge 2.3. Çörek otu uçucu yağında bulunan kimyasal bileşenler(Muhammad et al., 2009).	7
Çizelge 2.4. Çörekotu yağında bulunan yağ asitlerinin bileşimi(El-Tahir & Bakeet, 2006). ..	8
Çizelge 3.1. Çörek otu küspesinin maserasyon reçetesi.	21
Çizelge 3.2 LC-MS/MS analizi için gradyan mod uygulaması	31
Çizelge 4.1. Çörek otu küspesinin maserasyon ekstraksiyonunun deneysel tasarımı ve analiz çıktıları	44
Çizelge 4.2. Antioksidan aktivite (AA), toplam fenolik madde (TFM) ve toplam flavonoid (TF) açısından ekstraksiyon optimizasyonu: için RSM model istatistiği	45
Çizelge 4.3. Çörek otu küspesinin maserasyon ekstraksiyonu için varyans analizi (MCA)(ANOVA) ve model katsayıları	50
Çizelge 4.4. Çörek otu küspesinin maserasyon ekstraksiyonunun deneysel tasarımı ve LC- MS/MS analiz çıktıları.....	52
Çizelge 4.5. Fenolik bileşen kompozisyonu analizi için RSM model istatistiği.....	55
Çizelge 4.6. Çörek otu küspesinin maserasyon ekstraksiyonu için varyans analizi (MCA)(ANOVA) ve model katsayıları	56

SİMGELER

%	Yüzde oranı
*	İstatistiksel anlam seviyesi
g	Gram
L	Litre
M	Molar
ppm	Milyonda birim

KISALTMALAR

Thq	Timokinon
TF	Toplam Flavanoid
TFM	Toplam fenolik madde
Va-Ac	Vanilik Asit
AHA	Asetohidroksamik
Kaf	Kaempferol
FAc	Fumarik Asit
4-HBA	4-Hidroksibenzoik Asit
AA	Antioksidan Aktivite
ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
ANOVA	Analysis of Variance (Varyans Analizi)
CUPRAC	Cupric Reducing Antioxidant Capacity (Bakır (II) İndirgeme Antioksidan Kapasitesi)
DET	Design-Expert Tahmini
DPPH	2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl
KSRK	Kalan Serbest Radikal Konsantrasyonu
LC-MS/MS	Sıvı Kromatografi/Kütle Spektrofotometresi
Mc	Maceration (Maserasyon)
P_F	Modelin P-değeri
P_{LoF}	Uyum Eksikliği P-değeri
RSA	Radikal Süpürme Aktivitesi
RSM	Response Surface Methodology (Yanıt Yüzeyi Metodolojisi)
Trolox	6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit
2FI	Two-Factor Interaction (iki faktörlü etkileşim)
SD	Standart Sapma
DW	Dry Wight (kuru ağırlık)

1. GİRİŞ

Çörek otu Asya'nın güneyinde "kalonji", İngilizce'de " black cumin" ve Arapçada "habuut-ul-sauda" olarak adlandırılmaktadır (Nadkarni, 1976). Çörek otu (*Nigella sativa* L.), Ranunculaceae (dügün çiçeğigiller) familyasına ait olup, başta Doğu Akdeniz ülkeleri olmak üzere Türkiye ve birçok ülkede yaygın olarak yetiştirilen bir bitki türüdür(Kılıç & Arabacı, 2016; Salem, 2005) . Dünyada *Nigella* cinsinin yaklaşık 20 kadar türü bulunmaktadır. Türkiye florasında 14 tür bulunduğu belirtilmektedir (Seçmen et al., 2000). Türkiye'de yaygın olarak satılan çörek otunun türü *Nigella sativadır* (Yılmaz et al., 2020). Şifalı bitkiler arasında yer alan çörek otu (*Nigella sativa* L.), insanlık tarihinde en kıymetli besin bileşimine sahip bitkilerden biri olarak kabul edilmiştir (Yimer et al., 2019). Çörek otu tohumları çoğunlukla ekmek ve unlu mamullerin üzerine konularak tüketilmektedir. Çörek otu İslam dünyasında da çok önemli bir yere sahiptir. İslam peygamberi efendimiz Hz. Muhammed (s.a.v)'in çörek otunun faydalarına dair hadisi bulunmaktadır. Bu hadisi Ebu Hureyre (r.a) rivayetine göre "Rasulullah (s.a.v) buyurdu ki; ölüm dışında hiçbir hastalık yoktur ki, çörek otunda onun için bir deva bulunmasın" (Dinçoğlu, 2014). *Nigella sativa* pek çok hastalığa karşı şifalı etkileri nedeniyle Ortadoğu ülkelerinde “Habbat Al Barakah” yani “Kutsanmış Tohum” adıyla da tanınmaktadır (Gün, 2012). Çörek otu içerdiği doğal bileşikler sayesinde antioksidan, antibakteryel, antiinflamatuvar ve antiviral özellikler sergilemektedir. Bu nedenle öksürük gibi solunum yolu hastalıklarında ve egzema, sedef gibi cilt problemlerinde çörek otu yağı uzun yıllardır kullanılmaktadır. Yapılan son araştırmalarda ise, uçucu yağında bol miktarda bulunan Timokinon (Thq) adlı bileşiğin sağlık açısından önemli etkileri olduğu belirlenmiştir. Özellikle kanser hücreleri üzerinde gösterdiği olumlu etkiler dikkat çekmektedir (Ballout et al., 2018) . Çörek otundaki yağ oranı (32-40) % yüksek olduğu için yağ endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak işleme sonrası küspe olarak adlandıran yan ürün ve yüksek miktarda karbonhidrat, protein ve lif içermesine rağmen Türkiye'de hayvan yemi olarak kullanılmaktadır (Uzuner, 2023). Bu çalışmanın amacı, çörek otu tohumlarının yağı çıkarıldıktan sonra geriye kalan küspesinin sadece bir yan ürün olmadığını, aksine biyolojik olarak aktif bileşikler açısından zengin bir kaynak olarak değerlendirilebileceğini kanıtlamaktır.

Bilimsel literatürdeki çoğu çalışma çörek otu yağına odaklanırken, yağ çıkarıldıktan sonra elde edilen küspeyle ilgili araştırmalar hâlâ oldukça sınırlıdır. Bu araştırma sayesinde, bilimsel yöntemler kullanılarak timokinon gibi bileşiklerin nasıl en yüksek verimle elde edilebileceği incelenerek bu boşluk doldurulacaktır. Böylece, gıda ve ilaç endüstrilerinde kullanılabilecek potansiyel yeni hammaddeler ortaya çıkarılabilir. Bu çalışmanın cevap aradığı temel soru şudur: Çörek otu tohumlarının yağı çıkarıldıktan sonra geriye kalan küspesinde hangi kimyasal bileşikler bulunur ve timokinon bileşiği hangi koşullar altında en yüksek verimle elde edilebilir ?Bu soruyu yanıtlamak için aşağıdaki hipotez test edilecektir :Hipotez: Çörek otu tohumlarının yağı çıkarıldıktan sonra geriye kalan küspe, yüksek miktarda timokinon ve diğer aktif bileşikler içerir ve uygun ekstraksiyon koşulları belirlendiğinde bu bileşikler yüksek verimle elde edilebilir.

2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Çörek Otu Tohumu

Çörek otu tohumu (*Nigella sativa* L.), yüzyıllardır geleneksel tıpta yaygın olarak kullanılan, hem de modern gıda ve ilaç endüstrisinde geniş kullanım alanına sahip, biyolojik açıdan zengin bir bitki türüne aittir. *Ranunculaceae* (düğün çiçeğigiller) familyasına mensup olan bu tür tek yıllık, otsu bir bitki türüdür. Boyu 20 ile 50 cm arasında değişmekte olup, gövdesi dik, tüylü ve dallıdır. Yaprakları almaşık ve 3 parçalıdır. Bitkinin çiçekleri uzun saplı, beyaz veya açık mavi renğinde olup Haziran ve Temmuz aylarında açmaktadır. Bu bitkinin meyvesi kapsül şeklinde olup çok sayıda tohum taşımaktadır. Tohumlar yaklaşık 3 mm uzunluğunda, üç köşeli, oval formda ve bitkinin en çok değerlendirilen kısmıdır (İlisulu, 1992) .



Şekil 2.1. (a) *Nigella sativa* bitkisi(Üçler, 2023), (b) *Nigella sativa* tohumları (Dubaj).

Çizelge 2.1. Çörek otunun sistematik yeri(Tanker et al., 2004)

Bölüm	Spermatophyta (Tohumlu Bitkiler)
Altibölüm	Angiospermae (Kapalı Tohumlar)
Sınıf	Dicotyledonae (İki çenenkliler)
Takım	Ranaliz
Familya	Ranunculaceae (Düğün Çiçeğigiller)
Cins	<i>Nigella</i>
Tür	<i>Nigella sativa</i> L. (çörek otu)

Çörek otu bitkisinin kuraklığa dayanıklı olması ve düşük girdi ile yetiştirilebilmesi sayesinde farklı iklim ve toprak koşullarına uyum sağlayabilmektedir.

Bu özellikleri nedeniyle çörek otu bitkisinin tarımı, dünya genelinde Güney Avrupa, Suriye, Hindistan, Pakistan, Suudi Arabistan, Mısır ve İran gibi birçok ülkede yaygın şekilde gerçekleştirilmektedir. Türkiye'nin birçok bölgesinde, özellikle de yarı kurak iklim koşaklarında, ekonomik bir tarım bitkisi olarak değerlendirilmektedir. Türkiye'de çörek otu tarımı ağırlıklı olarak Akdeniz Bölgesi, Kuzey Anadolu ve Trakya'da gerçekleştirilmektedir (İlisulu, 1992) (Tonçer & Kızıl, 2004). Bununla birlikte, Anadolu'nun çeşitli bölgelerinde çörek otu yetiştiriciliğine yönelik artan bir ilgi söz konusudur. Özellikle Afyon, Amasya, Isparta, İstanbul, Trakya, Gaziantep, Mersin ve Kahramanmaraş çevresinde çörek otu tarımına yönelik yoğun bir faaliyet gözlemlenmektedir. Bunun yanı sıra, Kars (Tuzulca), Amasya, Gaziantep, İstanbul'un Rumeli kavağı ve Rumeli Feneri Semtleri, Kahramanmaraş, Kocaeli (Tuzla) ve Siirt gibi bölgelerde bu bitki doğal florada yabancı olarak yetişmektedir (Akgören, 2011).

2.1.1. Çörek Otu Tohumunun Biyolojik Özellikleri ve Tıbbi Kullanım Alanları

Çörek otu, eski dünya medeniyetlerinde geleneksel olarak kullanılan önemli bir baharat bitkisidir. Antik Mısır'da 1325 yılına tarihlenen Tutankhamon'un mezarında ve Mezopotamya uygarlığında çörek otu tohumlarına rastlanmış, ayrıca Roma döneminde de baharat olarak kullanıldığı tespit edilmiştir (Barkoudah, 1998). Çörek otunun antioksidan etkilerinin yanı sıra tümör oluşumunu ve iltihaplar engelleyici, bakteri çoğalmasını durdurucu ve bağışıklık sistemini güçlendirici özelliklere sahip olduğu bilinmektedir (Randhawa & Al-Ghamdi, 2002) . Ayrıca, çörek otunun biyolojik olarak aktif bileşenleri arasında ditimokinon, timokinon ve timohidrokinon bulunmaktadır. Bu bileşenler arasında asıl aktif nitrosötik madde timokinondur (Gün, 2012) . Modern tıbbın öncüsü olarak kabul edilen Hipokrat'a göre, çörek otu karaciğeri güçlendirmek ve sindirim sistemi rahatsızlıklarını gidermek amacıyla kullanılmıştır. Ayrıca Hipokrat'ın, çörek otu tohumlarını zehirli yılan ve akrep sokmalarında, eski tümörlerin tedavisinde, dolama (parmak iltihabı), cilt döküntüleri, baş bölgesi iltihapları ve grip gibi enfeksiyonlarda da kullandığı belirtilmektedir. Buna ek olarak, modern botanikğin temellerini atan isimlerden biri olarak kabul edilen Anavarzalı (Adana-Kozan) Pedanius Dioscorides'in ise, baş ve diş ağrılarını hafifletmek, burun tıkanıklığını açmak ve bağırsak parazitlerini temizlemek amacıyla çörek otu yağını kullandığı bilinmektedir.

Ünlü eseri De Materia Medica’da bitkilerin hangi bölgelerde yetiştirildiği ve ne tür faydalar sağladığı detaylı bir şekilde ele alınmıştır(Altuncu & Gıdık, 2020) . Çeşitli araştırmalar, timokinonun kanser karşıtı etkilere sahip olduğunu göstermiştir. Özellikle mide kanserine karşı hem tedavi edici hem de önleyici özellikler sergilediği belirlenmiştir (Güzelsoy et al., 2018) . Arap ve Yunan hekimleri tarafından çörek otu tohumları ve yağı; genel sağlığın korunması, yüksek ateşin düşürülmesi, soğuk algınlığının giderilmesi, baş ağrısının hafifletilmesi, romatizmal hastalıklar ve çeşitli mikrobiyal enfeksiyonların tedavisi ile bağırsak parazitlerinin vücuttan atılmasında etkili bir şekilde kullanılmıştır. Tıp tarihinde önemli bir yere sahip olan İbn-i Sina’nın meşhur eseri “El-Kanun”da, çörek otunun metabolizmayı harekete geçiren, yorgunluk ve uyuşukluğu azaltan etkilerine değinilmektedir. Aynı zamanda, bu bitkinin akciğer fonksiyonlarını geliştirdiği, sindirimi kolaylaştırdığı, toksinlerin atılımına yardımcı olduğu, yüksek ateşe karşı faydalı olduğu, soğuk algınlığı, baş ve diş ağrılarını hafiflettiği, cilt hastalıklarının tedavisinde iyileştirici etkiler gösterdiği, yara iyileşmesini hızlandırdığı ve bağırsak parazitlerinin yanı sıra yılan ve böcek sokmalarına karşı da tedavi edici amaçla kullanıldığı belirtilmiştir. Ayrıca çörek otunun yüksek besin ve enerji değerine sahip olduğu, yağının ise vücut ısını düzenleyici etkiler sunduğu ifade edilmektedir. Tohumlarının bilinen hipertansif ve hipotansif etkileri sayesinde tansiyon dengesinin sağlanmasında ve yağ metabolizması üzerindeki etkileriyle kan lipid düzeyinin düzenlenmesinde rol oynadığı bildirilmektedir. Metabolizma hızının düşüklüğü ise pek çok hastalığın altında yatan bir neden olarak değerlendirilmektedir. Vitamin ve mineral açısından oldukça zengin olan çörek otu; A, C, H, B1, B2 ve B6 vitaminleri ile folik asit ve niasin bakımından önemli bir kaynaktır (Altuncu & Gıdık, 2020) .

2.1.2. Çörek Otu Tohumunun Kimyasal Özellikleri

Çörek otu (*Nigella sativa*) bitkisinin kimyasal bileşimi; yetiştirildiği iklim, bölge, çeşit ve hasat zamanı gibi etkenlere bağlı olarak değişiklik gösterebilir (Sultan et al., 2009) . Çörek otu tohumları, karbonhidrat, yağ, protein, vitamin ve mineral yönünden zengin bir besin profiline sahiptir. Ayrıca, dokuz temel amino asitten sekizini bünyesinde bulundurması, çörek otunu değerli bir protein kaynağı haline getirmektedir (El-Tahir & Bakeet, 2006) .

El-Tahir ve Bakeet (2006) tarafından yapılan analizlere göre, çörek otu tohumlarının yaklaşık %16–20’si protein, %33–40’ı ise karbonhidrattan oluşmaktadır. Benzer şekilde, farklı araştırmalarda da çörek otu tohumlarının kimyasal bileşimi üzerine elde edilen veriler bu sonuçları desteklemektedir. Tohumların içeriğinde %35.6–41.6 oranında sabit yağ, %22.7 oranında protein, indirgen şekerler, organik asitler, tanenler, reçineler, arabik asit, ham lif, çeşitli mineraller ve biyoaktif fitosteroller bulunduğu rapor edilmiştir. Bu bileşenler, çörek otu tohumlarını hem beslenme hem de farmakolojik açıdan önemli bir bitkisel kaynak haline getirmektedir. Çörek otu (*Nigella sativa*) tohumları, yalnızca biyoaktif bileşenleriyle değil, aynı zamanda içerdiği zengin vitamin ve mineral profiliyle de dikkat çekmektedir. Bu tohumlar; β -karoten, tokoferoller (E vitamini), askorbik asit (C vitamini), tiamin (B1 vitamini), niasin (PP vitamini) ve folik asit (B9 vitamini) gibi çeşitli vitaminler açısından oldukça zengindir. Aksoy (2022) tarafından yapılan analizlere göre, 100 gram çörek otu tohumu aşağıdaki besin öğelerini içermektedir. Vitaminler: 1.529 mg B1 (tiamin), 0.5 mg B6 (piridoksin), 0.1 mg B2 (riboflavin), 5.7 mg PP (niasin), 0.061 mg B9 (folik asit), 2.7 mg all-trans retinol (A vitamini), 9.02 mg α -tokoferol ve 54.2 mg γ -tokoferol. Mineraller: 185.9 mg kalsiyum (Ca), 526.5 mg fosfor (P), 10.5 mg demir (Fe), 6 mg çinko (Zn), 1.8 mg bakır (Cu) ve 1.7 mg selenyum (Se).

Çizelge 2.2. *Nigella sativa*’nın Kimyasal içeriği (Shah & Kasturi, 2003)

Çörekotu kimyasal bileşimi	% Konsantrasyon
Su	7
Karbonhidrat	15
Protein	23
Yağa	39
Lif	21.4
Kül	4.3

Çörekotu tohumları yaklaşık %30–40 oranında ham yağ içermekte olup, bu yağın %50–60’lık kısmını doymamış yağ asitleri oluşturmaktadır. Ayrıca, tohumların yapısında %0.01–0.1 oranında alkaloit (nigellin) ve saponin (melantin) bulunduğu da rapor edilmiştir. Çörekotu yağının yağ asidi bileşimi; bitkinin çeşidi ve genetik özelliklerine, çevresel faktörlere, yağ elde etme yöntemine, tohumun olgunluk durumu, hasar görme düzeyi ve saklama koşulları gibi kalite unsurlarına, ayrıca kullanılan analiz tekniği ve ölçüm doğruluğuna bağlı olarak değişiklik gösterebilir (Cheikh-Rouhou et al., 2007). Çörekotu tohum yağlarında en baskın uçucu bileşen timokinon olmakla birlikte, ayrıca yapısında %0.5 ile %1.6 arasında değişen oranlarda karvon, karven, D-limonen, ve α -pinen gibi uçucu bileşenler de bulunmaktadır (Gharby et al., 2015). Çörekotu tohum yağı; yaklaşık, %1 oranında eikosadienoik asit, %12 palmitik asit , %24 oleik asit ve %55 linoleik asit gibi çeşitli yağ asitlerini içermektedir. Ayrıca, terpenoidler, alifatik alkoller ve doymamış hidroksi ketonlar bakımından da zengin bir bileşime sahiptir (Aksoy, 2022).

Çizelge 2.3. Çörek otu uçucu yağında bulunan kimyasal bileşenler(Muhammad et al., 2009).

Çörekotu Uçucu Yağ Bileşeni	Bileşen konsantrasyonu (%)
α - thujen	2.4
Dihidritimokinon	3.84
β -Pinen	1.72
Karvakol	10.8
Timol	2.32
Trans-anethol	2.10
p-Simen	32.02
Minör Bileşenler	23.81
α -pinen	1.48
Timokinon	23.25

Çizelge 2.4. Çörekotu yağında bulunan yağ asitlerinin bileşimi (El-Tahir & Bakeet, 2006).

Yağ asitleri	Karbon sayıları	(%)
Linolenik asit	C18:3	0.6-1.8
Araşidik asit	C20:0	2-3
Linoleik asit	C18:2	44.7-56
Oleik asit	C18:1	20.7-24.6
Palmitik asit	C16:0	12-14.3
Eikosadienoik asit	C20:1	2-2.5
Palmitoleik asit	C16:1	3
Miristik asit	C14:0	0.16
Stearik asit	C18:0	2.7-3
Steroller		0.5

Bir araştırmada, soğuk pres yöntemiyle elde edilen çörekotu yağında; linoleik asit miktarının 100 gramda (58.8 - 61.2g), oleik asit oranının (22.6 - 24.5g) ve palmitik asit düzeyinin ise (13.0 - 13.3g) arasında değiştiği tespit edilmiştir (Lutterodt et al., 2010). Çörekotu yağının yağ asidi bileşimi incelendiğinde, en yüksek oranda bulunan bileşenin linoleik asit olduğu görülmektedir. Bu çoklu doymamış yağ asidi, çörekotu yağının temel yağ asidi profiline önemli ölçüde katkı sağlar. Doymuş yağ asitleri grubuna ait olan araşidik, behenik ve lignoserik asitler ise oldukça düşük oranlarda bulunmakta, bu da çörekotu yağının genel olarak düşük doymuş yağ asidi içeriğine sahip olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, tekli doymamış yağ asitleri arasında palmitoleik ve erusik asitlerin varlığı tespit edilmiştir. Bu asitlerin oranları yüksek olmasa da, yağın besinsel ve fonksiyonel özellikleri açısından dikkate değerdir. Ayrıca, eikosenoik asidin sadece eser miktarda bulunduğu rapor edilmiştir (Atta, 2003). Bu çeşitlilik, çörekotu yağını hem sağlık açısından hem de fonksiyonel gıda bileşeni olarak değerli kalmaktadır.

2.1.3. Çörek Otu Tohumu Küspesi

Çörek otu yağı üretimi sırasında, kullanılan tohumun kimyasal bileşimi ve tercih edilen ekstraksiyon yöntemine bağlı olarak, işleme tabi tutulan çörek otu tohumlarının yaklaşık %70–80'i posa (küspesi) şeklinde geriye kalmaktadır. Bu nedenle, üretim süreci sonunda geriye kalan bu yüksek miktardaki posanın etkin ve uygun biçimde değerlendirilmesi önemli bir gereklilik olarak ortaya çıkmaktadır (Aslan, 2021). Yağı alınmış çörek otu tohumlarından geriye kalan posa, çevresel kirliliğin önlenmesi ve ekonomik katma değer sağlanması amacıyla hayvan beslenmesinde yem kaynağı olarak değerlendirilmektedir (Zent, 2019). Çörek otu yağı elde edildikten sonra geriye kalan yan ürün olan küspe, yüksek oranda protein, karbonhidrat ve lif içeriğine sahiptir. Çörek otu küspesi; kolay bulunabilirliği, düşük maliyeti, yüksek sindirilebilirliği ve zengin besin içeriği ile dikkat çekmektedir (Uzuner, 2023). Bu nedenle, çörek otu küspesinin çevresel sürdürülebilirliğe katkı sağlamak, katma değerli ürünler geliştirmek ve insan sağlığını destekleyici faydalı bileşenleri değerlendirmek gibi amaçlarla araştırılması bilimsel açıdan oldukça önem arz etmektedir. Yağlı tohumlardan yağ elde etmek amacıyla; çözücü ekstraksiyonu, mekanik presleme, enzim destekli ekstraksiyon, yüksek basınçla ekstraksiyon, distilasyon ve hidrolik pres gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır (Çakaloğlu et al., 2018). Mekanik yöntemler, genellikle yağ oranı %20'nin altında olan yağlı tohumlardan yağ elde etmek amacıyla tercih edilmekte olup, katı-sıvı fazlarının ayrılmasına dayalı bir sistem olarak tanımlanmaktadır (Zuorro, 2014). Faz ayrımının sağlanmasında genellikle basınç uygulanmakta olup, işleme sırasında sıcaklık kullanılıp kullanılmamasına bağlı olarak bu yöntem sıcak presleme ya da soğuk presleme olarak adlandırılmaktadır (Çakaloğlu et al., 2018). Çözücü bazlı ekstraksiyon yöntemleri; toksik etkileri, yüksek maliyetleri ve çevresel olumsuzlukları nedeniyle önemli dezavantajlar taşımaktadır (Çakaloğlu et al., 2018). Bu nedenle, kaliteli ham yağ elde etme isteği ile çevreye zarar vermeyen bir yöntem kullanma amacı, mekanik yöntemlerin tercih edilmesinin başlıca nedenleri arasında yer almaktadır (Richter et al., 1996). Ham maddenin soyulması, kurutulması, çözücü ya da enzimatik yöntemlerle ön işlemden geçirilmesi gibi hazırlık aşamaları ile birlikte, besleme hızı ve sıcaklık gibi işlem parametreleri, yağ verimi üzerinde belirleyici bir etkiye sahiptir (Savoire et al., 2013).

Soğuk pres yağ üretim yöntemleri; uygulama açısından basit olması, çevre dostu yapısı, düşük maliyeti, toksik organik çözücü kullanımına ihtiyaç duymaması ve yüksek kalitede ürün elde etme imkânı sunması nedeniyle tercih edilmektedir (Gürpınar et al., 2011) . Ancak bu yöntemde, ham maddeden elde edilen yağ miktarı genellikle düşüktür ve ürün kalitesinde standart bir düzeye ulaşmak zor olabilmektedir (İmer & Taşan, 2018) . Ancak bu durum soğuk pres sonucunda posada kalan fenoliklerin daha fazla olduğunu göstermektedir. Bu durum çörek otu tohumlarının soğuk presi sonucunda elde edilen posanın değerlendirilmesi gerektiğinin kanıtıdır.

2.1.3.1. Çörek Otu Küspesi ve Değerlendirilme Alanlarına Odaklanan Önceki Çalışmalar

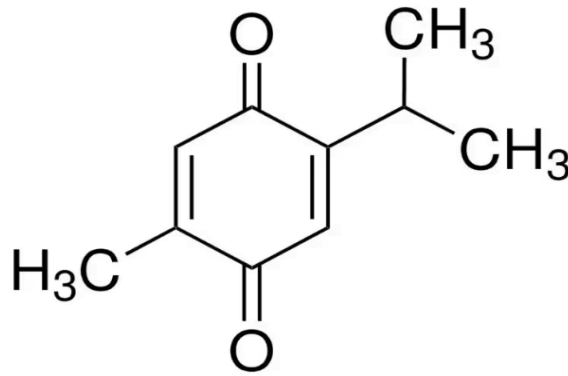
Çörek otu (*Nigella sativa*) yağı çıkarıldıktan sonra geriye kalan küspe üzerine literatürde sınırlı sayıda çalışma bulunmakla birlikte, son yıllarda bu atık biyokütlenin değerlendirilmesine yönelik çeşitli araştırmalar yapılmaktadır. Bu kapsamda, çörek otu küspesinden elde edilen proteinlerle hazırlanan sulu çözelti ve emülsiyonların model mukusla etkileşimi incelenmiş; ağız ortamını taklit eden bu sistemlerde kayganlık ve sürtünme davranışları, yani tribolojik özellikler, analiz edilmiştir (Yılmaz, 2023). Uzuner (2023), yaptığı çalışmada, soğuk pres yöntemiyle yağı alınmış çörek otu küspesinde izole protein elde edilmiştir. İzole edilen proteinlerin kimyasal bileşimi, fonksiyonel özellikleri, amino asit profili ve ekmek üretiminde kullanım potansiyeli araştırılmıştır. İlgili çalışma sonucunda Çörek otu küspesinin protein içeriği %33.87 olarak belirlenmiş, elde edilen protein izolatlarının ise %74.83 ile %77.19 arasında tespit edilmiştir. Amino asit açısından protein izolatının %33'ü temel amino asitlerden oluştuğu ve glutamik asit içeriğinin en yüksek olduğunu belirlenmiştir. Fonksiyonel özellikler açısından, köpük oluşturma, su tutma, kapasite, emülsiyon özellikleri ve çözünürlük gibi birçok parametrede olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Ekmek yapımında, çörek otu küspesi protein izolatu %5, %10, %15 oranlarında buğday ununa ilave edilerek kullanılmış, bu oranların hamur reolojik özelliklerini (stabilite, su absorpsiyonu, gelişme süresi vb) iyileştirdiği belirlenmiştir. Sanayi açısından, bu çalışmanın en önemli katkısı, çörek otu küspesinin fonksiyonel protein kaynağı olarak değerlendirilmesi ve bu kaynakların fırıncılık gibi gıda endüstrilerinde fonksiyonel katkı maddesi olarak kullanılabileceğinin gösterilmesidir.

Çörek otu ve türevleri (yağ, küspe) üzerine yapılan birçok hayvan deneyi, bu bileşenlerin çeşitli biyolojik etkiler açısından faydalı olabileceğini göstermiştir. Rasyonlara çörek otu tohumu, yağı veya küspesi ilavesi, bazı çalışmalarda ruminantlar ve diğer hayvan türlerinde günlük canlı ağırlık artışı üzerinde olumlu etkiler gösterirken, bazı durumlarda ise herhangi bir etkisi gözlemlenmemiştir (Awadalla & Gehad, 2003; El-Ekhnawy et al., 1999; Mohammed, 2007; Özçelik & Bayram, 2012). El-Ekhnawy ve ark (1999), çörek otu küspesi verilen koyunlarda kan serumunda üre düzeyinin arttığını ve bu durumun rasyondaki yüksek protein oranından kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir. İşlek Coşkun (2020) tarafından yapılan bir çalışmada, çörek otu posası Fe(III) iyonlarının giderimi için adsorban olarak kullanılmıştır (İşlek Coşkun, 2020). Adsorpsiyon verimi; pH, sıcaklık, çalkalama süresi ve adsorban miktarı gibi parametreler göz önünde bulundurularak kesikli yöntemle değerlendirilmiştir. Ayrıca, soğuk presleme yöntemiyle çörek otu yağının elde edilmesi sonrasında atık olarak ortaya çıkan posanın kozmetik endüstrisinde ve yakıt olarak değerlendirilebileceği bildirilmektedir (İşlek Coşkun, 2020). Zent (2019) tarafından yürütülen başka bir çalışmada ise çörek otu posalarından protein konsantresi üretilmiş ve bu konsantreler papain ve tripsin enzimleri ile hidrolize edilmiştir. Elde edilen peptitlerin antioksidatif ve biyoaktif özellikleri incelenmiş, özellikle hidroliz edilmemiş protein konsantresinde yüksek antioksidatif aktivite gözlemlenmiştir. Ayrıca bazı peptit fraksiyonlarında asetilkolinesteraz (AChE) inhibitör potansiyeli yüksek biyoaktif peptitlerin varlığı belirlenmiş ve bu bulgular, çörek otu proteinlerinin doğal antioksidan ve potansiyel anti-Alzheimer ajanlar olarak gıda endüstrisinde değerlendirilebileceğini göstermektedir (Zent, 2019). Benzer şekilde, Yılmaz (2019) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada da metilen mavisinin atık sulardan uzaklaştırılması amacıyla çörek otu küspesi kullanılarak geliştirilen biyosorbentin etkinliği araştırılmıştır. Bu amaçla, çörek otu küspesi kimyasal aktivasyon (farklı oranlarda $ZnCl_2$ kullanılarak) ve 800 °C'de karbonizasyon yöntemleri ile aktif karbon formuna dönüştürülmüştür. Çörek otu küspesinden elde edilen biyosorbentin, metilen mavisi gibi boyar maddelerin sulu ortamlardan uzaklaştırılmasında etkili bir adsorban olduğu ve çevre dostu bir çözüm sunduğu ortaya konmuştur (Yılmaz, 2019).

Bir diğer kimyasal aktivasyon işlemi Aslan (2021) tarafından yapılmıştır. Çörek otu küspesi, $ZnCl_2$ kimyasal aktivasyonu ile aktif karbona dönüştürülmüştür. Bu çalışmanın sonucu çörek otu küspesi, düşük maliyetli ve yüksek verimli aktif karbon üretimi için uygun bir hammadde görülmüştür (Aslan, 2021). Shahbazova (2024), posa materyalinden farklı sıcaklıklarda ve çinko oksit (ZnO) varlığında aktif karbon sentezini gerçekleştirmiş. Aktif karbonun çörek otu yağı, biberiye esansiyel yağı ve yeşil çay ekstraktı ile kombinlenerek farmasötik sabun üretiminde kullanılabilirliği araştırılmıştır. Bu çalışmanın sonucuna göre 850°C'de 1:1 oranında posa-ZnO ile en yüksek verim (%44.6) ve düşük nem (%1.89) elde edilmiştir. Üretilen sabunun pH'ı 8.67, nem içeriği %41.8 olarak ölçülmüş ve antimikrobiyal testlerde özellikle *Candida albicans* üzerinde etkili olduğu gözlemlenmiştir (MIC: 6.25 mg/mL). Çörek otu küspe ekstraktının antioksidatif, antimetastatik ve antianjiyojenik biyolojik aktivitelerini araştırmaktır. Antioksidan kapasite, DPPH ve Trolox eşdeğer antioksidan kapasitesi (TEAC) testleriyle ölçülmüştür. Küспенin antiproliferatif (hücre çoğalmasını önleyici) etkisi, hem kanserli hem de kanserli olmayan hücreler üzerinde test edilerek hücre tipine özgü etkiler incelenmiştir. Anti-anjiyojenik etkiler ise civciv koryoallantoik membran (CAM) testi ile değerlendirilmiştir. Çörek otu küspesi ekstraktı radikal süpürücü (antioksidan) etkisini korumakta ve kanser hücrelerinin çoğalmasını, sağlıklı hücrelere kıyasla daha etkili bir şekilde azalttığı, damar endotelial büyüme faktörü (VEGF) ile uyarılan damar oluşumunu önemli ölçüde engellediğini ortaya konulmuştur. İlgili çalışmadaki bulgular, çörek otu küspesinin metastatik hücrelerin baskılanması ve özellikle patolojik anjiyogenez ile ilerleyen kanser gibi hastalıkların tedavisinde kullanılabileceğini göstermiştir (Tan, 2018). Yukarıdaki çalışmalar, daha çok çörek otu küspesinin endüstriyel uygulamalarına odaklanmakta ve bu malzemenin endüstriyel atık yönetimi açısından taşıdığı önemi vurgulamaktadır. Buna karşın, bu tez çalışmasında, başta timokinon olmak üzere küspe içerisindeki çeşitli biyoaktif bileşenlerin ekstraksiyonunun optimizasyonu, antioksidatif aktivite ile toplam fenolik ve flavonoid içeriklerinin belirlenmesi amaçlanmaktadır.

2.2. Timokinon (Thq)

Timokinon, çörekotu (*Nigella sativa*) tohumlarında doğal olarak bulunan ve özellikle güçlü antioksidan özellikleriyle dikkat çeken önemli bir biyoaktif bileşiktir (Padhye et al., 2008). Kimyasal olarak 2-izopropil-5-metil-1,4-benzokinon olarak da adlandırılan bu molekül (Thq), yapısında 1,4-benzokinon halkasına 2. pozisyonundan bağlı bir izopropil grubu ile 5. pozisyonundan bağlı bir metil grubu bulundurur (Şekil 2.2). Bu yapısal özellikleri, timokinonun biyolojik aktivitelerine katkı sağlamaktadır. Moleküler formülü $C_{10}H_{16}O_2$ olan timokinon, oda sıcaklığında sarımsı renkli ve kristalize bir formda bulunur (İslam et al., 2016). Bu bileşik, son yıllarda farmakolojik etkileri nedeniyle birçok bilimsel çalışmanın odağında yer almaktadır.



Şekil 2.2. Timokinon molekülünün kimyasal yapısı (İslam et al., 2016).

Işığa maruz kalması durumunda timokinon molekül ditimokinona dönüşebildiği için uygun saklama koşullarında korunması büyük önem taşımaktadır. Hidrofobik bir bileşik olan Thq, yağ ortamında çözünmekte ve asidik ortamda kimyasal olarak kararlı bir yapı sergilemektedir (Sicker et al., 2019). Thq molekülü ilk kez 1963 yılında El-Dakhakny tarafından çörekotunun uçucu yağından izole edilmiştir. Araştırmacı, çalışmasında petrol eteri ile ekstrakte ettiği sabit yağdan buhar distilasyonu yöntemiyle uçucu yağı elde etmiş; ardından kolon kromatografisi kullanarak Thq'yi ayırıp kristallendirmiştir. Molekülün yapısını ise ultraviyole (UV) ve infrared (IR) spektroskopisiyle analiz ederek belirlemiş ve bu bileşiğin çörekotunun farmakolojik etkilerinden sorumlu olabileceğini ifade etmiştir (El-Dakhakny, 1963).

Nigella sativa türü, diğer *Nigella* türlerine kıyasla uçucu yağında belirgin şekilde yüksek oranda timokinon (Thq) içermesiyle öne çıkmaktadır. Örneğin, *Nigella damascena*, *Nigella arvensis* ve *Nigella orientalis* türlerinin uçucu yağlarında Thq oranı %0.0–0.1 arasında değişirken, *Nigella sativa*'nın uçucu yağında bu oran %30–64 arasında olabilmektedir (Edris, 2010).

2.2.1. Timokinonun Sağlık Üzerindeki Etkileri

Çörekotunun sağlığa olan olumlu etkilerinden sorumlu temel bileşen olan Thq (timokinon) molekülünün tanımlanmasından sonra, bu bileşiğin farmakolojik özelliklerine yönelik bilimsel çalışmalar önemli ölçüde artış göstermiştir. Thq'nin organizmada birçok biyolojik etki göstermesine rağmen, literatürde en fazla dikkat çeken özelliği anti-kanser potansiyeli olmuştur (Gali-Muhtasib et al., 2004). Thq'nin antikanser özelliklerinin yanı sıra, kanser tedavisinde kullanılan bazı ilaçlarla birlikte uygulandığında, bu ilaçlara bağlı bazı yan etkileri hafiflettiği tespit edilmiştir (Badary et al., 2000). Thq'nin antioksidan özellikleri sayesinde, inflamatuvar bir eklem hastalığı olan romatoid artrit tedavisinde terapötik etki gösterebildiği belirlenmiştir. Fareler üzerinde yapılan çeşitli deneysel çalışmalarda, Thq (Timokinon) adlı bileşiğin biyolojik etkileri kapsamlı biçimde araştırılmıştır. Umar ve arkadaşlarının (2012) gerçekleştirdiği bir çalışmada, 5 mg/kg dozunda uygulanan Thq'nin anlamlı düzeyde biyolojik aktivite gösterdiği ve özellikle kemik hasarını önleyici etkisinin bulunduğu belirlenmiştir. Bu bulgu, Thq'nin doku hasarına karşı potansiyel koruyucu bir ajan olabileceğini ortaya koymaktadır. Benzer şekilde, Nili-Ahmadabadi ve arkadaşları (2011) tarafından yürütülen başka bir deneysel çalışmada, Thq'nin aflatoksin kaynaklı karaciğer hasarı üzerindeki koruyucu etkileri incelenmiştir. Bilindiği üzere, aflatoksin hepatotoksik ve kanserojen özelliklere sahip bir bileşiktir. Bu çalışmada, deney farelerinden oluşan bir grup yalnızca aflatoksine maruz bırakılırken, diğer gruplara aflatoksin ile birlikte farklı dozlarda Thq uygulanmıştır. Histopatolojik analizler sonucunda, sadece aflatoksin verilen kontrol grubunda belirgin karaciğer hasarları gözlemlenirken, Thq ile tedavi edilen gruplarda bu tür hasarların oluşmadığı tespit edilmiştir. Bu durum, Thq'nin aflatoksin kaynaklı toksisiteye karşı hepatoprotektif bir etki gösterebileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, *Nigella sativa* bitkisinden elde edilen uçucu yağın mikrobiyal enfeksiyonlara karşı da etkili olduğu belirlenmiştir.

Rafati ve arkadaşlarının (2014) yaptığı bir araştırmada, bu bitkisel yağın özellikle *Staphylococcus aureus* enfeksiyonlarına karşı anti-mikrobiyal özellik gösterdiği ve uygulama süresince herhangi bir advers reaksiyon gözlenmediği rapor edilmiştir. Thq'nin antimikrobiyal özellikleri yalnızca *Staphylococcus* türleriyle sınırlı kalmayıp, ağız florasında yer alan ve çürük oluşumunda rol oynayan çeşitli karyojenik bakterilere karşı da değerlendirilmiştir. Yapılan çalışmalarda, Thq'nin *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus constellatus* ve *Gemella haemolysans* gibi bakterilere karşı sitotoksik ve antibakteriyel aktiviteler sergilediği gösterilmiştir. Bu bulgular, Thq'nin hem sistemik hem de lokal enfeksiyonlara karşı potansiyel tedavi edici ajan olarak değerlendirilebileceğini ortaya koymaktadır. Yapılan çeşitli in vitro ve in vivo çalışmalar, Timokinon (Thq)'un geniş spektrumlu antibakteriyel özelliklere sahip olduğunu ortaya koymuştur. Jrah Harzallah ve arkadaşlarının (2011) gerçekleştirdiği araştırmalarda, Thq'nin özellikle bazı patojenik bakteri türlerine karşı anlamlı düzeyde antibakteriyel etki gösterdiği belirlenmiştir. Bu bulgular, Thq'nin bakteriyel enfeksiyonlara karşı potansiyel bir tedavi ajanı olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir. Thq'nin yalnızca antimikrobiyal etkileriyle değil, aynı zamanda antiinflamatuvar özellikleriyle de dikkat çektiği görülmektedir. Taka ve arkadaşlarının (2015) yürüttüğü çalışmada, Thq'nin inflamasyona bağlı nörodejeneratif bozuklukların gelişimini geciktirdiği tespit edilmiştir. Bu durum, Thq'nin merkezi sinir sistemi hastalıklarında da koruyucu bir rol üstlenebileceğini göstermektedir. Son dönemlerde yapılan bir başka çalışmada ise, Thq'nin immün sistem hücrelerinden olan nötrofiller üzerinde baskılayıcı etkiler oluşturduğu gözlemlenmiştir. Boudiaf ve arkadaşları (2016), Thq'nin nötrofillerde granül ekzositozunu ve N-formil-metiyonil-lösil-fenilalanin (fMLP) aracılığıyla uyarılan süperoksit üretimini anlamlı biçimde inhibe ettiğini rapor etmişlerdir. Bu bulgu, Thq'nin oksidatif stres ve inflamasyon mekanizmalarını baskılayarak iltihabi hastalıkların ilerlemesini önleyebileceğine işaret etmektedir. Bu antiinflamatuvar etkileri sayesinde, Thq'nin inflamasyon temelli çeşitli hastalıkların tedavisinde terapötik potansiyele sahip umut verici bir bileşik olduğu vurgulanmaktadır. Gerek mikrobiyal enfeksiyonlar gerekse kronik inflamasyonla ilişkili bozukluklarda Thq'nin çok yönlü etkileri, bu molekülün farmakolojik açıdan değerini artırmaktadır.

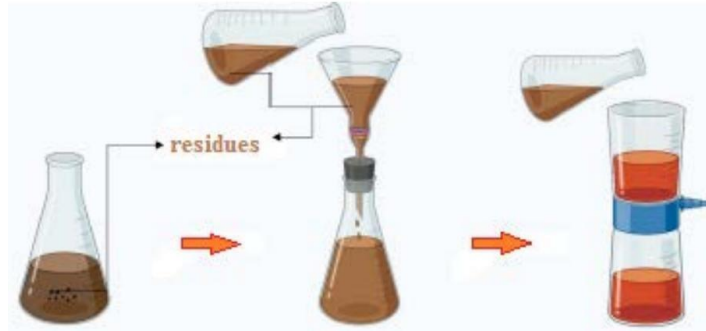
2.2.2. Timokinonun Toksik Özelliği

Timokinon (Thq) molekülünün toksisite profili üzerine yapılan çalışmalar, bu bileşiğin düşük dozlarda toksik etki göstermediğini ortaya koymaktadır. Al-Ali ve arkadaşlarının (2008) gerçekleştirdiği hayvan deneylerinde, fareler üzerinde yapılan uygulamalarda Thq'nin ortalama öldürücü doz (LD_{50}) değerleri belirlenmiştir. Buna göre, Thq'nin peritoneal enjeksiyonla uygulandığında LD_{50} değeri yaklaşık 104.7 mg/kg, oral yolla alındığında ise 870.9 mg/kg olarak tespit edilmiştir. Bu değerler, Thq'nin terapötik etkiler gösterdiği dozlarla karşılaştırıldığında oldukça yüksektir. Örneğin, antikanser ve antioksidan etkilerinin gözlemlendiği dozların, peritoneal uygulama için LD_{50} değerinin yaklaşık 10-15 kat altında, oral uygulama için ise 100-150 kat altında olduğu bildirilmiştir. Bu fark, Thq'nin terapötik pencere aralığının oldukça geniş olduğunu ve kontrollü dozlarda kullanıldığında toksisite riskinin son derece düşük olduğunu göstermektedir. Elde edilen veriler doğrultusunda, özellikle oral yolla ve önerilen doz aralıklarında uygulandığında Thq'nin güvenli bir bileşik olduğu ifade edilmektedir. Bu güvenlik profili, Thq'nin farmasötik ve nutrasötik alanlarda kullanım potansiyelini destekleyen önemli bir bulgu olarak değerlendirilmektedir.

2.3. Maserasyon Ekstraksiyon İşlemi

İnert ve aktif olmayan bitki dokularından biyoaktif bileşenlerin ayrılmasını sağlayan tüm işlem basamaklarına ekstraksiyon denir. Biyoaktif bileşenleri elde etmek için çeşitli aşamalara ihtiyaç vardır. İlk olarak öğütülmüş katı örnek, uygun çözücü ile karıştırılır ve çözücü, numunenin yapısına nüfuz eder. Son aşamada çözünmüş maddeler çözücü içerisine geçer. Bu aşamalar dikkatle incelendiğinde, kütlenin çözünürlüğünü ve transfer hızını artıran her faktör ekstraksiyon kalitesini yükseltmektedir (Oprescu et al., 2022). Bitkisel ekstraktlar, yapraklar, çiçekler, kökler, gövdeler, tohumlar, meyveler veya kabuklar gibi otsu ve odunsu bitkilerin çeşitli bölümlerinden ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak elde edilen aktif bileşenleri veya bu bileşenlerin toplamını ifade eder (Radošević et al., 2015). Bilimsel çalışmalarda kaliteli ve kantitatif sonuçlar elde etmek için örneklerin ekstraksiyon yöntemlerinin değerlendirilmesi kritik öneme sahiptir.

Ekstraksiyon işlemi, bilimsel çalışmanın ilk aşamasını oluşturduğundan, araştırmanın nihai sonucunu büyük ölçüde etkilemektedir. Bu nedenle, mevcut ekstraksiyon yöntemleri arasında en uygun olanının seçilmesi, en iyi verilerin elde edilmesini kolaylaştıracaktır. Zaman içerisinde, gıdalardaki istenilen bileşenlerin ekstraksiyonu için çok çeşitli yöntemler geliştirilmiştir (Fu et al., 2021). Otsu ve odunsu bitkilerde bulunan flavonoid ve fenolik bileşiklerin ekstraktları, farklı ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak elde edilebilir. Farklı ekstraksiyon yöntemleri arasında en uygun yöntemin seçiminde, bitkinin kimyasal yapısı, bileşen miktarlarının değişkenliği, matrikslerin heterojenliği ve bileşenlerin polaritesi gibi birçok faktör dikkate alınmaktadır (Azmir et al., 2013). Başarılı bir ekstraksiyon işlemi gerçekleştirmek için daha ekonomik, uygulanabilirliği kolay, hızlı ve çevre dostu yöntemlerin seçilmesi ve hedeflenen biyoaktif bileşenlerin yüksek verimlilikle elde edilmesi gerekmektedir. Bu doğrultuda, gelişen teknolojiyle paralel olarak çözücü seçimi ve numune hazırlama gibi yöntemlerde çeşitli ilerlemeler kaydedilmiştir (Pawliszyn, 2003). Basınçlı sıvı ekstraksiyonu, süperkritik akışkan ekstraksiyonu, ultrasonik destekli ekstraksiyon ve mikrodalga destekli ekstraksiyon gibi bazı modern ekstraksiyon yöntemleri, biyoaktif bileşenlerin elde edilmesinde çeşitli avantajlara sahiptir. Ekstraksiyon sürecinin etkinliğini etkileyen temel parametreler; sıcaklık, zaman, çözücü türü, pH, partikül boyutu ve katı-sıvı oranı şeklindedir. Ekstraksiyon yöntemleri genel olarak klasik (geleneksel) yöntemler ve modern yöntemler olmak üzere iki farklı grupta değerlendirilmektedir (Calinescu et al., 2021). Masereasyon yöntemi, basit bir ekstraksiyon yöntemi olup, otsu veya odunsu bitki örneklerinin küçük parçalara ayrılması ve uygun bir çözücü ile birlikte bir kaba alınması esasına dayanır. Hazırlanan bu karışım, istenen süre ve sıcaklığa bağlı olarak oda sıcaklığında ya da inkübatörde bekletilebilir. Belirlenen sürenin sonunda ekstraksiyon işlemi, süzme (filtrasyon) ile tamamlanır. Masereasyon işleminin daha etkili sonuçlar vermesi için, karışımın bulunduğu kabın zaman zaman çalkalanması, çözücünün bitki örneğine daha iyi nüfuz etmesini sağlar (Zhang et al., 2018). Başka bir deyişle, maserasyon süreci üç temel aşamadan oluşmaktadır (Çopuroğlu, 2013): İlk olarak, örnek ile çözücü karıştırılır ve genellikle oda sıcaklığında belirli bir süre boyunca bekletilir. Daha sonra, karışımdan sıvı faz süzülerek ayrılır. Son aşamada ise, elde edilen sıvı daha berrak bir forma ulaşacak şekilde tekrar filtre edilir (şekil 2.3).



Şekil 2.3. Maserasyon (Kumar et al., 2023).

Masereasyon yöntemiyle polifenoller, flavonoidler, alkaloidler, tanenler, kumarinler, terpenoidler, polipeptitler, glikozitler, steroidler, kinonlar ve saponinler gibi çeşitli fitokimyasallar elde edilebilmektedir (Sasikala & Sundaraganapathy, 2017). Bitkilerden maserasyon yöntemiyle elde edilebilecek biyoaktif bileşenler, kullanılan çözücüye bağlı olarak farklılık gösterebilir. Örneğin, etanol çözücüsü ile glikozitler, alkaloidler ve karbonhidratlar; su bazlı çözücü ile terpenoidler, alkaloidler, glikozitler ve karbonhidratlar; metanol ile ise fenolik bileşikler, flavonoidler, tanenler, glikozitler ve amino asitler elde edilebilmektedir (Abegunde & Ayodele-Oduola, 2015). Diğer ekstraksiyon yöntemlerinde olduğu gibi, maserasyon yönteminin de hem avantajlı hem de dezavantajlı yönleri bulunmaktadır. Uygulama kolaylığı ve basit deneysel tasarımı, bu yöntemin olumlu yönleri arasında yer alır. Ancak, ekstraksiyon süresinin uzun olması ve verimliliğin düşük kalması önemli dezavantajlardır. Ayrıca, maserasyon yöntemi genellikle ısıya dayanıklı bileşenler içeren örnekler için uygundur (Handa et al., 2008). Bu bilgiler doğrultusunda, maserasyon yönteminin uygun çözücü seçimiyle birlikte biyoaktif bileşenlerin etkin bir şekilde ekstrakte edilmesinde önemli bir potansiyele sahip olduğu söylenebilir. Nitekim, Karaoğlu ve ark. (2025) tarafından yapılan güncel bir çalışmada, farklı çözücü polariteleriyle uygulanan maserasyon tekniğinin, trüf mantarlarından yüksek düzeyde fenolik, flavonoid ve antioksidan bileşiklerin elde edilmesini sağladığı gösterilmiştir. Bu sonuçlar, literatürde belirtilen uygunluk koşullarını destekler niteliktedir ve maserasyon yönteminin hâlen geçerliliğini koruyan etkili bir ekstraksiyon yöntemi olduğunu ortaya koymaktadır (Karaoğlu et al., 2025).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

Çalışmada kullanılan soğuk pres yöntemiyle elde edilmiş çörek otu tohumu küspesi, Şanlıurfa ilindeki yerel pazardan kuru halde temin edilmiştir. Çörek otu tohumu küspesinin öğütülmesi için LAVİON HC-100 marka öğütücü kullanılmıştır. Ekstraksiyon işleminde %96 saflıkta etanol, %99.5 saflıkta etil asetat, hekzan ve metanol (Amasya Şeker / Türkiye) kullanılmıştır. Farklı sekonder metabolit analizleri ve antioksidan aktivite değerlendirmelerinde kullanılan reaktifler aşağıda belirtilen şekilde temin edilmiştir: Folin–Ciocalteu reaktifi (FCR), sodyum karbonat, alüminyum klorür, sodyum nitrit, sodyum hidroksit, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) diamonyum tuzu (ABTS), potasyum persülfat, neokuproin, trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit), gallik asit ve kuersetin, Sigma-Aldrich'ten (St. Louis, Missouri, ABD) temin edilmiştir. Bakır (II) klorür dihidrat ve amonyum asetat, Merck'ten (Darmstadt, Almanya) sağlanmıştır. Antioksidan aktivite, TFM ve TF analizlerinde SHIMADZU UV-1280 UV-VIS spektrofotometre, fenolik kompozisyon analizinde ise Shimadzu LC-MS/MS-8030 cihazı kullanılmıştır. Çalışmada veri analizi ve deneysel tasarım için Design-Expert 7 yazılım programı kullanılmıştır.

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Çörek Otu Tohumun Küspesine Uygulanan Ön İşlemler

Piyasadan temin edilen çörek otu tohum küspesi numunesi, soğuk pres yöntemiyle elde edilmiştir. Numune, Lavion marka HC-100 model öğütme makinesi kullanılarak toz haline getirilmiş ve Şekil 3.1'de gösterilmiştir. Öğütme işlemi sonrasında, ekstraksiyon işlemine hazır hale gelen toz numune, oda sıcaklığında uygun koşullarda muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.1. Öğütülerek toz haline getirilen çörek otu tohum küspesi

3.2.2. Rutubet Tayini

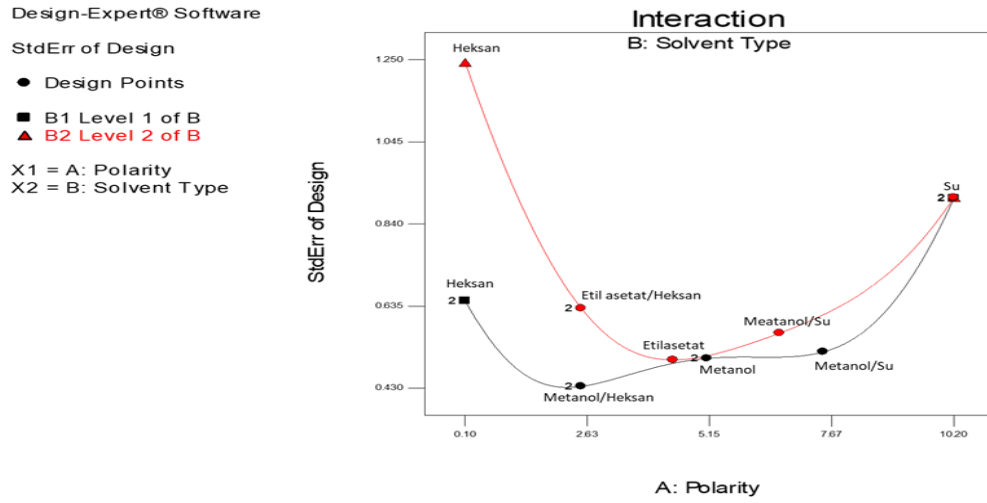
Çörek otu (*Nigella sativa*) küspesinin rutubet miktarı, klasik gravimetrik yöntemle belirlenmiştir. Numuneler, daha önce kurutulmuş ve tartılmış beherlerde etüve yerleştirilmiş; 105 °C sıcaklıkta 5 saat boyunca kurutulmuştur. Kurutma işlemi sonunda numuneler deksikatörde oda sıcaklığında soğutulmuş ve yeniden tartılmıştır. Başlangıç ve son tartımlar arasındaki fark esas alınarak rutubet oranı hesaplanmıştır. Uygulanan bu yöntem sonucunda çörek otu küspesinin nem içeriği %3.347 olarak tespit edilmiştir. Elde edilen bu değer, literatürde bildirilen çörek otu küspesi rutubet oranları ile uyumludur.

3.2.3. Çörek Otu Küspesinin Maserasyon Yöntemi ile Ekstraksiyonu

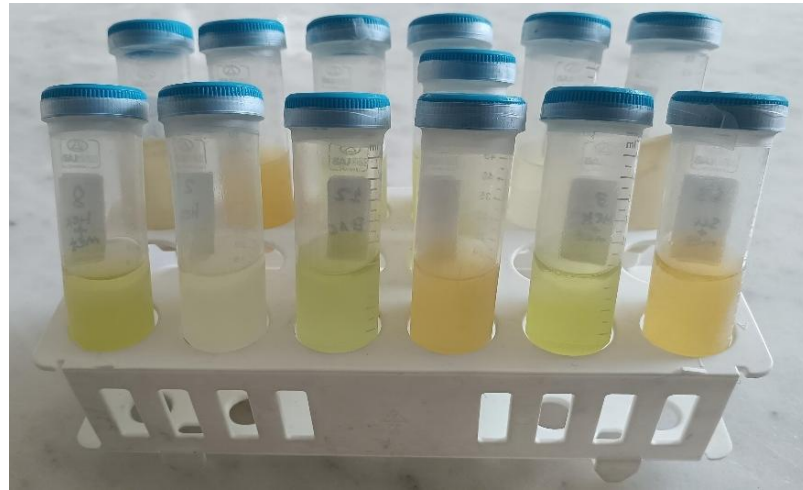
Maserasyon yönteminde, toz haline getirilen çörek otu tohum küspesinden 2 gram tartılarak üzerine 25 ml çözücü eklenmiştir. Numune, ağzı kapalı şekilde karanlık ve oda sıcaklığı koşullarında 24 saat boyunca bekletilmiştir. Çalışmada, farklı polaritelere sahip saf su, metanol, hekzan ve etil asetat çözücü olarak kullanılmıştır. 24 saatlik inkübasyon süresinin sonunda, çörek otu küspesinden elde edilen ekstraktlar, kaba filtre kağıdı yardımıyla süzölmüştür.

Çizelge 3.1. Çörek otu küspesinin maserasyon reçetesi.

DN	A:polarite	Faktör	Brix	Ekstre verimi (%)
		B: Çözücü Türü		
1	0.1	Hekzan	1.19	19.76
2	0.1	Hekzan	1.32	18.22
3	2.5	Hekzan/Metanol	2.87	22.965
4	7.5	Saf su/Metanol	1.47	18.165
5	10.2	Safsu	1.99	20.58
6	5.1	Metanol	2.29	27.96
7	5.1	Metanol	2.46	24.145
8	2.5	Hekzan/Metanol	2.91	21.62
9	2.5	Etilasetat/Hekzan	1.82	18.75
10	2.5	Etilasetat/Hekzan	1.64	16.335
11	10.2	Safsu	1.68	16.435
12	4.4	Etilasetat	1.52	17.8
13	6.6	Saf su/Metanol	0.89	16.255



Şekil 3.2. Maserasyon ekstraksiyonu için RSM ile deneysel tasarımı



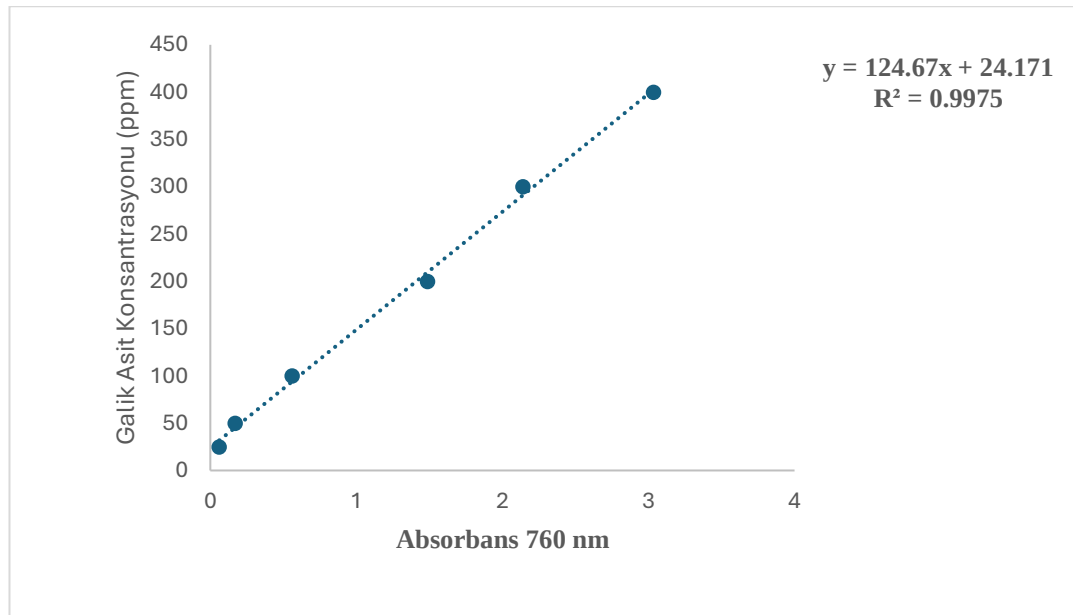
Şekil 3.3. Çörek otu tohum küspesinin maserasyon yöntemi ile ekstraksiyon işlemi.

3.2.4. Ekstraksiyon Verim Analizi

Ekstraksiyon verim hesaplaması toplam kuru madde tayini sonucuna göre ve çörek otu tohum küspesindeki rutubet miktarı da göz önünde bulundurularak yapılmıştır. Toplam kuru madde tayini için etüvde kurutma yöntemi kullanılmıştır. Sonuçlar yüzde kuru madde olarak verilmiştir.

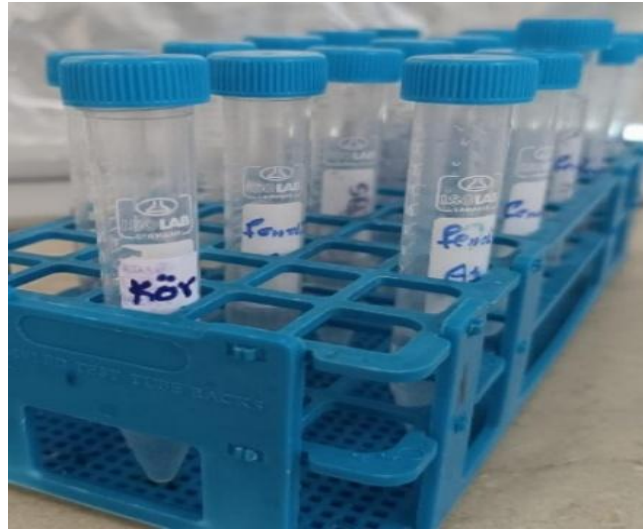
3.2.5. Çörek Otu Küspesinde Toplam Fenolik Madde Miktarı Analizi (TFM)

Fenolik bileşikler, bitkisel organizmalarda yaygın olarak bulunan ve aromatik yapıya sahip ikincil metabolitlerdir. Bu bileşiklerin gıdalarda doğal antimikrobiyal ajanlar olarak görev yapabildikleri, raf ömrünü uzatabildikleri ve patojenik mikroorganizmaların gelişimini engelleyebildiklerini bildirilmektedir. Ayrıca, serbest radikalleri etkisiz hale getirme, antioksidan ve anti-mutajenik etki gösterme gibi çeşitli biyolojik aktivitelere sahip oldukları da literatürde yer almaktadır (Cevallos-Casals et al., 2006; Ozcan et al., 2014; Proestos & Komaitis, 2008). Bu nedenle, çalışmada kullanılan çörek otu tohum küspesinin ekstraktların fenolik bileşik içeriklerinin belirlenmesi amacıyla toplam fenolik madde analizi gerçekleştirildi. Analiz, ilk olarak Singleton ve Rossi (1965) tarafından geliştirilen ve Liet tarafından modifiye edilen spektrofotometrik yöntem doğrultusunda yürütüldü. Ölçümler, gallik asit eşdeğeri (GAE) cinsinden değerlendirilmiş ve bu kapsamda çeşitli konsantrasyonlarda gallik asit çözeltileri hazırlanarak absorbans değerleri kaydedildi. Elde edilen verilerle oluşturulan kalibrasyon eğrisinin regresyon katsayısının 0.99'un üzerinde olduğu ve yüksek düzeyde lineerlik sergilediği tespit edildi.



Şekil 3.4. TFM analizi için oluşturulan Gallik asit kalibrasyon eğrisi.

Çörek otu tohum küspesinin ekstrelerinin toplam fenolik madde analizi için 0.4ml ekstraktan kullanıldı. Çörek otu tohum küspesinin ekstrelerin toplam fenolik madde miktarını belirlemek için Folin & Ciocalteu reaktifi 1:9 oranında saf su eklenerek seyreltildi ve %7.5'lik Na_2CO_3 çözeltisi hazırlandı. Deney tüplerine analiz için 0.4 ml numune örneği ilave edildi. Üzerine 2ml Folin ve 1.6ml Na_2CO_3 çözeltisi eklendi vortex ile karıştırıldı. Oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 1 saat süre boyunca bekletildi. Bir saatlik bekleme süresinden sonra SHIMADZU UV-1280 UV-VIS model spektrofotometrede 765nm dalga boyunda absorbansı ölçüldü. Analizler Şekil 3.5'te gösterildiği tekerrülü olarak uygulanmıştır.

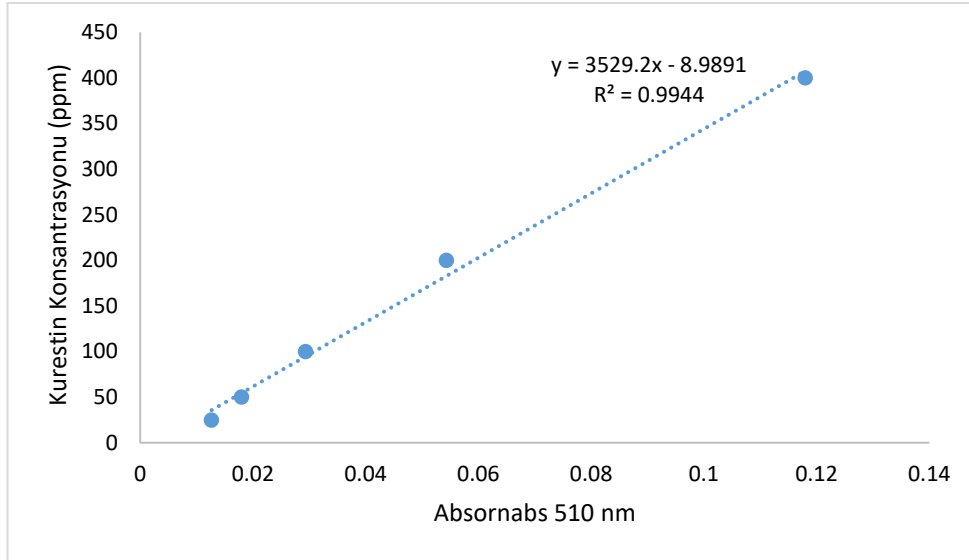


Şekil 3.5. Çörek otu tohum küspesi ekstrelerinin toplam fenolik madde miktarının (TFM) analizi.

3.2.6. Çörek Otu Küspesinde Toplam Flavanoid Miktarı Analizi (TF)

Flavonoidlerin yalnızca antioksidan özellikler taşımadığı, aynı zamanda antiviral, antibakteriyel, antiinflamatuvar, vazodilatör, antikanser ve antiiskemik gibi birçok biyolojik aktiviteye de sahip oldukları literatürde bildirilmiştir (Procházková et al., 2011). Bu doğrultuda, çörek otu tohum küspesinden elde edilen ekstratlar ile bunların enkapsüle formlarındaki flavonoid bileşik içeriğini belirlemek amacıyla Zhishen ve ark. (1999) tarafından geliştirilen yöntem esas alınarak analizler gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizlerde, Çörek otu tohum küspesi ekstraktının toplam flavonoid madde (TFM) miktarının tayininde referans madde olarak kuersetin kullanılmıştır.

Farklı konsantrasyonlardaki kuersetin çözeltilerinin absorbensları ölçülerek kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Elde edilen kalibrasyon eğrisinin regresyon katsayısının 0.99'un üzerinde olduğu ve doğrusal bir ilişki gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Toplam flavanoid madde (TF) analizi için oluşturulan Quercetin kalibrasyon eğrisi

Çörek otu tohum küspesi ekstraterinin toplam flavanoid miktarını tespit etmek için 1 mL'lik örnek alınarak analiz prosedürü uygulanmıştır. Çörek otu tohum küspesi ekstresinde bulunan flavonoid miktarının tayini amacıyla analizler, belirli reaktif çözeltiler kullanılarak gerçekleştirildi. Bu kapsamda %5'lik NaNO₂, %10'luk AlCl₃ ve 1 M NaOH çözeltileri önceden hazırlandı. Deney tüplerine 1 mL örnek (ekstre) ilave edildi, ardından 4 mL saf su eklenerek vortex cihazında homojen bir şekilde karıştırıldı. Daha sonra tüplere sırasıyla 0.3 mL %5'lik NaNO₂ ve 0.3 mL %10'luk AlCl₃ çözeltileri eklendi, karışım tekrar vortexlendi ve 5 dakika süreyle bekletildi. Bu sürenin ardından 2 mL 1 M NaOH çözeltisi ilave edildi ve karışım oda sıcaklığında 6 dakika bekletildi. Son olarak, tüplerin hacmi saf su ile 10 mL'ye tamamlandı. Her örnek üç paralel olacak şekilde hazırlandı (Şekil 3.7) ve absorbens değerleri, SHIMADZU UV-1280 UV-VIS model spektrofotometrede 510 nm dalga boyunda ölçüldü.

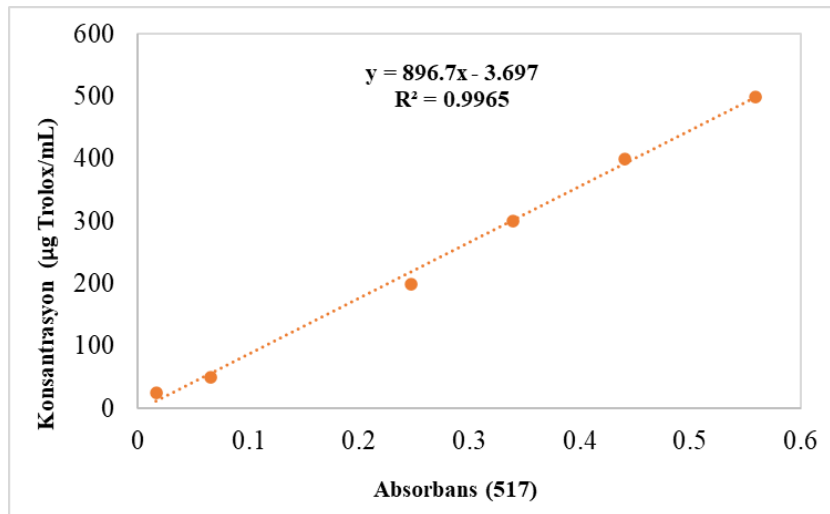


Şekil 3.7. Çörek otu tohum küspesi ekstresinin flavonoid analizi

3.2.7. Çörek Otu Küspesinde Antioksidan Analizi

3.2.7.1. DPPH ile Antioksidant Madde Analizi

Antioksidanlar, serbest radikallerin neden olduğu oksidatif stres sonucu oluşan hücresel hasarı engelleyebilen, fenolik ve flavonoid bileşikler de içeren biyoaktif bileşenlerdir (Wada & Ou, 2002). Bu özelliklerinden dolayı, çörek otu tohum küspesi ekstresinde antioksidan aktivitenin varlığı incelendi ve bu kapsamda gerekli analizler gerçekleştirildi. Çalışmada antioksidan madde tayini, Brand ve ark. (1995) tarafından geliştirilen metoda göre uygulandı. Uygulanan yöntem, hidrojen atomu bağışlayabilen bir bileşiğin DPPH içeren bir çözeltiyle tepkimeye girmesi sonucunda, DPPH radikalinin indirgenmesi ve buna bağlı olarak çözeltinin renginde meydana gelen açılma prensibine dayanmaktadır.



Şekil 3.8. DPPH analizi için Trolox kalibrasyon eğrisi

Analizlere başlanmadan önce DPPH radikali içeren stok çözelti hazırlandı. Numunenin DPPH radikalini süpürme kapasitesinin konsantrasyona bağlı olarak artış gösterdiği dikkate alınarak, farklı konsantrasyonlarda ön denemeler yapıldı ve minimum etki ile lineer artış gösteren konsantrasyon aralıkları tespit edildi. Bu doğrultuda, çörek otu tohum küspesi ekstraterinden üç farklı konsantrasyonda hazırlanan örnekler deney tüplerine alındı ve her tüp 4 mL'lik son hacme DPPH çözeltisi ile tamamlandı. Hazırlanan tüpler vortex cihazı ile homojen bir şekilde karıştırıldı (Şekil 3.9) ve oda sıcaklığında, karanlık koşullarda 30 dakika süreyle inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin ardından, her bir numunenin absorbans değeri SHIMADZU UV-1280 UV-VIS spektrofotometresinde 517 nm dalga boyunda ölçüldü. Elde edilen veriler yüzdelik süpürme etkinliği olarak hesaplandı, ardından bu değerlere ait doğrusal grafikler çizilerek regresyon eğrileri ve R^2 korelasyon katsayıları belirlendi.

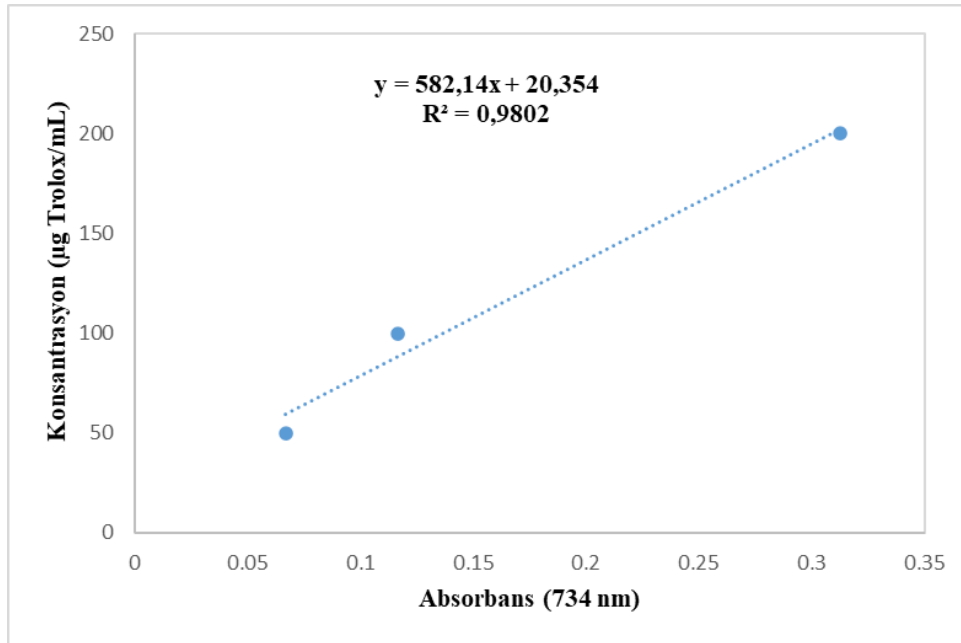


Şekil 3.9. Çörek otu tohum küspesi ekstresinin DPPH % inhibisyon antioksidan aktivite analizi

3.2.7.2. ABTS ile Antioksidant Madde Analizi

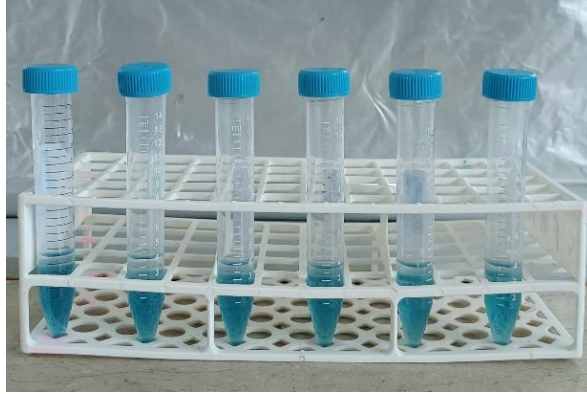
Katyon radikali süpürme aktivite analizi Re ve arkadaşları (1999) tarafından geliştirilen yönteme uygun olarak gerçekleştirildi. 7 M ABTS+ katyonu sulu çözeltisi ile suda çözünmüş 0.00245 M potasyum persülfat ($K_2S_2O_8$) karıştırıldı. Ardından hazırlanan karışım oda sıcaklığında, karanlık bir ortamda 12 saat süreyle reaksiyona bırakıldı.

ABTS⁺ çözeltisini kullanmadan önce hazırlanan ABTS⁺ çözeltisinin absorbansı 734 nm dalga boyunda spektrofotometre ile ölçülerek, değer 0.708 ± 0.025 olacak şekilde etanol ile seyreltilti. Analiz sonuçlarının trolox olarak ifade edilebilmesi amacıyla Trolox referansının 50 ppm, 100 ppm ve 200 ppm konsantrasyonlarında çözeltileri hazırlandı ve absorbansları ölçülmektedir. Absorbans ve konsantrasyon değerleri kullanılarak kalibrasyon eğrisi oluşturuldu; elde edilen regresyon katsayısının 0,98'in üzerinde olması, verilerin son derece yüksek bir doğrusal ilişki sergilediğini gösterdi.



Şekil 3.10. ABTS analizi için Trolox kalibrasyon eğrisi

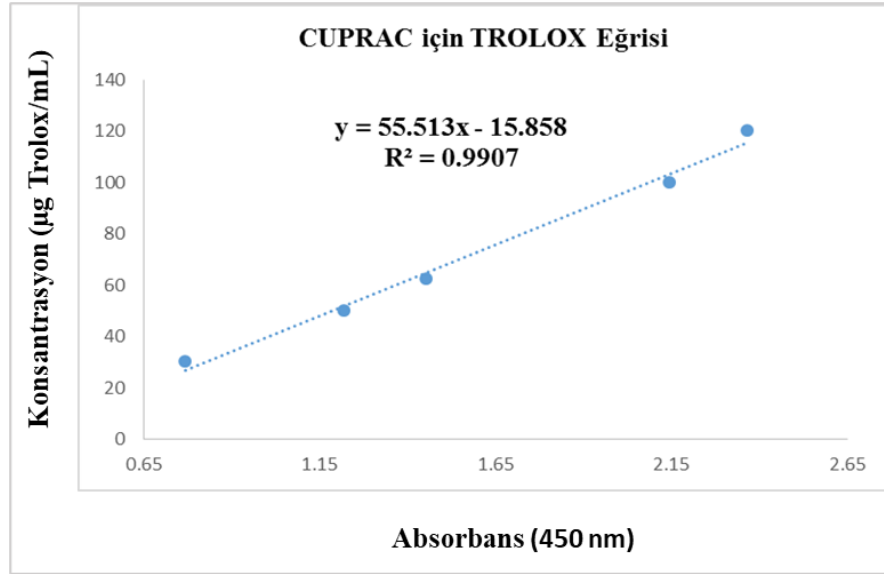
Çörek otu tohum küspesi ekstraktlarının ABTS⁺ radikal süpürme kapasitesini belirlemek için öncelikle farklı konsantrasyonlardaki örneklerin radikal süpürme aktiviteleri değerlendirilmiş ve konsantrasyon ile doğru orantılı olarak lineer artış gösteren seviyeler tespit edilmiştir. Belirlenen üç farklı konsantrasyon, analiz amacıyla deney tüplerine aktarılmış ve her bir tüp, toplam hacim 4ml olacak şekilde ABTS⁺ çözeltisi ile tamamlandı. Hazırlanan karışımlar oda sıcaklığında, karanlık koşullarda 10 dakika inkübasyona bırakıldı Şekil (3.11). Her bir örnek üç paralel olarak çalışıldı. Süre sonunda numunelerin absorbans değerleri Shimadzu UV-1800 UV-VIS spektrofotometre cihazında 734 nm dalga boyunda ölçüldü. Elde edilen sonuçlar, Trolox eşdeğeri olarak hesaplandı ve doğrusal grafikler çizilerek R² değeri hesaplandı.



Şekil 3.11. ABTS yöntemi ile antioksidan kapasite analizi

3.2.7.3. CUPRAC ile Antioksidan Madde Analizi

Apak ve meslektaşları tarafından 2004 yılında geliştirilen CUPRAC yöntemi, antioksidan kapasitenin belirlenmesinde kullanılan etkili bir tekniktir. Bu yöntem, hem hidrofilik hem de lipofilik özellikteki antioksidan bileşiklere duyarlıdır ve temel olarak Cu(II)-neokuproin (Nc) kompleksine dayanır. Literatürde “CUPric Reducing Antioxidant Capacity” yani bakır(II) iyonunun indirgenmesi esasına dayanan bu analiz, Cu(II) iyonlarının Cu(I)-Nc kompleksine indirgenmesi sırasında oluşan koyu sarı renk değişimine ve bu kompleksin 450 nm dalga boyunda maksimum absorbanans göstermesine dayanır. Deneysel işlemler için 1.0×10^{-2} M konsantrasyonda $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi saf su ile hazırlanmıştır. Ayrıca, 1 M amonyum asetat ve 7.5×10^{-3} M neokuproin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin) çözeltileri de hazırlanarak reaksiyonda kullanılmıştır.



Şekil 3.12. CUPRAC için oluşturulan Trolox kalibrasyon eğrisi

CUPRAC yöntemi ile antioksidan kapasite analizinde, ekstraler 1000 ppm konsantrasyona seyreltilerek hazırlandı. Her bir numune için üç paralel analiz gerçekleştirildi. Seyreltilen numunelerden 1,1 ml ölçülüp deney tüplerine aktarıldı. Ardından, sırasıyla 1 ml 1.0×10^{-2} M $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi, 1 ml 1 M amonyum asetat çözeltisi ve 1 ml 7.5×10^{-3} M neokuproin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin) çözeltisi eklendi. Deney tüpleri vorteks cihazı kullanılarak iyice karıştırıldı ve ardından 30 dakika boyunca oda sıcaklığında, karanlık bir ortamda bekletildi. Numunelerin absorbans değerleri, Shimadzu UV-1800 UV-VIS spektrofotometresi ile 450 nm dalga boyunda ölçüldü. Elde edilen sonuçlar, Trolox eşdeğeri cinsinden hesaplanarak değerlendirildi.



Şekil 3.13. CUPRAC yöntemi ile çörek otu kúspe ekstresinin antioksidan madde analizi

3.2.8. Çörek Otu Küspesinin Ekstraktının LC-MS/MS ile Fenolik Kompozisyon Analizi

Çörek otu tohumun küspesinin fenolik bileşim analizi Sıvı Kromatografi/Kütle Spektrofotometresi (LC-MS/MS) ile gerçekleştirildi. Fenolik bileşik, iki LC-20ADXR pompası, bir CTO-10ASVP kolon fırını ve bir SIL-20ACXR otomatik enjektörü olan çift MS cihazına bağlı Shimadzu LC-MS/MS-8030 kullanılarak kantifize edildi. Ayırma, 40-75°C'de bir C-18 SUPELCO discovery (5 cm x 2.1 mm, 5 µm) analitik kolonunda gerçekleştirildi. Elüsyon, 0.4 mL/dakika akış hızında %0.1 Formik asit, %20 su ve %80 metanol (A) ve %0.1 Formik asit, %20 metanol ve %80 su (B) çözeltileri mobil faz olarak kullanılarak gradyan mod uygulaması sonucunda gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.2 LC-MS/MS analizi için gradyan mod uygulaması

zaman	Komut	Derişim(%)
2.50	Pompa B	100
4.00	Pumpa B	40
7.00	Pumpa B	40
7.01	Pumpa B	20
8.00	Pumpa B	20
9.00	Pumpa B	100
15.00	-	-

3.2.9. İstatistiksel Analiz

Bu çalışmada istatistiksel analiz, Design-Expert 7.0 (Stat-EASE Inc., Minneapolis, MN) yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Matematiksel modelleme ve optimizasyon (MMO) işlemleri için deneysel tasarım, yazılımın Response Surface Methodology (RSM) özelliği kullanılarak oluşturulmuştur. Ekstraksiyon deneylerinden elde edilen veriler (bağımlı değişkenler) ile uygulanan işlem koşulları (bağımsız değişkenler) arasındaki ilişki, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) istatistiksel yöntemi ile değerlendirilmiştir. Bağımlı ve bağımsız değişkenler arasındaki bu ilişki, aşağıdaki ikinci dereceden çok değişkenli regresyon denklemi ile modellenmiştir:

$$(\Omega) = \Omega_0 + \sum_{i=0}^n \Omega_i X_i + \sum_{i=0}^n \Omega_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n \Omega_{ij} X_i X_j$$

Bu denklemde

Ω : öngörülen yanıt,

Ω_0 : sabit terim (kesişim katsayısı),

Ω_i : doğrusal katsayılar,

Ω_{ii} : ikinci dereceden katsayılar,

Ω_{ij} : çapraz etkileşim katsayıları,

X_i ve X_j : bağımsız değişkenlerin kodlanmış seviyeleridir.

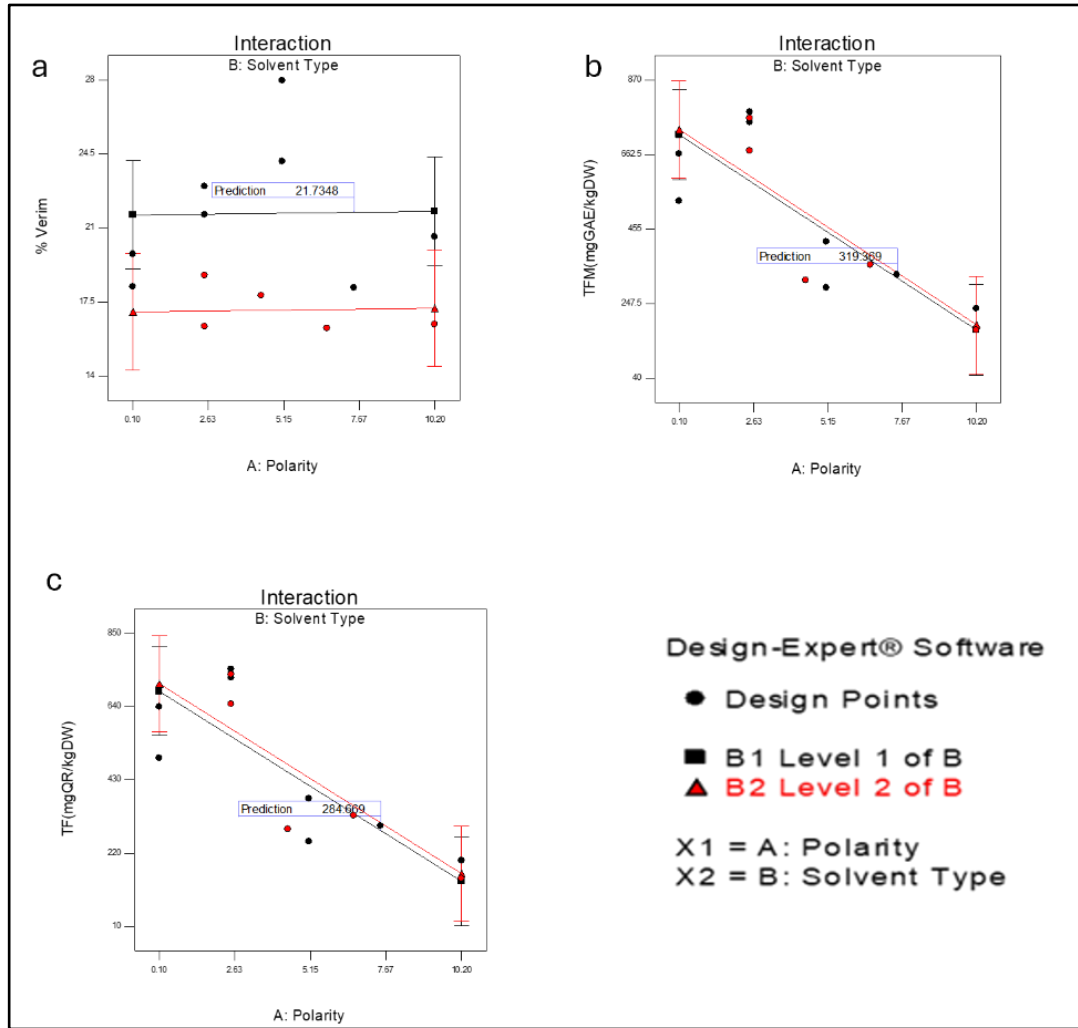
Modelin uygunluğu ve anlamlılığı; deneysel R^2 (R^2_{exp}), düzeltilmiş R^2 (R^2_{adj}), uyumsuzluk analizi (lack of fit) ve F değeri gibi istatistiksel kriterler doğrultusunda değerlendirilmiştir. Ayrıca, bağımsız değişkenlerin hem bireysel hem de etkileşimli olarak bağımlı değişken üzerindeki etkileri kantitatif olarak incelenmiştir.

Son olarak, elde edilen modele dayalı olarak optimum analiz çıktıları için optimum işlem koşulları belirlenmiş ve optimizasyon gerçekleştirilmiştir (Karaogul & Nedjip, 2025; Myers et al., 2016) .

4. BULGULAR

4.1. Çörek Otu Tohum Küspesinin Ekstraksiyonunda Polarite ve Çözücü Türünün % Verim, Toplam Fenolik Madde ve Toplam Flavonoid Madde Üzerine Etkisi

Çörek otu küspesinin maserasyon ekstraksiyon işleminde polarite değerinin ve çözücü türünün % verim, toplam fenolik madde ve toplam flavonoid içeriği üzerine etkisi şekil 4.1’de verilmiştir.



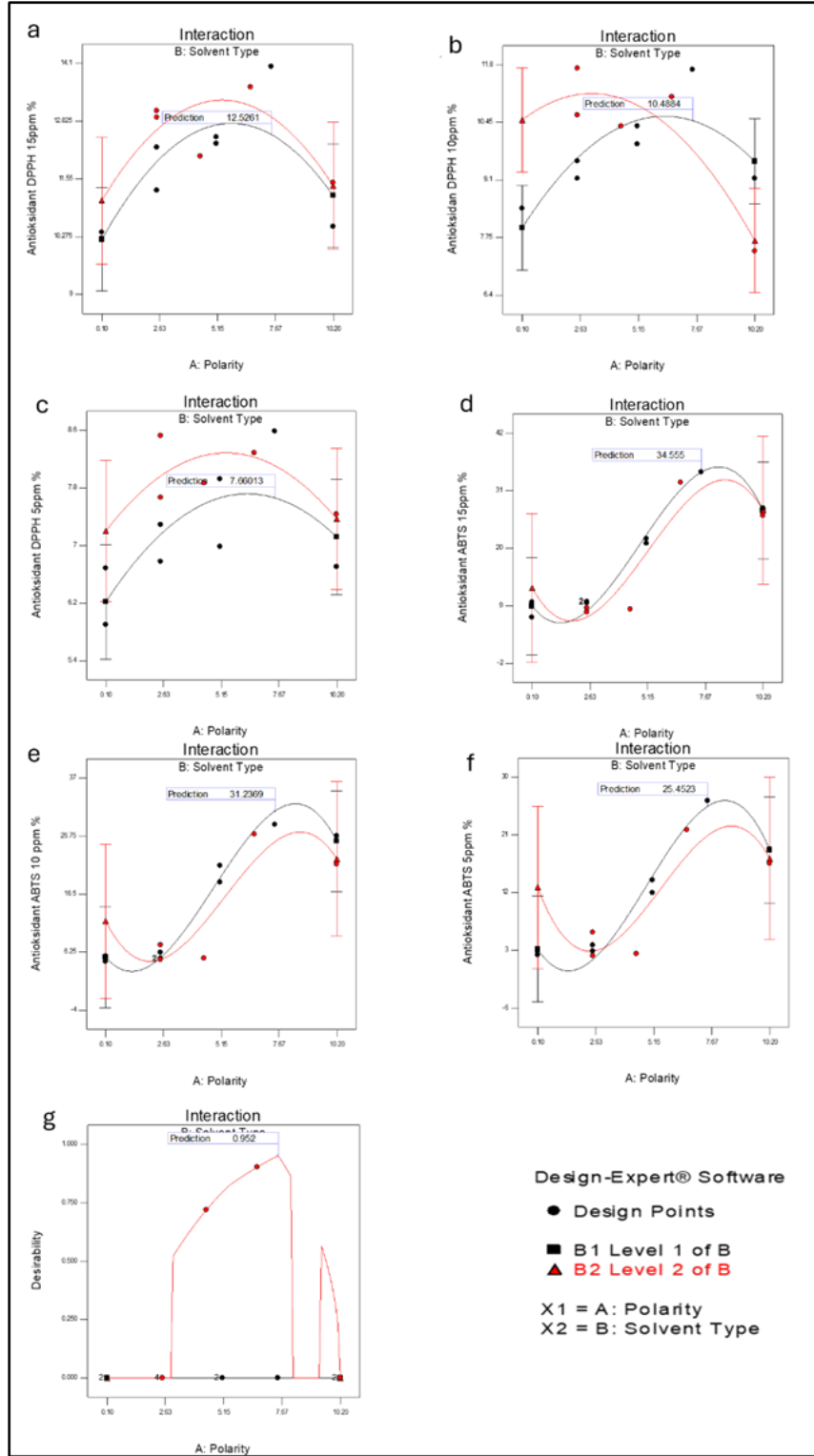
Şekil 4.1. Çörek otu tohum küspesinin ekstraksiyonunda polarite ve çözücü türünün etkisi: a) % Verim, b) Toplam Fenolik Madde Ve c) Toplam Flavonoid

Şekil (4.1) a grafiğinde "Verim (%)" bağımlı değişkeni için polarite ve çözücü tipi arasındaki etkileşim oldukça sınırlı kalmıştır.

Gözlemlenen çizgilerin birbirine paralel ve eğimsiz olması, polarite seviyelerinin değişmesiyle verimin anlamlı şekilde değişmediğini; ancak çözücü tipi farkının düşük düzeyde de olsa bir etkisi olabileceğini göstermektedir. Bu durum, verim üzerinde özellikle polarite faktörünün etkisiz olduğunu, sistemin bu yanıt değişkenine karşı daha durağan olduğunu düşündürmektedir. b' grafiğinde "Toplam Fenolik Madde (TFM)" miktarı için daha belirgin bir eğim gözlemlenmiştir. Her iki çözücü tipi için polarite arttıkça fenolik bileşiklerin miktarında düşüş yaşandığı görülmektedir. Bu durum, düşük polariteli çözücülerin fenolik bileşikleri ekstrakte etmede daha etkili olduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca, çözücü tipleri arasındaki mesafenin sınırlı olması, çözücü etkisinin mevcut ancak polariteye kıyasla daha zayıf kaldığını işaret etmektedir. c' grafiğinde "Toplam Flavonoid (TF)" içeriği için en belirgin değişim izlenmiştir. Özellikle polarite arttıkça TF miktarında keskin bir düşüş yaşandığı açıkça görülmektedir. Bu, flavonoidlerin ekstraksiyonunda düşük polariteye sahip çözücülerin çok daha etkili olduğunu göstermektedir. Ayrıca, çözücü tipi etkisi burada da gözlenmiş olup, kırmızı ve siyah çizgiler arasındaki fark bu faktörün de katkıda bulunduğunu ortaya koymaktadır. Genel olarak değerlendirildiğinde, polarite değişiminin fenolik ve flavonoid içerikleri üzerinde belirgin bir etkisi olduğu, ancak verim üzerinde daha sınırlı bir rol oynadığı anlaşılmaktadır. Bu bulgular, doğru çözücü tipi ve uygun polarite aralığının seçilmesinin ekstraksiyon etkinliğini doğrudan etkileyebileceğini göstermekte; özellikle flavonoid ve fenolik bileşiklerin geri kazanımında bu parametrelerin dikkatle optimize edilmesi gerektiğini vurgulamaktadır.

4.2. Çörek Otu Tohum Küspesinin Ekstraksiyonunda Polarite ve Çözücü Türünün Antioksidan Aktivite Üzerine Etkisi

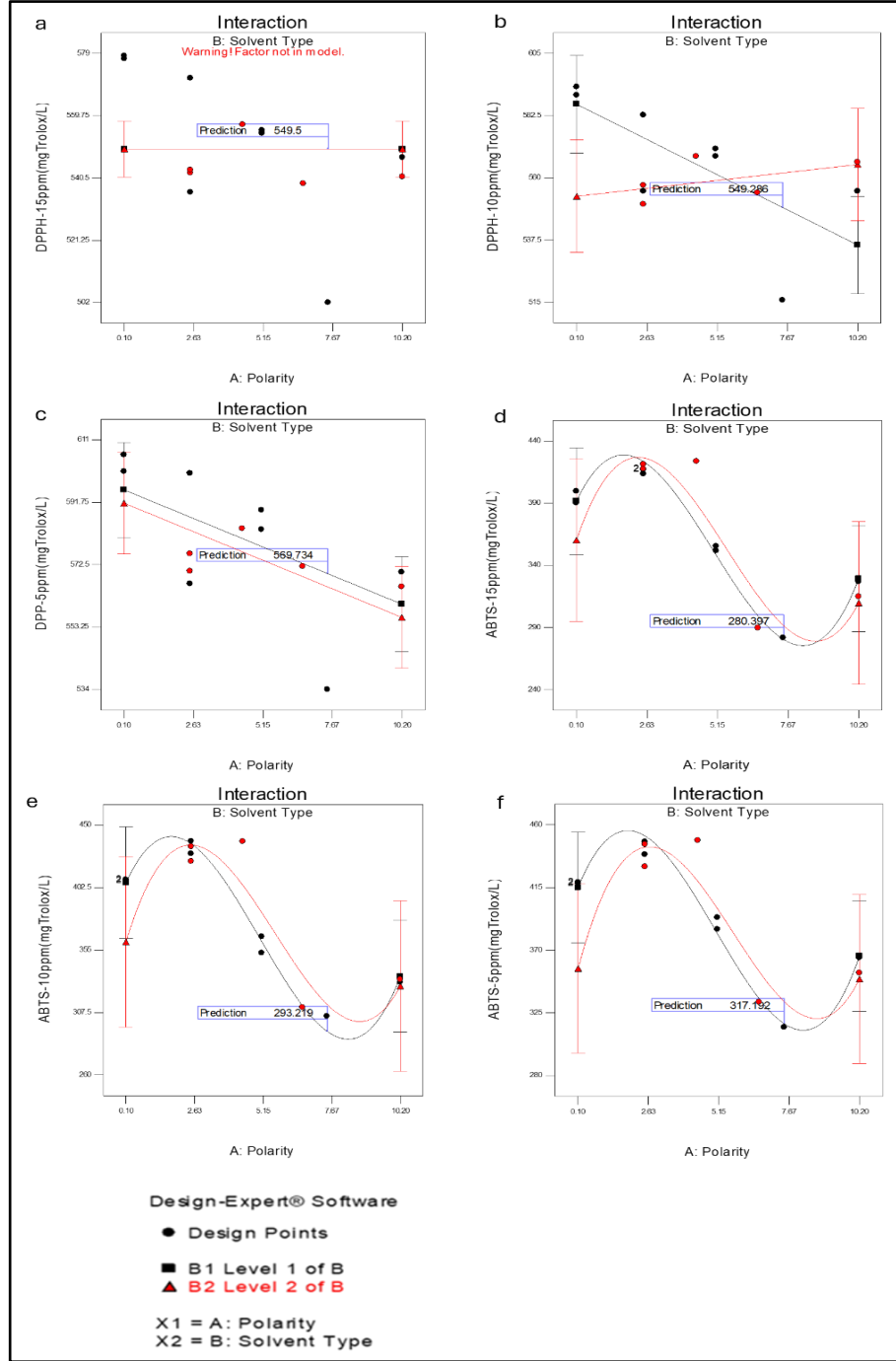
Farklı ekstrakt derişimlerinde (5-15 ppm) DPPH ve ABTS metotlarına göre % radikal süpürme aktivitesinin değişimi polarite ve çözücü türüne bağlı olarak grafiksel olarak şekil 4.2'de verilmiştir. Kalan serbest radikal konsantrasyonları ise Şekil 4.3'te verilmiştir. Şekil 4.4'te üç farklı antioksidan aktivite değerlendirme metodunun değerleri polarite ve çözücü farkına bağlı olarak grafiksel olarak sunulmuştur.



Şekil 4.2. Çörek Otu tohum Küspesinin ekstraksiyonunda polarite ve çözücü türünün antioksidan aktivite üzerine etkisi: a)RSA-DPPH 15 ppm b) RSA-DPPH 10 ppm, c) RSA-DPPH 5 ppm, d) RSA-ABTS 15ppm, e) RSA-ABTS 10ppm, f) RSA-ABTS 5ppm ve g) Desirability (Kabuledilebilirlik)

Şekil (4.2) a, b ve c’de yer alan etkileşim grafiklerine göre, farklı polarite seviyeleri (A) ve çözücü tipleri (B) arasındaki etkileşimin, DPPH antioksidan aktivitesi (% RSA) üzerindeki etkisi açıkça gözlemlenmiştir. Her üç grafik de ikinci dereceden bir model eğilimi sergilemekte olup, bu da yanıtın polariteye karşı doğrusal değil eğrisel bir şekilde değiştiğini göstermektedir. Özellikle orta düzeyde polariteye sahip çözücüler, her iki çözücü tipi için de maksimum antioksidan aktiviteyi sağlamıştır. (a)da (15 ppm konsantrasyonu), hem siyah (B1 seviyesi) hem de kırmızı (B2 seviyesi) eğriler benzer parabolik bir yapı göstermektedir. Bu durum, çözücü tipi ne olursa olsun orta polaritenin daha etkili sonuç verdiğini ve antioksidan aktiviteyi artırdığını ifade eder. (b 10 ppm) ve (c 5 ppm) için de benzer bir durum söz konusudur. Ancak konsantrasyon azaldıkça hem aktivite seviyeleri hem de eğrilerin tepe noktaları bir miktar düşmüştür. Bu, daha düşük DPPH konsantrasyonlarında polarite ve çözücü tipinin etkisinin devam ettiğini ancak etkinin daha sınırlı olduğunu göstermektedir. Tüm grafiklerdeki genel eğilim, antioksidan aktivitesinin yalnızca çözücü polaritesine değil, aynı zamanda çözücü tipine de duyarlı olduğunu göstermektedir. Kırmızı eğrilerin (B2) genellikle daha yüksek değerlere ulaşması, bu çözücü tipinin DPPH radikallerini süpürme aktivitesinde daha başarılı olduğunu göstermektedir. Bu bulgular, seçilen çözücü sistemlerinin ve polarite seviyelerinin ekstraksiyon verimliliğini doğrudan etkileyebileceğini ve optimum koşulların belirlenmesinde dikkate alınması gerektiğini ortaya koymaktadır. Özellikle ikinci dereceden modelin önerilmesi, karmaşık etkileşimlerin varlığını doğrulamakta ve yanıtın yalnızca tek bir faktöre bağlı olmadığını, çoklu faktörlerin kombinasyonundan etkilendiğini vurgulamaktadır. (d), (e) ve (f) etkileşim grafiklerine göre, ABTS radikal süpürme kapasitesini temsil eden yanıt değişkeni üzerinde çözücü tipi (B) ile polarite (A) arasındaki etkileşim net bir şekilde gözlemlenmektedir. Tüm grafiklerde yanıtın eğrisel (ikinci dereceden) bir eğilim gösterdiği görülmektedir; bu da modelin doğrusal değil, daha karmaşık bir yapıya sahip olduğunu göstermektedir. Grafik (d) (15 ppm) verilerine göre, düşük polariteden yüksek polariteye doğru çıkıldıkça yanıt değerinde belirgin bir artış görülmektedir ve bu artış orta düzeyde bir polarite ile maksimum düzeye ulaşmaktadır. B1 (siyah) ve B2 (kırmızı) çözücü seviyeleri arasında belirgin farklar olmasa da, kırmızı eğri (B2) bazı bölgelerde daha düşük tepki vermektedir.

Bu durum, ABTS analizinde polaritenin çözünürlük üzerine önemli bir etkisi olduğunu ve seçilen çözücü tipine göre farklı davranışlar gösterebileceğini ortaya koymaktadır. Grafik (e) (10 ppm) için benzer bir trend gözlemlenmektedir, ancak tahmin edilen maksimum etki düzeyi bir miktar daha düşüktür. Bu durum, düşük konsantrasyonda polarite ve çözücü tipi etkileşiminin hâlâ anlamlı ancak daha sınırlı olduğunu göstermektedir. Grafik (f) (5 ppm) verilerine bakıldığında ise yanıt düzeyinde dalgalanmanın daha yüksek olduğu ve farklı polarite seviyelerinde daha fazla sapma görüldüğü anlaşılmaktadır. Bu sapmalar, deneysel varyasyonun veya düşük konsantrasyonun etkisini artırabileceğini düşündürmektedir. Buna rağmen, orta düzey polaritede yine maksimum etkiye ulaşılmıştır ve modelin eğriliği, ikinci dereceden önerilen modeli destekler niteliktedir. Sonuç olarak, ABTS analizlerinde polarite ile çözücü tipi arasındaki etkileşimin güçlü olduğu ve bu etkileşimin yanıtlar üzerinde eğrisel bir etkisi bulunduğu anlaşılmaktadır. Bu bulgular, optimum koşulların belirlenmesinde sadece bireysel faktörlerin değil, faktörler arası etkileşimlerin de dikkate alınması gerektiğini ortaya koymaktadır. Grafik (g) de gösterilen Desirability (kabuledilebilirlik) eğrisi, kullanılan çözücü tipi (B) ve çözücü polaritesinin (A) ekstraksiyon sürecindeki genel optimizasyon başarısını değerlendirmek için kullanılmıştır. Eğriden görüldüğü üzere, özellikle B2 seviyesindeki çözücü türüyle birlikte orta-yüksek polarite değerlerinde desirability değeri 0.952 gibi oldukça yüksek bir seviyeye ulaşmıştır. Bu durum, bu koşullarda elde edilen ekstraktın çok yüksek kalitede ve hedeflenen kriterlere oldukça uygun olduğunu göstermektedir. Buna karşın, B1 seviyesindeki çözücüyle elde edilen desirability değerleri sıfıra yakın kalmıştır. Bu fark, çözücü türünün tek başına değil, polariteyle olan etkileşimiyle birlikte ekstraksiyon etkinliğinde belirleyici rol oynadığını göstermektedir.

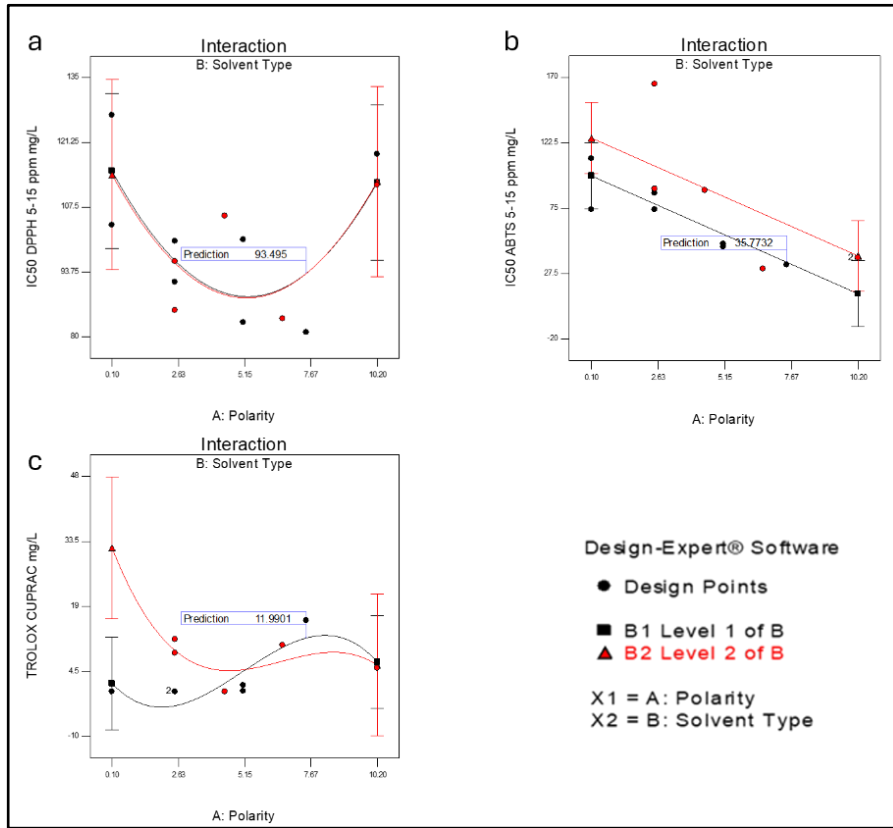


Şekil 4.3. Çörek Otu tohum Küspesinin ekstraksiyonunda polarite ve çözücü türünün antioksidan aktivite üzerine etkisi: a) KSRK-DPPH 15 ppm b) KSRK-DPPH 10 ppm, c) KSRK-DPPH 5 ppm, d) KSRK-ABTS 15 ppm, e) KSRK-DPPH 10 ppm ve f) KSRK-DPPH 5 ppm.

Şekil (4.3) (a)'da, 15 ppm konsantrasyonunda yapılan DPPH analizine ait grafik üzerinde "Factor not in model" ifadesi yer almaktadır.

Bu ifade, seçilen istatistiksel modelde ilgili faktörün (örneğin polarite veya çözücü tipi) anlamlı bir etkisinin olmadığını ve bu nedenle model dışında bırakıldığını göstermektedir. Yani, bu konsantrasyon düzeyinde analiz edilen faktörlerden biri, cevaba anlamlı katkı sağlamadığından modelleme sürecine dahil edilmemiştir. Bu durum, özellikle bazı faktörlerin belirli koşullarda daha az etkili olabileceğini veya faktörler arası etkileşimlerin baskın olabileceğini göstermektedir. Diğer yandan, Şekil (b) ve (c)'deki grafiklerde (10 ppm ve 5 ppm), polarite ve çözücü tipi faktörlerinin hem ayrı ayrı hem de birlikte DPPH aktivitesi üzerinde daha anlamlı etkiler yarattığı görülmektedir. Özellikle çözücü tipi B2, daha stabil ve yüksek antioksidan aktivite sağlarken, B1 tipi çözücü ile elde edilen değerlerde daha belirgin bir düşüş gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, DPPH analizinde kullanılan konsantrasyon düzeyine göre faktörlerin modele etkisinin değişebileceğini, bazı durumlarda ise belirli faktörlerin model dışı bırakılabilecek kadar düşük etkili olabileceğini göstermektedir. Dolayısıyla optimizasyon çalışmalarında sadece faktörlerin bireysel etkisi değil, aynı zamanda model uygunluğu ve istatistiksel anlamlılığı da dikkate alınmalıdır. (d) numaralı grafikte 15 ppm konsantrasyonda hem polarite hem de çözücü tipi arasındaki etkileşim oldukça belirgindir. Polaritenin orta seviyelerinde, antioksidan aktivitenin azaldığı, ancak daha düşük ve yüksek polarite değerlerinde artış gösterdiği gözlemlenmiştir. Bu durum, analiz edilen sistemde belli başlı bir optimum polarite aralığının olduğunu göstermektedir. Ayrıca, çözücü tipi B2 (kırmızı eğri) ile elde edilen değerlerin genellikle daha düşük varyasyon gösterdiği, bu da daha kararlı sonuçlar verdiğini düşündürmektedir. (e) grafiğinde, 10 ppm konsantrasyon için benzer bir parabolik davranış gözlemlenmiştir. Polarite arttıkça antioksidan etkinliğin ilk etapta düştüğü, ardından tekrar yükseldiği görülmektedir. Yine B2 tipi çözücü ile daha homojen sonuçlar alınmış olup, B1 çözücüsüne kıyasla daha az yayılma gözlemlenmiştir. (f) numaralı grafikte, 5 ppm gibi daha düşük konsantrasyonda da benzer bir etkileşim paterni görülmektedir. Özellikle polaritenin orta seviyelerinde antioksidan aktivitenin en düşük seviyeye indiği, ancak uç değerlerde tekrar arttığı açıkça ortaya çıkmaktadır. Bu durum, polaritenin tek başına doğrusal bir etkisi olmadığını ve çözücü tipiyle olan etkileşimin modelleme açısından dikkate alınması gerektiğini vurgular.

Tüm grafikler değerlendirildiğinde, polarite değişiminin antioksidan kapasite üzerindeki etkisinin doğrusal olmadığı, bunun yerine eğrisel (kuadratik) bir modelle daha iyi temsil edildiği anlaşılmaktadır. Aynı zamanda, çözücü tipleri arasındaki fark da oldukça belirgindir. B2 tipi çözücü, çoğu durumda daha yüksek öngörü değerlerine ve daha düşük hata çubuklarına sahip olup, bu durum model güvenilirliğini arttırmaktadır.

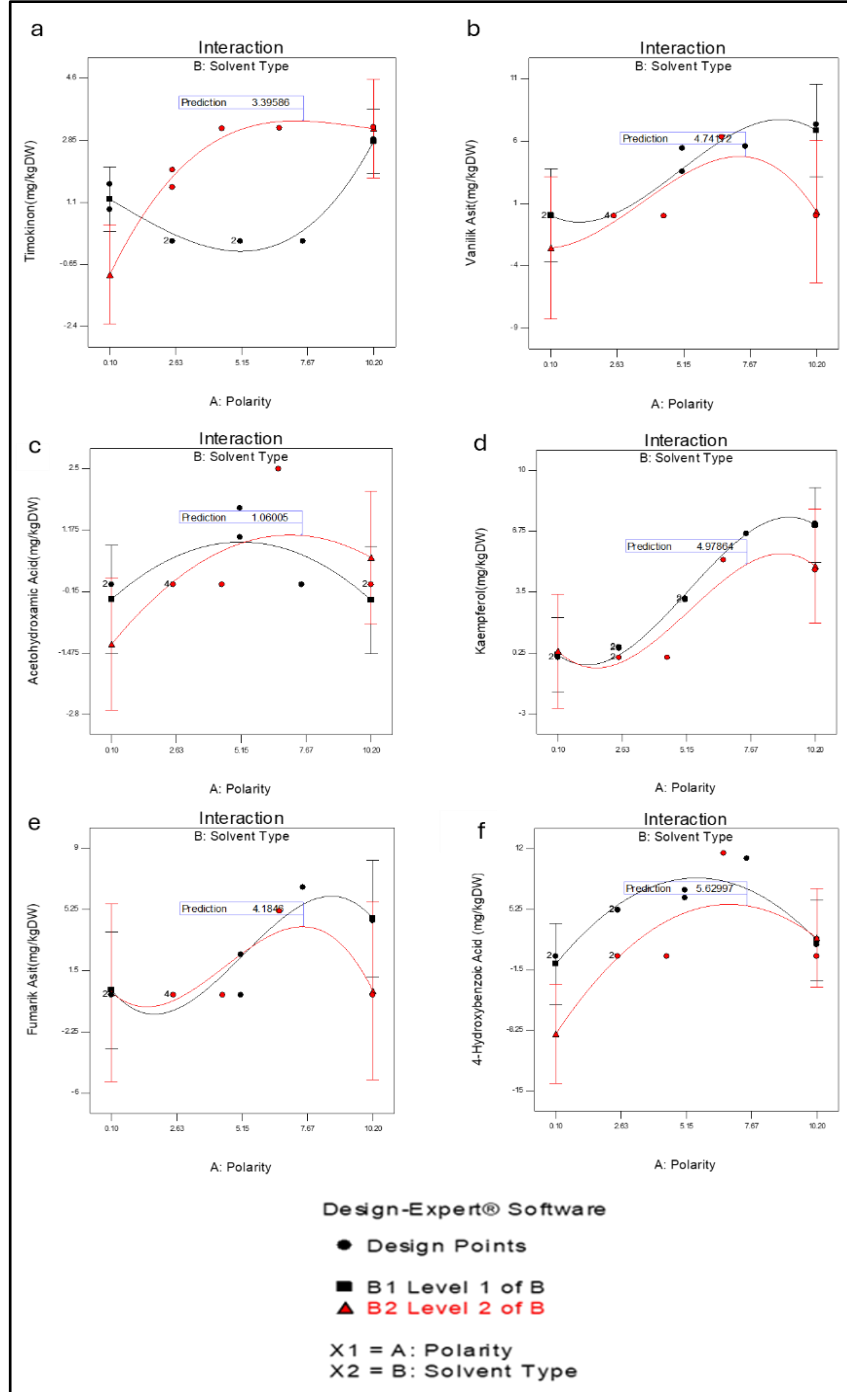


Şekil 4.4. Çörek otu tohum küspesinin ekstraksiyonunda polarite ve çözücü türünün antioksidan aktivite üzerine etkisi: a) IC₅₀-DPPH 5-15ppm, b) IC₅₀-ABTS 5-15ppm ve c) CUPRAC (mg Trolox/L)

Şekil (4.4) (a), 15 ppm konsantrasyonunda yapılan DPPH analizine göre IC₅₀ değerlerinin polariteye bağlı değişimini yansıtmaktadır. Elde edilen eğri, minimum IC₅₀ değerinin orta düzey polariteye sahip bölgede olduğunu göstermektedir. IC₅₀'nin düşük olması, antioksidan aktivitenin yüksekliğini ifade eder. Bu nedenle, bu sonuç polaritenin orta seviyelerde iken en etkili sonucu verdiğini ortaya koyar.

Aynı zamanda, her iki çözücü türü (B1 ve B2) için benzer bir eğilim izlenmekte olup, bu da bu analiz için çözücü türünün etkisinin sınırlı olabileceğini göstermektedir. Şekil (b) ise ABTS analizine göre IC_{50} değerlerinin hem polariteye hem de çözücü türüne göre değişimini sunmaktadır. Burada dikkat çekici olan, polarite arttıkça IC_{50} değerlerinin düşmesidir; bu da daha yüksek polaritede antioksidan kapasitenin arttığını gösterir. Ayrıca, B1 çözücüsü (siyah eğri) B2'ye (kırmızı eğri) göre daha düşük IC_{50} değerleri üretmiş, yani daha etkili sonuçlar sağlamıştır. Bu da çözücü seçiminin bu analizde anlamlı bir faktör olduğunu işaret eder. Şekil (c)'de, CUPRAC analiz sonuçları gösterilmiştir. Burada ise hem polarite hem de çözücü türü değişkenlik göstermektedir. Eğriler daha dalgalı olup, özellikle B2 (kırmızı) çözücüsü için uç polarite değerlerinde daha yüksek CUPRAC sonuçları gözlemlenmiştir. Bu da düşük veya yüksek polarite seviyelerinde bazı çözücülerin antioksidan kapasiteyi artırabileceğini göstermektedir. Bu durum, CUPRAC analizinin daha karmaşık bir modele ihtiyaç duyduğunu ve ikinci derece (quadratic) regresyon modeli ile daha iyi temsil edilebileceğini düşündürmektedir. Genel olarak, bu üç analiz birlikte değerlendirildiğinde hem polarite hem de çözücü türü faktörlerinin IC_{50} ve CUPRAC sonuçlarını anlamlı şekilde etkilediği görülmektedir.

4.3. Çörek Otu Tohum Küspesinin Ekstraksiyonunda Polarite ve Çözücü Türünün Fenolik Bileşen Kompozisyonu Üzerine Etkisi



Şekil 4.5. Çörek otu tohum küspesinin ekstraksiyonunda polarite ve çözücü türünün LC-MS/MS üzerine etkisi: a) Timokinin, b) Vanilik asit, c) Asetohidroksamik Asit, d) Kaempferol, e) Fumarik Asit ve f) 4- Hidroksibenzoik Asit

Şekil (4.5) a grafiğinde Timokinon miktarının polarite ve çözücü türüne bağlı olarak değiştiği görülmektedir. B2 çözücü seviyesi kullanıldığında ve polarite arttığında timokinon verimi önemli ölçüde artmıştır. B1 seviyesinde ise bu artış belirgin değildir. b grafiğinde Vanilik Asit'in hem polariteden hem de çözücü türünden etkilendiği görülmektedir. Özellikle B1 seviyesinde polarite arttıkça verim artış göstermiştir. B2 seviyesinde ise bu artış daha sınırlı kalmıştır. c grafiğinde Asetohidroksamik Asit, orta düzeyde polarite ile maksimum verime ulaşmıştır. Her iki çözücü seviyesi benzer eğilimler göstermiş olsa da B1 ile daha yüksek değerler elde edilmiştir. d grafiğinde Kaempferol verimi, özellikle yüksek polarite ve B1 çözücü seviyesiyle artış göstermiştir. Bu durum, bu flavonoidin daha kutupsal ortamlarda çözünürlüğünün arttığını göstermektedir. e grafiğinde Fumarik Asit için benzer şekilde, artan polariteyle birlikte özellikle B1 seviyesinde daha yüksek verim gözlemlenmiştir. B2 seviyesinde ise daha düzensiz bir dağılım mevcuttur. f grafiğinde 4-Hidroksibenzoik Asit'in orta seviyede polariteyle en iyi verimi verdiği görülmüştür. B1 çözücü tipi burada da daha uygun sonuçlar sağlamıştır. Genel olarak değerlendirildiğinde, çoğu fenolik bileşiğin ekstraksiyonunda B1 seviyesindeki çözücü türü daha yüksek verim sağlamıştır. Polarite faktörü ise her bileşiğe göre farklı şekilde etki etmiş olup; bazı bileşikler yüksek polaritede, bazıları ise orta düzeyde maksimum verime ulaşmıştır. Bu durum, ekstraksiyon optimizasyonunda hem polarite hem de çözücü türünün birlikte dikkate alınması gerektiğini göstermektedir.

4.4. Antioksidan, Toplam Fenolik Madde, Toplam Flavanoid Madde ve Fenolik Bileşen Kompozisyonu Bakımından, Çörek Otu Tohum Küspesi için Optimum Ekstraksiyon Yönteminin Belirlenmesi

Çizelge 4.1. Çörek otu küspesinin maserasyon ekstraksiyonunun deneysel tasarımı ve analiz çıktıları

Bağımsız değişkenler		Bağımlı değişkenler																	
		(P _F <0.05)&(P _{LoF} >0.05)					(P _F <0.05)&(P _{LoF} <0.05)							(P _F >0.05)&(P _{LoF} >0.05)					(P _F >0.05)&(P _{LoF} <0.05)
		TFM (mgGAE/kgDW)	TF (mgQr/kgDW)	RSA-DPPH %	RSA-DPPH %	IC ₅₀ -ABTS	RSA-DPPH %	RSA-ABTS %	RSA-ABTS %	RSA-ABTS %	KSRK-ABTS (mgTrolox/L)	KSRK-ABTS (mgTrolox/L)	KSRK-ABTS (mgTrolox/L)	VERİM%	KSRK-DPPH (mgTrolox/L)	KSRK-DPPH (mg Trolox/L)	KSRK-DPPH (mg Trolox/L)	IC ₅₀ -DPPH	AA-CUPRAC(mg Trolox/L)
		DN	Po	200ppm	1000ppm	10ppm	5ppm	5-15ppm	15ppm	15ppm	10ppm	5ppm	15ppm	10ppm	5ppm	%	15ppm	10ppm	5ppm
1	0.1	533.52	492.69	7.98	5.90	74.00	10.37	9.71	5.54	2.79	390.40	407.48	418.73	19.76	577.37	592.91	606.36	103.73	1.65
2	0.1	664.89	639.38	8.44	6.69	111.00	10.24	6.77	4.63	2.29	399.72	408.45	417.96	18.22	578.26	589.92	601.28	127.04	0.00
3	2.5	752.77	722.54	9.54	6.78	74.00	11.30	9.79	5.16	2.87	417.37	437.75	417.84	22.97	571.39	582.75	600.68	100.29	0.00
4	7.5	328.06	298.03	11.69	8.59	34.00	14.02	34.55	28.81	26.29	281.74	304.63	314.72	18.17	502.04	515.79	534.02	80.93	15.59
5	10.2	233.68	199.27	9.14	6.71	39.00	10.50	27.66	26.83	18.77	326.95	330.44	364.59	20.58	546.88	555.25	570.19	118.76	6.07
6	5.1	419.86	376.54	10.36	6.99	47.00	12.47	20.93	18.64	11.95	355.47	365.18	393.51	27.96	554.35	567.80	589.32	83.04	1.43
7	5.1	291.81	253.40	9.94	7.92	49.00	12.33	21.80	21.57	13.97	351.79	352.76	384.97	24.15	555.35	570.49	583.34	100.62	0.13
8	2.5	781.51	746.94	9.14	7.29	86.00	12.25	9.55	6.20	3.79	413.69	428.24	438.72	21.62	536.12	555.25	566.60	91.61	0.00
9	2.5	764.19	731.83	11.71	8.52	165.00	13.05	8.61	4.95	5.80	417.76	433.67	429.99	18.75	542.09	550.46	570.49	96.00	11.66
10	2.5	673.24	647.12	10.62	7.67	89.00	12.91	7.76	7.54	2.14	421.45	422.42	445.90	16.34	542.99	557.34	575.87	85.61	8.62
11	10.2	173.60	147.66	7.43	7.43	39.00	11.47	26.24	21.82	16.52	314.92	332.58	353.73	16.44	540.90	565.71	565.71	112.21	5.26
12	4.4	312.59	289.00	10.36	7.88	88.00	12.05	8.33	5.20	2.46	423.78	437.55	448.81	17.80	557.04	567.80	583.64	105.62	0.00
13	6.6	355.70	327.68	11.05	8.29	31.00	13.57	32.56	27.11	21.77	289.69	311.42	332.77	16.26	538.81	554.65	571.98	83.84	10.34
DET	7.51	333.64	306.41	9.80	8.11	63.20	12.91	24.74	25.85	20.91	291.61	313.56	332.91	17.89	549.50	561.77	565.62	93.47	11.98
DB	7.51	309.51	269.37	5.37	2.37	62.00	7.88	12.73	7.78	4.80	366.34	385.94	397.78	22.97	611.74	628.48	648.50	90.32	11.05
U%	7.51	7.23	12.09	45.20	70.78	1.90	38.96	48.54	69.90	77.04	-25.63	-23.08	-19.49	-28.40	-11.33	-11.87	-14.65	3.37	7.76
KE		0.952																	

DN: Deneme noktaları; RSA: radikal süpürme aktivitesi; AA: antioksidan aktivite; KSRK: kalan serbest radikal konsantrasyonu; DET: design expert tahmini; DB: deneysel bulgular; KE: kabuledilebilirlik; U%: tahmin ve deneysel verilerin belirsizlik güven yüzdesi; P_F: Modelin P değeri; P_{LoF}: Uyum eksikliğinin P değeri; IC₅₀: yarım maksimal inhibitör konsantrasyon; TFM: toplam fenolik madde; TF: toplam flavanoid; GAE: Gallik asit eşdeğeri; Qr: kuersetin.

Çizelge 4.1 incelendiğimizde Yüzey yanıt yöntemi kapsamında değerlendirilen dört analiz grubuna ait varyans analizi sonuçları, model anlamlılık düzeyi (P değeri) ve "Lack of Fit" testi dikkate alınarak yorumlanmıştır. Birinci grupta yer alan TFM, TF, RSA-DPPH ve IC₅₀-ABTS analizlerinde, tüm modellerin P değerleri 0.05'in altında, Lack of Fit değerleri ise 0.05'in üzerinde bulunmuştur. Bu sonuçlar, kurulan regresyon modellerinin istatistiksel olarak anlamlı ve deneysel verilerle uyumlu olduğunu göstermekte; bu modellerin ilgili yanıt değişkenleri üzerinde etkili ve güvenilir bir şekilde kullanılabileceğini ortaya koymaktadır. İkinci grupta yer alan RSA-DPPH (15 ppm), RSA-ABTS (15, 10, 5 ppm) ve KSRK-ABTS (15, 10, 5 ppm) analizlerinde de benzer şekilde P değerleri anlamlı ($P < 0.05$) ve Lack of Fit değerleri anlamsız ($P > 0.05$) bulunmuştur. Bu da bu grup modellerin geçerliliğini ve optimizasyon sürecinde kullanılabilirliğini desteklemektedir. Üçüncü grupta bulunan Verim, KSRK-DPPH (15 ve 5 ppm) ve IC₅₀-DPPH analizlerinde ise model P değerleri 0.05'in üzerinde bulunmuş, yani modeller istatistiksel olarak anlamlı değildir. Ancak Lack of Fit değerlerinin 0.05'in üzerinde olması modellerin veriye genel olarak uyumlu olduğunu göstermektedir. Bu durum, bağımsız değişkenlerin bu yanıtlar üzerindeki etkisinin sınırlı olabileceğine işaret etmektedir. Dördüncü ve son grupta yer alan CUPRAC analizinde ise hem modelin P değeri 0.05'ten büyük hem de Lack of Fit değeri 0.05'ten küçük bulunmuştur. Bu, modelin hem istatistiksel olarak anlamsız olduğunu hem de veriyle yeterince uyum sağlamadığını göstermektedir. Sonuç olarak, yalnızca birinci ve ikinci gruplarda yer alan modellerin güvenilir olduğu, diğer gruplarda ise modelleme sonuçlarının dikkatle değerlendirilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır. Bu değerlendirme, çalışmada elde edilen optimizasyon stratejilerinin bilimsel temellerinin sağlam olduğunu ve belirli yanıtlar için geçerli modeller sunulduğunu göstermektedir. Çizelge 4.1'e göre En yüksek TFM değeri çözücü olarak hekzan-metanol karışımı kullanıldığında 2.5 polarite değerinde elde edildiği (781.51 mg GAE /Kg DW) görülmektedir. En düşük değer ise çözücü olarak su kullanıldığında 10.2 polaritede elde edilmiştir (173.60 GAE /Kg DW). Sekil 4.1 (b) grafiği İncelendiğinde genel olarak polarite artışına dayalı olarak TFM değerinde düşüş gözlemlenmiştir. Kullanılan çözücü türünden bağımsız olarak polarite farkına dayalı olarak TFM miktarında değişiklik gözlemlenmiştir. Polarite değerinin artmasıyla TFM miktarında azalma gözlemlenmiştir.

Aynı polaritede (2.5 polarite indisi) farklı çözücülerin etkisi incelendiğinde TFM değerinde kayda değer farklılıklar gözlemlenmemektedir. Bu durum TFM değerinin çözücü türünden bağımsız sadece polarite değerine bağımlı olduğunu göstermektedir. Benzer şekilde, TF değerleri de çözücü polaritesine bağlı olarak değişmiştir. Çizelge 4.1 TF açısından incelendiğinde en yüksek TF değeri çözücü olarak hekzan–metanol karışımı kullanıldığında 2.5 polarite değerinde elde edilmiştir (746.94 mg Qr/kg DW). En düşük değer ise çözücü olarak su kullanıldığında 10.2 polaritede elde edilmiştir (147.66 mg Qr/kg DW). Şekil 4.1(c) grafiği incelendiğinde, genel olarak polarite artışıyla birlikte TF değerinde belirgin bir düşüş gözlenmiştir. Kullanılan çözücü türünden bağımsız olarak polarite farklılıkları TF miktarında değişime yol açmıştır. Aynı polaritede (örneğin 2.5 polarite indisi) farklı çözücülerin etkisi karşılaştırıldığında TF değerinde kayda değer farklılıkların olmadığı görülmektedir. Bu sonuç, TF değerinin de fenolik maddelerde olduğu gibi esas olarak polariteye bağlı olduğunu ve çözücü türünden bağımsız olarak değişim gösterdiğini ortaya koymaktadır. Çörek otu küspesinin maserasyon ekstraksiyonunda çözücü polaritesi ve çözücü türünün DPPH metodu ile incelendiğinde, çözücü polaritesinin artmasıyla IC₅₀ değerinde düşüş gözlemlenmektedir. Polarite 0.10’da (hekzan) en yüksek IC₅₀ değeri elde edilirken (127.04 mg/L), polarite 7.5’te (su+metanol) en düşük IC₅₀ değeri elde edilmiştir (80.93 mg/L). ABTS yöntemine göre antioksidan aktiviteyi değerlendirdiğimizde, doğrusal bir etki söz konusu olduğu görülmektedir. En yüksek IC₅₀ değerini 2.5 polaritesinde (heksan+etilasetat) (165 mg/L) elde ederken, en düşük IC₅₀ değerini 6.60 polaritesinde (su+metanol) (31 mg/L) elde edilmiştir. CUPRAC yöntemine göre ise, farklı polarite değerleri ve çözücü türleri için ekstrenin antioksidan aktivitesinde farklı dalgalanmalar gözlemlenmiştir. DPPH ve ABTS yöntemlerine göre çözücü polaritesi ve çözücü türü antioksidan aktivite üzerine benzer etkiler gösterirken, CUPRAC yöntemine göre ise bu iki faktörün etkilerinin birbirinden farklı olduğu ortaya çıkmaktadır. Antioksidan Aktivite, TFM, TF ve Verim için optimum polarite değeri 7.51, %95.2 kabul edilebilirlik ile saptanmıştır. Optimum polarite değeriyle yapılan ekstraksiyon işleminin ardından, bu analizlerin sonuçları Çizelge 4.1’de yer almakta olup, U% değerleri -28.40 ile 77.04 arasında değişmektedir.

Çizelge 4.2. Antioksidan aktivite (AA), toplam fenolik madde (TFM) ve toplam flavonoid (TF) açısından ekstraksiyon optimizasyonu: için RSM model istatistiği

Yanıt	Matematiksel Model	SD	R_{exp}^2	R_{adj}^2	F value	p-value	Lack of Fit	Açıklama
% Verim	Doğrusal	2.85	0.4407	0.3289	3.94	0.0547	0.1109	Önerilen
	2FI	2.96	0.4568	0.2758	0.27	0.6179	0.0899	
	İkinci Derece	2.59	0.6308	0.4462	3.77	0.0881	0.1332	
	Üçüncü Derece	2.55	0.7315	0.4629	1.12	0.3848	0.0990	
TF mgQr/kgDW	Doğrusal	141.14	0.6569	0.5883	9.57	0.0048	0.0640	Önerilen
	2FI	144.43	0.6767	0.5689	0.55	0.4771	0.0542	
	İkinci Derece	152.95	0.6777	0.5166	0.025	0.8787	0.0390	
	Üçüncü Derece	140.92	0.7948	0.5896	1.71	0.2581	0.0348	
TFM mgGAE/kgDW	Doğrusal	140.43	0.6603	0.5923	9.72	0.0045	0.0607	Önerilen
	2FI	143.44	0.6810	0.5746	0.58	0.4640	0.0517	
	İkinci Derece	51.96	0.6817	0.5226	0.019	0.8941	0.0371	
	Üçüncü Derece	139.03	0.8002	0.6004	1.78	0.2474	0.0340	
RSA DPPH 15ppm %	Doğrusal	1.21	0.1702	0.0043	1.03	0.3934	0.0062	Önerilen
	2FI	1.17	0.3029	0.0705	1.71	0.2230	0.0064	
	İkinci Derece	0.81	0.7026	0.5539	10.75	0.0112	0.0235	
	Üçüncü Derece	0.67	0.8458	0.6915	2.78	0.1395	0.0311	
RSA- DPPH 10ppm %	Doğrusal	1.42	0.0709	-0.1150	0.38	0.6924	0.0106	Önerilen
	2FI	1.01	0.5796	0.4395	10.89	0.0092	0.0363	
	İkinci Derece	0.71	0.8151	0.7226	10.19	0.0128	0.1214	
	Üçüncü Derece	0.60	0.9020	0.8040	2.66	0.1489	0.1685	
RSA- DPPH 5ppm %	Doğrusal	0.72	0.3346	0.2015	2.51	0.1305	0.2439	Önerilen
	2FI	0.69	0.4543	0.2723	1.97	0.1936	0.2701	
	İkinci Derece	0.57	0.6686	0.5030	5.18	0.0525	0.4711	
	Üçüncü Derece	0.55	0.7709	0.5418	1.34	0.3304	0.4835	
KSRK- DPPH 15ppm mg Trolox/L	Doğrusal	18.06	0.3369	0.2042	2.54	0.1283	0.1672	Önerilen
	2FI	17.63	0.4313	0.2417	1.49	0.2525	0.1708	
	İkinci Derece	17.77	0.4863	0.2294	0.86	0.3819	0.1524	
	Üçüncü Derece	17.97	0.6062	0.2124	0.91	0.4505	0.1035	
KSRK- DPPH 10ppm mgTrolox/L	Doğrusal	18.35	0.2868	0.1441	2.01	0.1846	0.0751	Önerilen
	2FI	15.92	0.5170	0.3560	4.29	0.0682	0.1167	
	İkinci Derece	16.14	0.5587	0.3381	0.76	0.4097	0.1008	
	Üçüncü Derece	16.46	0.6556	0.3113	0.84	0.4753	0.0635	
KSRK- DPPH 5ppm mgTrolox/L	Doğrusal	16.26	0.4018	0.2822	3.36	0.0766	0.2395	Önerilen
	2FI	15.97	0.4806	0.3075	1.37	0.2726	0.2412	
	İkinci Derece	16.71	0.4948	0.2422	0.22	0.6481	0.1916	
	Üçüncü Derece	17.30	0.5938	0.1877	0.73	0.5197	0.1215	
IC ₅₀ DPPH 5_15ppm	Doğrusal	15.57	0.0210	-0.1748	0.11	0.8992	0.2022	Önerilen
	2FI	15.59	0.1162	-0.1784	0.97	0.3506	0.1898	
	İkinci Derece	11.72	0.5561	0.3341	7.93	0.0227	0.4569	

	Üçüncü Derece	12.16	0.6414	0.2872	0.71	0.5273	0.3403	
RSA- ABTS 15ppm %	Doğrusal 2F1 İkinci Derece Üçüncü Derece	5.85	0.7334	0.6801	13.76	0.0013	0.0013	Önerilen
		6.14	0.7358	0.6477	0.080	0.7833	0.0010	
		6.13	0.7656	0.6484	1.02	0.3426	0.0008	
		3.82	0.9319	0.8638	7.32	0.0245	0.0034	
RSA- ABTS 10ppm %	Doğrusal 2F1 İkinci Derece Üçüncü Derece	5.23	0.7709	0.7251	16.83	0.0006	0.0057	Önerilen
		5.50	0.7718	0.6957	0.034	0.8578	0.0042	
		5.57	0.7920	0.6879	0.78	0.4041	0.0035	
		3.68	0.9321	0.8642	6.19	0.0348	0.0112	
RSA- ABTS 5ppm %	Doğrusal 2F1 İkinci Derece Üçüncü Derece	5.11	0.7035	0.6442	11.86	0.0023	0.0072	Önerilen
		5.38	0.7042	0.6056	0.021	0.8870	0.0054	
		5.49	0.7257	0.5885	0.63	0.4516	0.0043	
		3.41	0.9209	0.8417	7.40	0.0240	0.0178	
KSRK- ABTS 15ppm mgTrolox/L	Doğrusal 2F1 İkinci Derece Üçüncü Derece	34.83	0.6318	0.5581	8.58	0.0068	0.0002	Önerilen
		35.19	0.6617	0.5489	0.80	0.3956	0.0001	
		36.92	0.6690	0.5036	0.18	0.6848	0.0001	
		19.37	0.9317	0.8633	11.53	0.0088	0.0008	
KSRK- ABTS 10ppm mgTrolox/L	Doğrusal 2F1 İkinci Derece Üçüncü Derece	32.34	0.6647	0.5977	9.91	0.0042	0.0019	Önerilen
		33.38	0.6784	0.5712	0.38	0.5512	0.0015	
		35.23	0.6816	0.5224	0.080	0.7850	0.0010	
		19.17	0.9293	0.8585	10.51	0.0110	0.0071	
KSRK- ABTS 5ppm mgTrolox/L	Doğrusal 2F1 İkinci Derece Üçüncü Derece	32.49	0.5830	0.4996	6.99	0.0126	0.0022	Önerilen
		33.39	0.6036	0.4715	0.47	0.5111	0.0018	
		35.31	0.6058	0.4087	0.045	0.8368	0.0013	
		17.96	0.9235	0.8471	12.46	0.0073	0.0114	
IC ₅₀ - ABTS 5_15ppm	Doğrusal 2F1 İkinci Derece Üçüncü Derece	26.55	0.5941	0.5129	7.32	0.0110	0.7129	Önerilen
		25.70	0.6578	0.5437	1.68	0.2278	0.7647	
		24.83	0.7160	0.5740	1.64	0.2362	0.7647	
		25.12	0.7820	0.5640	0.91	0.4523	0.8316	
AA- CUPRAC	Doğrusal 2F1 İkinci Derece Üçüncü Derece	5.14	0.2482	0.0978	1.65	0.2402	0.0038	Önerilen
		4.87	0.3922	0.1895	2.13	0.1783	0.0043	
		5.12	0.4031	0.1046	0.15	0.7120	0.0031	
		4.27	0.6892	0.3784	2.76	0.1412	0.0039	

RSA: radikal süpürme aktivitesi; AA:antioksidan aktivite; KSRK: kalan serbest radikal konsantrasyonu; IC₅₀:yarım maksimal inhibitör konsantrasyon; TFM: Toplam fenolik madde içeriği; TF: Toplam flavonoid içeriği; GAE:Gallik asit eşdeğeri; Qr: Kuersetin ; R_{exp}² Model seçimi deneysel R² ; R_{adj}² Ayarlanmış R² ; Lack of Fit : Uyumsuzluk.

Çizelge (4.2) de Yüzey yanıt analizlerinde kullanılan model türleri ve elde edilen R² değerleri, modelin yanıt değişkenlerini ne ölçüde açıkladığını değerlendirmek açısından önem taşımaktadır. Bu bağlamda dört farklı model grubuna ait sonuçlar aşağıda özetlenmiştir. Birinci grup, Verim, TF, TFM, KSRK-DPPH (15 ve 5 ppm) ile IC₅₀-ABTS (5–15 ppm) analizlerini içermekte olup, bu grupta yazılım tarafından önerilen model türü doğrusal (linear) modeldir.

Bu analizlerde elde edilen R^2 değerleri incelendiğinde, en yüksek değer 0.6603, en düşük değer ise 0.3369 olarak tespit edilmiştir. Bu durum, doğrusal modelin bazı yanıtlar için sınırlı açıklayıcılığa sahip olduğunu ancak bazı analizlerde kabul edilebilir uyum sağladığını göstermektedir. İkinci grup, yalnızca KSRK-DPPH 10 ppm analizinden oluşmakta olup, bu analizde önerilen model 2 faktörlü etkileşimli model (2FI) olmuştur. Bu analiz için elde edilen R^2 değeri 0.5170'dir ve bu değer, modelin yanıt değişkenini orta düzeyde açıkladığını göstermektedir. Üçüncü grupta yer alan RSA-DPPH (15, 10, 5 ppm) ile IC_{50} -DPPH (5–15 ppm) analizlerinde ise önerilen model türü ikinci dereceden (quadratic) modeldir. Bu grupta R^2 değerleri 0.8151 ile 0.5561 arasında değişmekte olup, bu modellerin yanıt değişkenleriyle yüksek uyum gösterdiği ve doğruluk düzeyinin tatmin edici olduğu söylenebilir. Dördüncü grup ise RSA-ABTS (15, 10, 5 ppm), KSRK-ABTS (15, 10, 5 ppm) ve CUPRAC analizlerinden oluşmakta olup, bu analizler için önerilen model türü üçüncü dereceden (cubic) modeldir. Elde edilen R^2 değerleri 0.9321 ile 0.6892 arasında değişmiş ve bu modelin yüksek düzeyde açıklayıcılığa sahip olduğunu göstermiştir. Özellikle 0.93'e ulaşan R^2 değeri, modellenen sistemin deneysel verilerle oldukça güçlü bir ilişki kurduğunu ortaya koymaktadır. Sonuç olarak, model tipi arttıkça genellikle R^2 değerlerinin de yükseldiği görülmüş; bu da daha kompleks modellerin sistem davranışını daha iyi temsil ettiğini göstermektedir.

Çizelge 4.3. Çörek otu küspesinin maserasyon ekstraksiyonu için varyans analizi (MCA)(ANOVA) ve model katsayıları

Birim	katsayı Değeri		Doğrusal		Doğrusal	Etkileşim	İkinci Derece
	Bağımlı Yanıt	Extre Cons. (ppm)	Ω_0	Ω_1 (polarite)	Ω_{11} (Çözücü Türü)	Ω_{111} (polarite x Çözücü Türü)	Ω_{1111} (polarite x polarite)
(%)	RSA-DPPH	15*	+13.01	+0.32	+0.27	-0.16	-2.05*
	RSA-DPPH	10**	+10.67	-0.32	+0.17	-1.10*	-1.75*
	RSA-DPPH	5*	7.98	+0.27	+0.31	-0.18	-1.00*
	RSA-ABTS	15*	+20.16	+14.57***	-2.17	+2.13	-4.77
	RSA-ABTS	10**	+16.72	+13.80***	-2.39	+0.56	-3.79
(mgTrolox/L)	RSA-ABTS	5*	+12.36	+11.38**	-1.73	+0.55	-3.35
	KSRK-DPPH	15	+541.34	-15.13	-1.02	+6.71	+12.68
	KSRK-DPPH	10	+555.96	-11.48	-0.38	+12.62	+10.82
	KSRK-DPPH	5	+572.87	-15.42	-1.20	+7.15	+6.11
	KSRK-ABTS	15*	+361.05	-70.70**	+10.09	-18.14	+11.98
	KSRK-ABTS	10*	+375.46	-68.02**	+10.96	-11.88	+7.66
	KSRK-ABTS	5*	+395.87	-57.47**	+7.60	-10.81	-
	IC ₅₀ -DPPH	5-15	+88.39	0.97	-0.14	+0.26	+25.44*
	IC ₅₀ -ABTS	5-15*	+61.21	-51.91**	+14.40	-22.47	+24.51
	AA-CUPRAC	1000	+5.08	+1.29	+1.64	-3.78	+1.51
(mgGAE/kgDW)	TFM	200**	+453.48	-271.92***	+7.23	-	-
(mgQr/kgDW)	TF	1000**	+422.48	-271.95***	+10.97	-	-
(%)	Verim	-	+20.95	+0.41	-2.57**	+0.34	-3.88
Model	Y (Analiz Çıktısı) = $\Omega_0 + \Omega_1(\text{Polarite}) + \Omega_{11}(\text{Çözücü Türü}) + \Omega_{111}(\text{Polarite} \times \text{Çözücü Türü}) + \Omega_{1111}(\text{Polarite} \times \text{Polarite})$						
İstatistiksel anlamlılık düzeyleri: *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001; ****P<0.0001							

RSA:radikal süpürme aktivitesi; AA:antioksidan aktivite; KSRK:Kalan serbest radikal konsantrasyonu; IC₅₀:yarım maksimal inhibitör konsantrasyon; TFM:Toplam fenolik madde içeriği; TF:Toplam flavonoid içeriği; GAE:Gallik asit eşdeğeri; Qr:Kuersetin; DW: Dry Waight (kuru ağırlık); Ekstraksiyon konsantrasyonlarındaki “*” ifadesi, denklem modellerinin istatistiksel anlamlılık düzeyini göstermektedir.

Çizelge (4.3) incelendiğinde, RSA-DPPH analizi için ekstraksiyon konsantrasyonunun 5 ve 15 ppm düzeylerinde (p<0.05) ve 10 ppm düzeyinde (p<0.01) istatistiksel olarak anlamlı olduğu; polaritenin ve çözücü tipinin ana etkilerinin anlamlı bulunmadığı; yalnızca 10 ppm düzeyinde polarite ile çözücü tipi etkileşiminin (p<0.05) anlamlılık gösterdiği belirlenmiştir.

RSA-ABTS analizinde ekstraksiyon konsantrasyonu 15 ve 5 ppm düzeylerinde ($p<0.05$), 10 ppm düzeyinde ($p<0.01$) anlamlı iken, polarite 15 ve 10 ppm düzeylerinde ($p<0.001$), 5 ppm düzeyinde ($p<0.01$) anlamlı bir etki ortaya koymuş; çözücü tipi ve etkileşim etkileri anlamlılık göstermemiştir. KSRK-DPPH analizinde ne ekstraksiyon konsantrasyonu ne polarite ne çözücü tipi ne de etkileşim düzeyi istatistiksel anlamlılık taşıırken, KSRK-ABTS için ekstraksiyon konsantrasyonu tüm seviyelerde ($p<0.05$) ve polarite ($p<0.01$) anlamlı bulunmuş; çözücü tipi ve etkileşim etkileri anlamsız kalmıştır. IC_{50} -DPPH analizinde hiçbir ana etki veya etkileşim anlamlı bulunmazken, IC_{50} -ABTS analizinde ekstraksiyon konsantrasyonu ($p<0.05$) ve polarite ($p<0.01$) anlamlı kabul edilmiştir. Toplam fenolik madde içeriği (TFM) ve toplam flavonoid içeriği (TF) analizlerinde ekstraksiyon konsantrasyonu ($p<0.01$) ve polarite ($p<0.001$) belirgin bir etki yaratırken, çözücü tipi ve etkileşim etkileri anlamlı bulunmamıştır. Son olarak, verim analizinde ekstraksiyon konsantrasyonu, polarite ve çözücü tipi ana etkileri anlamlılık göstermeyip, yalnızca polarite ile çözücü tipi etkileşimi ($p<0.01$) istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Çizelge 4.4. Çörek otu küspesinin maserasyon ekstraksiyonunun deneysel tasarımı ve LC-MS/MS analiz çıktıları

Bağımsız değişkenler			Bağımlı değişkenler					
			(PF<0.05)&(P _{LoF} >0.05)		(PF<0.05)&(P _{LoF} <0.05)			(PF >0.05)&(P _{LoF} <0.05)
			Thq	FAC	Va-Ac	Kaf	4-HBA	AHA
DN	Po	çözücü tipi	mg/kg DW	mg/kg DW	mg/kg DW	mg/kg DW	mg/kg DW	mg/kg DW
1	0.1	Hekzan	1.61	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0.1	Hekzan	0.90	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3	2.5	Hekzan/Metanol	0.00	0.00	0.00	0.49	5.19	0.00
4	7.5	saf su/Metanol	0.00	6.60	5.58	6.61	10.91	0.00
5	10.2	saf su	2.88	4.55	7.32	7.15	1.29	0.00
6	5.1	Metanol	0.00	2.47	5.43	3.15	6.51	1.65
7	5.1	Metanol	0.00	0.00	3.55	3.08	7.39	1.02
8	2.5	Hekzan/Metanol	0.00	0.00	0.00	0.56	5.14	0.00
9	2.5	EtilAsetat/Hekzan	2.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
10	2.5	EtilAsetat/Hekzan	1.52	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
11	10.2	Saf Su	3.22	0.00	0.00	4.67	0.00	0.00
12	4.4	EtilAsetat	3.18	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
13	6.6	Su/Metanol	3.19	5.13	6.32	5.21	11.49	2.49
DET	7.51	Su/Metanol	3.40	4.18	4.74	4.98	5.63	1.06
DB	7.51	Su/Metanol	5	4.66	0	13.07	14.32	3.22
U%			-47.06	-11.48	100	-162.45	-154.35	-203.77
KE			0.952					

Thq: Timokinon, Va-Ac: Vanilik asit, AHA: Asetohidroksamik asit, Kaf: Kaempferol, FAC: Fumarik asit, 4-HBA: 4-Hidroksibenzoik asit; DN: Deneme noktaları; DET:design expert tahmini; DB:deneysel bulgular; KE:kabuledilebilirlik; U%:tahmin ve deneysel verilerin belirsizlik güven yüzdesi; P_F: Modelin P değeri; P_{LoF}: Uyum eksikliğinin P değeri; IC₅₀: yarım maksimal inhibitör konsantrasyon; DW: Dry Waight (kuru ağırlık).

Çizelge 4.4 incelendiğimizde LC-MS/MS analizinden elde edilen veriler üç ana grupta değerlendirilmiştir. İlk grupta yer alan Thq ve FAC analizlerinde model P değerlerinin 0.05'in altında, Lack of Fit değerlerinin ise 0.05'in üzerinde olması, kurulan modellerin istatistiksel olarak anlamlı ve deneysel verilere uyumlu olduğunu ortaya koymaktadır. Bu durum, bağımsız değişkenlerin bu bileşiklerin ekstraksiyon verimi üzerindeki etkilerini açıklamada yeterli olduğunu ve geliştirilen modellerin güvenilir bir temele dayandığını göstermektedir.

İkinci grupta yer alan Va-Ac, Kaf ve 4-HBA analizlerinde ise modeller istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş ($P < 0.05$), ancak Lack of Fit değerlerinin 0.05'in altında olması, kurulan modellerin deneysel verilerle tam uyum içinde olmadığını göstermektedir. Bu bulgu, söz konusu bileşikler için her ne kadar faktörlerin etkisi istatistiksel olarak gözlemlense de modelin doğruluk düzeyinin sınırlı olabileceğini ve bu nedenle yorumların dikkatle yapılması gerektiğini göstermektedir. Üçüncü grubu oluşturan AHA analizinde ise model P değeri 0.05'in üzerinde, Lack of Fit değeri ise 0.05'in altında bulunmuştur. Bu durum, hem modelin istatistiksel olarak anlamsız olduğunu hem de elde edilen verilerle uyumsuz olduğunu ortaya koymaktadır. Dolayısıyla, AHA'ya ilişkin modelin güvenilir olmadığı ve bu bileşik özelinde elde edilen verilerin modelleme açısından yeterli açıklayıcılığa sahip olmadığı söylenebilir. Genel olarak değerlendirildiğinde, yalnızca ilk gruptaki LC-MS analizlerinin hem anlamlı hem de veriyle uyumlu modeller ortaya koyduğu görülmektedir. Diğer gruplarda ise modelin uyumu ya da anlamlılığı yönünden eksiklikler bulunduğundan, bu sonuçlar yorumlanırken dikkatli olunmalı ve gerektiğinde ilave deneysel doğrulamalarla desteklenmelidir. Bu bağlamda, LC-MS sonuçlarının istatistiksel güvenilirliği bileşik bazında değişmekte olup, her bir analizin model uygunluğu kendi içinde değerlendirilmelidir. Çizelge 4.4'e göre LC-MS/MS analizi sonucunda çörek otu küspesi ekstraktında toplam altı fenolik bileşik tespit edilmiştir: Timokinon, Asetohidroksamik asit, Vanilik asit, Kaempferol, Fumarik asit ve 4-Hidroksibenzoik asit. Çörek otu tohumunun ana bileşeni olan timokinon, en yüksek düzeyde (3.22 mg/kg kuru ağırlık) çözücü polaritesi 10.2 olan saf su kullanıldığında elde edilmiştir. Bunu sırasıyla etil asetat (3.18 mg/kg) ve polaritesi 6.6 olan su-metanol karışımı (3.19 mg/kg) izlemiştir. Apolar çözücüler olan hekzan ve etil asetat-hekzan karışımında timokinon miktarı daha düşük bulunmuştur. Buna karşın, saf metanol ve metanol içeren diğer çözücü karışımlarında (6.6 polarite hariç) timokinon tespit edilmemiştir. Bu sonuçlar, metanolün bu çalışma kapsamında timokinon ekstraksiyonu için uygun bir çözücü olmadığını ortaya koymaktadır. Bu çalışmada timokinon eldesinin yalnızca çözücü polaritesine değil, aynı zamanda çözücü türüne de bağlı olduğu belirlenmiştir.

Örneğin, polarite değeri 2.5 olan hekzan–metanol karışımı ile timokinon ekstrakte edilemezken, aynı polariteye sahip etil asetat-hekzan karışımı kullanıldığında 2.01 mg/kg kuru ağırlık düzeyinde timokinon elde edilmiştir. Bu durum, çözücü seçiminin ekstraksiyon verimliliği üzerinde önemli bir etkisi olduğunu göstermektedir. Vanilik asit ve kaempferol için en yüksek değerler yine 10.2 çözücü polaritesinde saf su kullanımı sonucunda elde edilmiştir. Vanilik asidin çörek otu küspesinde özellikle polar çözücülerde ekstrakte edildiği yapılan çalışma sonucunda belirlenmiştir: su (7.32 mg/kg), Su-metanol 7.5 çözücü polaritesi (6.32 mg/kg) ve Metanol (5.43 mg/kg). Kaempferol için en yüksek verim, Su (7.15 mg/kg), Su-metanol (6.61 mg/kg) ve Su-metanol (5.21 mg/kg) elde edilmiştir. Apolar çözücülerde kaempferol tespit edilememiştir. Bu çalışmada metanol çözücüsü vanilik asit ekstraksiyonu için iyi bir çözücü olduğu ortaya konulmuştur. Asetohidroksamik asit yalnızca metanol içeren sistemlerde ekstrakte edilmiştir: Su+metanol: 2.49 mg/kg, Metanol: 1.65 ve 1.02 mg/kg. Fumarik asit de su-metanol (6.59 mg/kg), su (4.55 mg/kg), metanol (2.47 mg/kg) gibi polar çözücü kullanımı sonucunda elde edilebilmiştir. 4-Hidroksibenzoik asit için de benzer bir durum gözlemlenmiştir. Yüksek oranda sadece su-metanol karışımında çıkmış (11.49 mg/kg), saf metanol ve saf su kullanımında da ekstrakte edilebilmiştir. Bu çalışmada metanol, su, su-metanol gibi polar çözücülerin Vanilik asit, kaempferol, Asetohidroksamik asit, fumarik asit ve 4-Hidroksibenzoik asit gibi fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu için etkili çözücüler olduğu anlaşılmaktadır. Hekzan ve etil asetat gibi apolar çözücüler ise sadece Timokinon gibi kısmen lipofilik özellikte olan bileşiklerde etkili olduğu görülmektedir. Su-metanol karışımı, tüm bileşikler açısından genel olarak en yüksek ekstraksiyon verimini sağlamıştır. "Fenolik kompozisyon içeriği bakımından optimum polarite değeri 7.51, %95.2 kabul edilebilirlik ile belirlenmiştir. Bu optimum polarite değeriyle yapılan ekstraksiyon işleminin ardından, fenolik kompozisyon analizlerinin sonuçları Çizelge 4.4'te yer almakta olup, U% değerleri -203.77 ile 100 arasında değişmektedir.

Çizelge 4.5. Fenolik bileşen kompozisyonu analizi için RSM model istatistiği

Yanıt	Matematiksel Model	SD	R_{exp}^2	R_{adj}^2	F value	p-value	Lack of Fit	Açıklama
Thq	Doğrusal	0.94	0.6051	0.5262	7.66	0.0096	0.0103	Önerilen
	2F1	0.97	0.6192	0.4923	0.33	0.5779	0.0082	
	İkinci Derece	0.76	0.7909	0.6884	6.57	0.0335	0.0185	
	Üçüncü Derece	0.37	0.9623	0.9246	13.65	0.0059	0.2001	
Va-Ac	Doğrusal	2.22	0.5336	0.4403	5.72	0.0221	0.0073	Önerilen
	2F1	2.07	0.6351	0.5134	2.50	0.1482	0.0087	
	İkinci Derece	2.10	0.6644	0.4966	0.70	0.4274	0.0072	
	Üçüncü Derece	1.53	0.8662	0.7324	4.52	0.0634	0.0156	
AHA	Doğrusal	0.87	0.0450	-0.1460	0.24	0.7943	0.0040	Önerilen
	2F1	0.91	0.0544	-0.2607	0.090	0.7715	0.0030	
	İkinci Derece	0.78	0.3843	0.0765	4.29	0.0722	0.0048	
	Üçüncü Derece	0.76	0.5636	0.1273	1.23	0.3560	0.0033	
Kaf	Doğrusal	1.09	0.8689	0.8427	33.15	<0.0001	<0.0001	Önerilen
	2F1	1.14	0.8709	0.8278	0.13	0.7238	<0.0001	
	İkinci Derece	1.21	0.8709	0.8063	2.382	0.9962	<0.0001	
	Üçüncü Derece	0.82	0.9555	0.9110	5.70	0.0409	<0.0001	
FAc	Doğrusal	2.03	0.4062	0.2874	3.42	0.0738	0.0297	Önerilen
	2F1	2.00	0.4811	0.3081	1.30	0.288	0.0287	
	İkinci Derece	2.11	0.4896	0.2344	0.13	0.7236	0.0209	
	Üçüncü Derece	1.47	0.8141	0.6281	5.24	0.0483	0.0558	
4-HBA	Doğrusal	4.31	0.1779	0.0134	1.08	0.3756	<0.0001	Önerilen
	2F1	4.54	0.1790	-0.0946	0.013	0.9131	<0.0001	
	İkinci Derece	3.01	0.6793	0.5190	12.48	0.0077	<0.0001	
	Üçüncü Derece	2.71	0.8059	0.6118	1.96	0.2218	<0.0001	

Thq: Timokinon, Va-Ac: Vanilik asit, AHA: Asetohidroksamik asit, Kaf: Kaempferol, FAc: Fumarik asit, 4-HBA: 4-Hidroksibenzoik asit; R_{exp}^2 Model seçimi deneysel R^2 ; R_{adj}^2 Ayarlanmış R^2 ; Lack of Fit : Uyumsuzluk; DW: Dry Waight (kuru ağırlık).

Çizelge (4.5)te analizler iki ana gruba ayrılmıştır. Birinci grup, Thq, Va-Ac, Kaf ve FAc bileşiklerini kapsamaktadır. Bu grup için yazılım tarafından önerilen model türü üçüncü dereceden (cubic) modeldir. Bu modelin yüksek düzeyde açıklayıcılığa sahip olduğu, elde edilen R^2 değerlerinden anlaşılmaktadır. Söz konusu grupta en yüksek R^2 değeri 0.9623, en düşük ise 0.8141 olarak kaydedilmiştir. Bu sonuçlar, üçüncü dereceden modellerin karmaşık bileşik davranışlarını oldukça başarılı şekilde temsil edebildiğini ve tahmin gücünün yüksek olduğunu göstermektedir.

İkinci grup ise diğer analizlerden farklı olarak yalnızca ikinci dereceden (quadratic) modellerle temsil edilmiştir. Bu gruba dahil olan analizlerde en yüksek R^2 değeri 0.6793, en düşük R^2 değeri ise 0.3843 olarak belirlenmiştir. Bu durum, ikinci dereceden modellerin bazı analizlerde orta düzeyde açıklayıcılık sağlarsa da genel olarak modelin veriyi sınırlı düzeyde temsil ettiğini göstermektedir. Sonuç olarak, LC-MS/MS analizlerinde kullanılan model türleri arasında üçüncü dereceden modellerin, ikinci derece modellere kıyasla çok daha yüksek R^2 değerleri sunduğu ve sistemin davranışını daha doğru şekilde yansıttığı görülmektedir.

Çizelge 4.6. Çörek otu küspesinin maserasyon ekstraksiyonu için varyans analizi (MCA)(ANOVA) ve model katsayıları

	katsayı Değeri		Doğrusal	Doğrusal	Etkileşim	İkinci Derece	Üçüncü Derece	Üçüncü Derece	
Birim	Bağım lı Yanıt	Extre Cons. (ppm)	Ω_0	Ω_1 (polarite)	Ω_{11} (Çözücü türü)	Ω_{111} (polarite x çözücü türü)	Ω_{1111} (polarite x polarite)	Ω_{11111} (polarite x polarite) X (Çözücü türü)	Ω_{111111} (polarite x polarite) X (polarite)
(mg/kgDW)	Thq	5000***	+1.44	+0.65	+1.72***	+0.62	+0.12	-2.16**	+0.78
	Va-Ac	5000*	3.58	+7.14**	+0.28	-0.98	-2.42	-1.99	-4.71
	AHA	5000	+0.91	+0.46	-0.012	+0.47	-1.25		
	Kaf	5000***	+2.92	+6.93***	-0.54	-0.59	+0.19	0.050+	-4.07*
	FAc	5000*	+2.48	+6.93**	+0.076	-1.07	-1.13	-1.22	-5.81
	4-HBA	5000*	+6.80	+3.34	-1.88	+2.02	-8.20**		
Model	Y (response) = $\Omega_0 + \Omega_1(\text{Polarite}) + \Omega_{11}(\text{Çözücü Türü}) + \Omega_{111}(\text{Polarite} \times \text{Çözücü türü}) + \Omega_{1111}(\text{Polarite} \times \text{Polarite})$								
İstatistiksel anlamlık düzeyleri: *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001; ****P<0.0001									

Thq: Timokinon, Va-Ac: Vanilik asit, AHA: Asetohidroksamik asit, Kaf: Kaempferol, FAc: Fumarik asit, 4-HBA: 4-Hidroksibenzoik asit; DW: Dry Weight (kuru ağırlık).

Çizelge (4.6)'nın varyans analizi sonuçlarına göre, ekstraksiyon konsantrasyonunun timokinon ($p<0.001$), vanilik asit ($p<0.05$), kaempferol ($p<0.001$), fumarik asit ($p<0.05$) ve 4-hidroksibenzoik asit ($p<0.05$) içeriklerinde istatistiksel olarak anlamlı bir ana etki oluşturduğu; ancak asetohidroksamik asit düzeylerinde ekstraksiyon konsantrasyonunun anlamlılık taşımadığı görülmektedir. Polarite etkisi vanilik asit ($p<0.01$), kaempferol ($p<0.001$) ve fumarik asit ($p<0.01$) analizlerinde anlamlı bulunurken, timokinon, asetohidroksamik asit ve 4-hidroksibenzoik asit üzerinde polaritenin ana etkisi anlamlılık düzeyine ulaşmamıştır. Çözücü tipi yalnızca timokinon içeriğinde belirleyici bir rol oynayarak anlamlı bir etki sergilemiş ($p<0.001$); diğer bileşiklerde çözücü tipine bağlı ana etki anlamsız kalmıştır.

Polarite ile çözücü tipi arasındaki ikincil etkileşim tüm örneklerde istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. İkinci dereceden polarite terimi yalnızca 4-hidroksibenzoik asit analizinde ($p<0.01$) kayda değer bir etki göstermiştir. Üçüncü dereceden terimlere bakıldığında ise polarite karesi ile çözücü tipinin etkileşiminin timokinon içeriğinde ($p<0.01$), daha yüksek mertebeden üçüncü polarite teriminin ise kaempferol analizinde ($p<0.05$) anlamlı olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgular, seçilen fenolik bileşiklerin verimliliğinin hem ekstraksiyon konsantrasyonu hem de polariteye bağlı olarak ortaya çıkan non-liner dinamiklerden etkilendiğini ortaya koymaktadır.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, çörek otu küspesinin maserasyon ekstraksiyonunda çözücü polaritesi ve türünün hem fenolik/flavonoid içerikler hem de antioksidan aktivite üzerindeki etkileri nicel olarak ortaya konmuştur. Toplam fenolik madde (TFM) açısından en yüksek değer hekzan-metanol karışımında 2.5 polaritede 781.51 mg GAE/kg DW, en düşük değer ise suda 10.2 polaritede 173.60 mg GAE/kg DW olarak belirlenmiştir. Benzer şekilde toplam flavonoid (TF) için en yüksek değer yine 2.5 polaritede hekzan-metanol karışımında 746.94 mg Qr/kg DW iken, en düşük değer suyla 10.2 polaritede 147.66 mg Qr/kg DW olarak saptanmıştır. Şekil 4.1(b) ve 4.1(c) eğrileri, polarite arttıkça TFM ve TF'in genel olarak azaldığını; aynı polarite indeksinde farklı çözücü türleri arasında ise anlamlı bir fark doğmadığını göstermektedir. Bu örüntü, fraksiyon/polariteye duyarlı fenolik zenginleşmenin literatürde rapor edilen bulgularla uyumludur: Mariod ve ark. (2009) orta polariteli EtOAc fraksiyonunda TFM'nin tepe yaptığını (78.8 mg GAE/g) bildirirken, %50 etanol gibi nispeten daha polar bir ortamda Ratz-Łyko ve ark. (2014) çok yüksek TFM (196.96 mg GAE/g) ve toplam flavonoid (19.25 mg QU/g) değerleri elde etmiştir; Kök (2020) ise %50 metanol ekstraktında liyofilize ekstrakt bazında ~332 mg GAE/g bildirmiştir. Farklı ekstraksiyon protokolleri, rapor birimleri ve matris/işleme koşulları nedeniyle doğrudan sayısal kıyas sınırlı olmakla birlikte, hem bizim sonuçlarımız hem de söz konusu çalışmalar polarite seçiminin fenolik kazanımı üzerinde birincil belirleyici olduğunu teyit etmektedir. Öte yandan gıda matrislerine uygulama bağlamında Krawęcka ve ark. (2022), küspenin makarnaya ilavesiyle TFM/flavonoid ve DPPH etkinliğinin anlamlı arttığını; pişirmeyle kayıp olsa da yüksek ilave oranlarında fenolik düzeylerin kontrolün üzerinde kaldığını göstermiştir. Bu, proses adımlarının fenolik seviyelerini etkileyebileceğini ancak fonksiyonel katkı potansiyelinin korunduğunu düşündürmektedir. Mekanik ön-işlemin bileşime etkisini irdeleyen Rabiej-Kozioł ve Szydłowska-Czerniak (2024) da pres nozül çapına bağlı TPC değişimini (284–341 mg GAE/100 g) ve yüksek antioksidan kapasiteyi rapor etmiş, ham maddenin geçmiş işleme koşullarının artık fenolik/antioksidan profilini etkileyebileceğine işaret etmiştir.

Antioksidan testlerde DPPH ve ABTS sonuçlarımız çözücü polaritesine net duyarlılık göstermiştir. DPPH için IC_{50} , hekzanla 0.10 polaritede en yüksek 127.04 mg/L iken su+metanol karışımıyla 7.5 polaritede en düşük 80.93 mg/L'ye düşmüştür. ABTS'de 2.5 polaritede (hekzan+etil asetat) IC_{50} 165 mg/L ile en yüksek; 6.60 polaritede (su+metanol) 31 mg/L ile en düşük bulunmuştur. Bu eğilimler, küspede fraksiyon/çözücüye bağlı antioksidanlık farklılaşmasını gösteren çok sayıda çalışma ile tutarlıdır: Mariod ve ark. (2009) EtOAc fraksiyonunda DPPH IC_{50} 'yi 1.89 mg/mL ile en düşük (en güçlü) bulurken, Ratz-Łyko ve ark. (2014) %50 etanol ekstraktında DPPH IC_{50} =0.495 mg/mL ve ABTS IC_{50} =0.475 mg/mL rapor etmiştir. Döver ve ark. (2024) ise posanın marmelat matrisinde CUPRAC (179.3 ± 7.2 mg TE/100 g) ve DPPH (25.4 ± 2.3 mg TE/100 g) katkısını gösterirken, prosesin TPC ve antioksidan kapasiteyi düşürdüğünü, ancak in vitro sindirim sonrası biyoyararlanımın artabildiğini bildirmiştir. Bizim CUPRAC verilerimiz, polarite ve çözücü türüne göre DPPH/ABTS'ten farklı dalgalanmalar sergilemiş, CUPRAC'ın mekanizma ve elektron transfer koşullarına bağlı olarak matrise daha duyarlı olabileceğini düşündürmüştür. Bu farklılaşma, Zaky ve ark. (2021) derlemesinde vurgulanan “etkinliğin sadece fenolik asitlere değil, aynı zamanda protein kaynaklı peptitlere ve matrise bağlı etkileşimlere de bağlı olabileceği” görüşüyle bağdaştırılabilir; söz konusu derleme bu noktada sayısal karşılaştırma değil, biyokimyasal mekanizma ve kapsamlı çerçeve sunmak üzere destekleyici bir referans olarak değerlendirilmiştir. Bileşen düzeyinde LC-MS/MS sonuçlarımız, küspede altı hedef fenolik bileşiğin doğrulandığını göstermiştir: timokinon, asetohidroksamik asit, vanilik asit, kaempferol, fumarik asit ve 4-hidroksibenzoik asit. Timokinonun 10.2 polaritede suda 3.22 mg/kg ile en yüksek olması; etil asetat (3.18 mg/kg) ve 6.6 polaritede su-metanol (3.19 mg/kg) ile de yüksek seviyelerde bulunması, heksan ve heksan-etil asetatta daha düşük kalması ve saf metanol sistemlerinde (6.6 polarite hariç) tespit edilememesi, timokinon kazanımının yalnızca çözünürlüğe değil çözücü tipine ve matris etkileşimlerine de bağlı olabileceğini göstermektedir. Vanilik asit (su 7.32 mg/kg; su-metanol 7.5 polarite 6.32 mg/kg; metanol 5.43 mg/kg) ve kaempferol (su 7.15 mg/kg; su-metanol 6.61 ve 5.21 mg/kg) gibi daha polar fenoliklerde su/alkollü sistemlerin belirgin üstünlüğü gözlenmiştir; asetohidroksamik asit sadece metanol içeren sistemlerde (su+metanol 2.49 mg/kg; metanol 1.65 ve 1.02 mg/kg) saptanmış; fumarik

asit ise su-metanol 6.59 mg/kg, su 4.55 mg/kg ve metanol 2.47 mg/kg ile polar çözücülerde öne çıkmıştır. 4-hidroksibenzoik asit en yüksek olarak su-metanol karışımında 11.49 mg/kg bulunmuş; saf metanol ve suda da ekstrakte edilebilmiştir. Genel olarak su, metanol ve su-metanol karışımları vanilik asit, kaempferol, asetohidroksamik asit, fumarik asit ve 4-HBA için etkili; heksan ve etil asetat gibi apolar çözücüler ise kısmen lipofilik karakter gösteren timokinon için nispeten daha elverişli görünmektedir. Bileşik profili açısından bu bulgular, p-kumarik asidin baskınlığına (Mariod ve ark., 2009), bağlanma formlarına göre fenolik asit dağılımına (Krimer Malešević ve ark., 2014) ve 17 fenolik bileşiğin teyidinde (Kök, 2020) dair literatürle anlamlı ölçüde örtüşmektedir; ancak çeşitlilik ve bollukta görülen farklar, çeşit/köken, işleme geçmişi ve ekstraksiyon tasarımındaki farklılıklarla açıklanabilir. Kadam ve Lele (2017) tarafından etanolik ekstraktlarda raporlanan zengin fenolik/flavonoid profili ile bizim su/alkollü sistemlerde gözlediğimiz kazanım birlikteliği, uygun çözücü/polarite seçiminin fenolik portföyü genişletmedeki rolünü desteklemektedir. Uygulama tarafında, Krawęcka ve ark. (2022) ile Döver ve ark. (2024) çalışmalarının birlikte okuması, formülasyona ilavenin antioksidan kapasiteyi artırabildiğini, fakat sonraki proses adımlarının miktarı etkileyebileceğini; buna rağmen sindirim sonrası biyoyararlanımın yükselebileceğini ortaya koymaktadır. Bu da, bizim çözücü/polarite odaklı optimizasyonumuzun gıda sistemlerine aktarılırken proses ve biyoyararlanım boyutlarıyla birlikte ele alınması gerektiğini düşündürmektedir. Son olarak, presleme parametrelerinin (Rabiej-Kozioł ve Szydłowska-Czerniak, 2024) ve fenoliklerin bağlanma biçimlerinin (Krimer Malešević ve ark., 2014) ham madde varyasyonuna katkı sağlayabileceği dikkate alındığında, literatürle kıyaslamalarda matris ve metodoloji farklılıklarının muhakkak göz önünde tutulması gerektiği açıktır. Bu bütüncül değerlendirme, çalışmamızda elde edilen bulguların (TFM ve TF'de 2.5 polaritede tepe; DPPH ve ABTS'de su/alkollü sistemlerle daha düşük IC₅₀; CUPRAC'ta yöntem-matris etkileşimine bağlı dalgalanmalar; LC-MS/MS ile polar çözücülerde zengin fenolik asit/flavonoid profili ve timokinonda çözücü-tipine duyarlılık) mevcut literatürün büyük bölümüyle uyumlu bir çerçeve çizdiğini ve çörek otu küspesinin, uygun ekstraksiyon stratejileri altında, fonksiyonel antioksidan kaynak olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir.

6. SONUÇLAR

Çörek otu küspesinin ekstraksiyonunda çözücü türü ve polaritesinin ekstraksiyon verimi üzerindeki etkisi sınırlı bulunmuş, istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir.

Toplam fenolik madde ve flavonoid içeriği miktarı, çözücü polaritesine bağlı olarak değişim göstermiş; polarite arttıkça genel olarak fenolik içerikte azalma gözlenmiştir.

Çörek otu küspesinin antioksidan aktivite özelliği, kullanılan yöntemle göre farklılık göstermiştir. DPPH ve ABTS yöntemlerine göre çözücü polaritesi antioksidan aktivite için önemli bir etkidir. CUPRAC yönteminde ise düzensiz sonuçlar elde edilmiştir.

Çörek otu küspesinde altı adet fenolik bileşik tespit edilmiştir. Bu bileşiklerin ekstraksiyonunda polar çözücüler daha etkili olmuştur.

Timokinon bileşiği, özellikle orta polariteli çözücülerle ve su bazlı sistemlerle daha verimli şekilde ekstrakte edilmiştir. Ancak hekzan ve etil asetat gibi düşük polaritede çözücülerle de ekstraksiyonu miktarlarda mümkün olmuştur.

Timokinon maddesinin ekstraksiyonunda sadece çözücü polaritesi değil aynı zamanda çözücü türü de etkili olmuştur. Metanol çözücüsü timokinon için uygun bulunmamıştır.

Diğer fenolik bileşikler olan vanilik asit, kaemferol, asetohidroksamik asit, fumarik asit ve 4-hidroksibenzoik asidin ekstraksiyonunda sadece su, metanol ve bunların karışımları etkili sonuçlar vermiştir.

Genel olarak, su-metanol karışımı tüm fenolik bileşikler açısından yüksek verim sağlamış ve en uygun çözücü sistemi olarak öne çıkmıştır.

7. ÖNERİLER

Ekstraksiyon işlemlerinde su-metanol karışımı hem timokinon hem de diğer fenolik bileşikler açısından en yüksek verimi sağlamıştır. Bu nedenle, bu çözücü sistemi ileri araştırmalarda referans çözücü sistemi olarak kullanılabilir.

Timokinon eldesi için sadece çözücü polaritesine değil, aynı zamanda çözücü türüne de dikkat edilmelidir. Metanol timokinon için uygun bir çözücü olmadığından, bu bileşik için alternatif çözücü kombinasyonları üzerinde durulmalıdır.

Antioksidan aktivite tayininde kullanılan farklı yöntemlerin (DPPH, ABTS, CUPRAC) farklı sonuçlar vermesi, çoklu analiz yöntemlerinin kullanılmasının gerekliliğini ortaya koymuştur. Bu nedenle, fenolik içerik ve antioksidan kapasite çalışmalarında birden fazla yöntem tercih edilmelidir.

Çörek otu küspesinin değerlendirilebilirliğini artırmak adına, formülasyon geliştirme, mikrokapsülleme, fonksiyonel ürün tasarımı gibi uygulamalı çalışmalar teşvik edilmelidir.

Çörek otu küspesi, sadece bir yan ürün olarak değil, içerdiği fenolik bileşikler ve biyolojik aktivitesi nedeniyle değerli bir fonksiyonel hammadde olarak değerlendirilmelidir. Gıda, kozmetik ve ilaç endüstrilerinde bu potansiyelin kullanımı teşvik edilmelidir.

8. KAYNAKLAR

- Abegunde, S. M., & Ayodele-Oduola, R. O. (2015). Comparison of efficiency of different solvents used for the extraction of phytochemicals from the leaf, seed and stem bark of *Calotropis procera*. *International Journal of Science and Research (IJSR)*, 4(7), 838-835.
- Akgören, G. (2011). *Bazı çörek otu (Nigella sativa L.) popülasyonlarının tarımsal özellikleri* [Yüksek lisans tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi]. Eskişehir.
- Aksoy, M. (2022). *Piyasada satışa sunulan çörekotu (Nigella sativa L.) yağlarının bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri açısından değerlendirilmesi* Necmettin Erbakan Üniversitesi Tez Arşivi].
- Al-Ali, A., Alkhawajah, A. A., Randhawa, M. A., & Shaikh, N. A. (2008). Oral and interperitoneal LD₅₀ of thymoquinone, an active principle of *Nigella sativa*, in mice and rats. *Journal of Ayub Medical College Abbottabad*, 20(2), 25-27.
- Altuncu, M., & Gıdık, B. (2020). Çörek otu (*Nigella sativa L.*) bitkisinin kullanım alanları ve önemi. *Bayburt Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 3(2), 149-153.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., & Karademir, S. E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 7970-7981.
- Aslan, S. (2021). Çörek Otu Posasının Aktif Karbon Üretiminde Değerlendirilmesi. *Fırat Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 33(1), 193-201. <https://doi.org/10.35234/fumbd.777876>
- Atta, M. B. (2003). Some characteristics of *Nigella sativa L.* seed cultivated in Egypt and its lipid profile. *Food Chemistry*, 83(1), 63-68.
- Awadalla, I. M., & Gehad, A. E. (2003). Effect of supplementing growing sheep rations with black cumin seeds (*Nigella sativa*). *Journal of Agricultural Science, Mansoura University*, 28, 185-194.
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., & Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426-436.
- Badary, O. A., Abdel-Naim, A. B., Abdel-Wahab, M. H., & Hamada, F. M. A. (2000). The influence of thymoquinone on doxorubicin-induced hyperlipidemic nephropathy in rats. *Toxicology*, 143, 219-226.
- Ballout, F., Habli, Z., Rahal, O. N., Fatfat, M., & Gali-Muhtasib, H. (2018). Thymoquinone-based nanotechnology for cancer therapy: Promises and challenges. *Drug Discovery Today*, 23(5), 1089-1098.
- Barkoudah, Y. (1998). Black cumin: A neglected food and a medicinal plant. *CWANA Newsletter*, 17, 5.
- Boudiaf, K., Hurtado-Nedelec, M., Belambri, S. A., Marie, J. C., Derradji, Y., Benboubetra, M., El-Benna, J., & Dang, P. M. (2016). Thymoquinone strongly inhibits fMLF-induced neutrophil functions and exhibits anti-inflammatory properties in vivo. *Biochemical Pharmacology*, 104, 62-73.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.

- Çakaloğlu, B., Özyurt, V. H., & Ötleş, S. (2018). Cold press in oil extraction (A review). *Ukrainian Food Journal*, 7(4), 640-654.
- Calinescu, I., Vinatoru, M., Ghimpeteanu, D., Lavric, V., & Mason, T. J. (2021). A new reactor for process intensification involving the simultaneous application of adjustable ultrasound and microwave radiation. *Ultrasonics Sonochemistry*, 77, 105701.
- Cevallos-Casals, B. A., Byrne, D., Okie, W. R., & Cisneros-Zevallos, L. (2006). Selecting new peach and plum genotypes rich in phenolic compounds and enhanced functional properties. *Food Chemistry*, 96(2), 273-280.
- Cheikh-Rouhou, S., Besbes, S., Hentati, B., Blecker, C., Deroanne, C., & Atti, H. (2007). *Nigella sativa* L.: Chemical composition and physicochemical characteristics of lipid fraction. *Food Chemistry*, 101, 673-681.
- Çopuroğlu, Ö. (2013). *Niğde yöresindeki bazı endemik bitki türlerinin antimikrobiyal aktiviteleri* [Niğde Üniversitesi].
- Dinçoğlu, M. (2014). Buhârî ile Ebû Dâvud'un hocası Müsedded b. Müserhed ve hadis ilmindeki yeri. *Atatürk Üniversitesi İlahiyat Fakültesi Dergisi*(41), 347-372.
- Döver, H., Bekar, E., & Kamiloğlu, S. (2024). Çörek otu posasının marmelat yapımında değerlendirilmesi: Fenolik bileşiklerin biyoreişilebilirliği ve antioksidan kapasite üzerine etkileri. *GIDA – The Journal of Food*, 49(6), 1206–1217. <https://doi.org/https://doi.org/10.15237/gida.GD24085>
- Dubaj, J. *Black Cumin – Nigella Sativa [Photograph]*. Retrieved June 22, 2025 from <https://www.publicdomainpictures.net/en/view-image.php?image=206211>
- Edris, A. E. (2010). Evaluation of the volatile oils from different local cultivars of *Nigella sativa* L. grown in Egypt with emphasis on the effect of extraction method on thymoquinone. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 13(2), 154-164.
- El-Dakhakny, M. (1963). Studies on the chemical constitution of Egyptian *Nigella sativa* L. seeds. II: The essential oil. *Planta Medica*, 11(4), 465-470.
- El-Tahir, K. E. D. H., & Bakeet, D. M. (2006). The black seed *Nigella sativa* L – A mine for multi-cures: A plea for urgent clinical evaluation of its volatile oil. *Journal of Taibah University Medical Sciences*, 1(1), 1-19.
- El-Ekhnawy, K., Otteifa, A., Ezzo, O. H., & Hegazy, M. (1999). Post-weaning reproductive activity of Barki ewes lambing in spring fed *Nigella sativa* oil seed meal. *Assiut Veterinary Medical Journal*, 40(80), 292-309. <https://doi.org/10.21608/avmj.1999.182490>
- Fu, X., Wang, D., Belwal, T., Xie, J., Xu, Y., Li, L., Zou, L., Zhang, L., & Luo, Z. (2021). Natural deep eutectic solvent enhanced pulse-ultrasonication assisted extraction as a multi-stability protective and efficient green strategy to extract anthocyanin from blueberry pomace. *LWT – Food Science and Technology*, 144, 111220.
- Gali-Muhtasib, H., Diab-Assaf, M., Boltze, C., Al-Hmaira, J., Hartig, R., Roessner, A., & Schneider-Stock, R. (2004). Thymoquinone extracted from black seed triggers apoptotic cell death in human colorectal cancer cells via a p53-dependent mechanism. *International Journal of Oncology*, 25, 857-866.
- Gharby, S., Harhar, H., Guillaume, D., Roudani, A., Boulbaroud, S., Ibrahim, M., Ahmad, M., Sultana, S., Hadda, T. B., Chafchaoui-Moussaoui, I., & Charrouf, Z. (2015). Chemical investigation of *Nigella sativa* L. seed oil produced in Morocco. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 14, 172-177.

- Gün, M. (2012). Kutsal tohum (*Nigella sativa*): Çörek otunun iyileştirici etkisine ilişkin bazı bilgiler. *Lokman Hekim Dergisi*, 2(1), 43-46.
- Gürpınar, G. Ç., Geçgel, Ü., & Taşan, M. (2011). *Soğuk presyon tekniği ile üretilen bitkisel yağların özellikleri ve sağlık üzerine etkileri*. 7. Gıda Mühendisliği Kongresi 2011, Ankara.
- Güzelsoy, P., Aydın, S., & Başaran, N. (2018). Çörek otunun (*Nigella sativa* L.) aktif bileşeni timokinonun insan sağlığı üzerine olası etkileri. *Journal of Literature and Pharmacy Sciences (J Lit Pharm Sci)*, 7(2), 118-135.
- Handa, S. S., Khanuja, S. P. S., Longo, G., & Rakesh, D. D. (2008). *Extraction technologies for medicinal and aromatic plants*. International Centre for Science and High Technology. <https://dspace.balikesir.edu.tr/xmlui/handle/20.500.12462/6178>
- İlisulu, K. (1992). *İlaç ve baharat bitkileri*. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları.
- İmer, Y., & Taşan, M. (2018). Çeşitli soğuk pres yağların bazı mikro ve makro element içeriklerinin belirlenmesi. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 15(1), 14-25.
- İslam, M. T., Sultana, N., Riaz, T. A., Ferdous, J., Guha, B., Mohagon, S., Mutsuddy, R., Santos, J. V. O., Reis, A. C., Braga, A. L., Cerqueira, G. S., Menezes, A. P. M., & Melo-Cavalcante, A. A. C. (2016). Thymoquinone is knocking at the door of clinical trial. *International Archives of Medicine: Toxicology and Therapeutics Section*, 9, 122.
- İşlek Coşkun, Y. (2020). ÇÖREKOTU POSASI KULLANILARAK SULARDAN DEMİR(III) İYONUNUN GİDERİLMESİ [Removal of Iron(III) Ions from Aqueous Solutions by Black Cumin Seed Cakes]. *Uludağ Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Dergisi*, 25(2), 961-980. <https://doi.org/10.17482/uumfd.715236>
- Jrah Harzallah, H., Kouidhi, B., Flamini, G., Bakhrouf, A., & Mahjoub, T. (2011). Chemical composition, antimicrobial potential against cariogenic bacteria and cytotoxic activity of Tunisian *Nigella sativa* essential oil and thymoquinone. *Food Chemistry*, 129(4), 1469-1474.
- Kadam, D., & Lele, S. S. (2017). Extraction, characterization and bioactive properties of *Nigella sativa* seedcake. *Journal of Food Science and Technology - Mysore*, 54(12), 3936-3947. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2853-8>
- Karaoğlu, E., Hussein, H. S., & Sarişik, G. (2025). Energy-free polarity-driven passive diffusion extraction of bioactive compounds from truffles: Chemometric-model approaches for predicting antioxidant activity. *Food Bioscience*, 71, 107163. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2025.107163>
- Karaogul, E., & Nedjip, G. (2025). RSM-Based Optimization of Bioactive Extraction and Characterization from *Olea europaea* Leaves: Antioxidant and Phenolic Profile by LC-MS/MS. *Food Analytical Methods*. <https://doi.org/10.1007/s12161-024-02734-2>
- Kılıç, C., & Arabacı, O. (2016). Çörek otu (*Nigella sativa* L.)’nda farklı ekim zamanı ve tohumluluk miktarının verim ve kaliteye etkisi. *Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 13(2), 49-56.
- KÖK, T. (2020). *Soğuk Preslenmiş İncir Çekirdeği ve Çörek Otu Posalarından Elde Edilen Ekstraktların Fenolik Bileşik Profiline ve Antioksidatif Özelliklerinin Değerlendirilmesi* [Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi]. İstanbul.

- Krawęcka, A., Sobota, A., Ivanišová, E., Harangozo, L., Valková, V., Zielińska, E., Blicharz-Kania, A., Zdybel, B., & Mildner-Szkudlarz, S. (2022). Effect of Black Cumin Cake Addition on the Chemical Composition, Glycemic Index, Antioxidant Activity, and Cooking Quality of Durum Wheat Pasta. *Molecules*, 27(19), 6342. <https://doi.org/10.3390/molecules27196342>
- Kumar, A., Nirmal, P., Kumar, M., Jose, A., Tomer, V., Oz, E., Proestos, C., Zeng, M., & Elobeid Oz, F. (2023). Major phytochemicals: Recent advances in health benefits and extraction method. *Molecules*, 28(3), 887.
- Lutterodt, H., Luther, M., Slavin, M., Yin, J. J., Parry, J., Gao, J. M., & Yu, L. L. (2010). Fatty acid profile, thymoquinone content, oxidative stability, and antioxidant properties of cold-pressed black cumin seed oils. *LWT – Food Science and Technology*, 43(9), 1409-1413.
- Malešević, V. K., Vaštag, Z., Popović, L., Popović, S., & Peričin-Starčević, I. (2014). Characterisation of black cumin, pomegranate and flaxseed meals as sources of phenolic acids. *International Journal of Food Science and Technology*, 49(1), 210–216. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/ijfs.12300>
- Mariod, A. A., Ibrahim, R. M., Ismail, M., & Ismail, N. (2009). Antioxidant activity and phenolic content of phenolic rich fractions obtained from black cumin (*Nigella sativa*) seedcake. *Food Chemistry*, 116(2), 306–312. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.051>
- Mohammed, I. M. (2007). Evaluation of growth performance for growing Maghraby camel fed on un-conventional feed. *International Journal of Agriculture & Biology*, 9, 18-21.
- Muhammad, T. S., Masood, S. B., Faqir, M. A., Amer, J., Saeed, A., & Muhammad, N. (2009). Nutritional profile of indigenous cultivar of black cumin seeds and antioxidant potential of its fixed and essential oil. *Pakistan Journal of Botany*, 41(3), 1321-1330.
- Myers, R. H., Montgomery, D. C., & Anderson-Cook, C. (2016). *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments* (Vol. 705). John Wiley & Sons.
- Nadkarni, K. M. (1976). *Indian Materia Medica* (3rd ed., revised & enlarged) (Vol. 1). Popular Prakashan.
- Nili-Ahmadabadi, A., Tavakoli, F., Hasanzadeh, G. R., Rahimi, H. R., & Sabzevari, O. (2011). Protective effect of pretreatment with thymoquinone against Aflatoxin B1-induced liver toxicity in mice. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 19(4), 282-287.
- Opreescu, E. E., Enăscuță, C. E., Radu, E., Cîlțea-Udrescu, M., & Lavric, V. (2022). Does the ultrasonic field improve the extraction productivity compared to classical methods – Maceration and reflux distillation? *Chemical Engineering and Processing – Process Intensification*, 179, 109082.
- Ozcan, T., Akpınar-Bayazit, A., Yilmaz-Ersan, L., & Delikanli, B. (2014). Phenolics in human health. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, 5(5), 393.
- Özçelik, U., & Bayram, İ. (2012). Çörek otunun (*Nigella sativa*) kuzularda besi performansı ve bazı kan parametreleri üzerine etkisi. *Kocatepe Veterinary Journal*, 5(2), 27-33.

- Padhye, S., Banerjee, S., Ahmad, A., Mohammad, R., & Sarkar, F. H. (2008). From here to eternity the secret of Pharaohs: Therapeutic potential of black cumin seeds and beyond. *Cancer Therapy*, 6, 495-510.
- Pawliszyn, J. (2003). Sample preparation: Quo vadis? *Analytical Chemistry*, 75(11), 2543.
- Procházková, D., Boušová, I., & Wilhelmová, N. (2011). Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, 82(4), 513-523.
- Proestos, C., & Komaitis, M. (2008). Application of microwave-assisted extraction to the fast extraction of plant phenolic compounds. *LWT - Food Science and Technology*, 41(4), 652-659.
- Rabiej-Kozioł, D., & Szydlowska-Czerniak, A. (2024). Antioxidant Potential Evaluation at Various Stages of Black Cumin Oil Production. *Foods*, 13(21), 3518. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/foods13213518>
- Radošević, K., Bubalo, M. C., Srček, V. G., Grgas, D., Dragičević, T. L., & Redovniković, I. R. (2015). Evaluation of toxicity and biodegradability of choline chloride based deep eutectic solvents. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 112, 46-53.
- Rafati, S., Niakan, M., & Naseri, M. (2014). Anti-microbial effect of *Nigella sativa* seed extract against staphylococcal skin infection. *Medical Journal of the Islamic Republic of Iran*, 28, 42.
- Randhawa, M., & Al-Ghamdi, M. S. (2002). A review of the pharmaco-therapeutic effects of *Nigella sativa*. *Pakistan Journal of Medical Research*, 41(2).
- Ratz-Łyko, A., Herman, A., Arct, J., & Pytkowska, K. (2014). Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Oenothera biennis*, *Borago officinalis*, and *Nigella sativa* Seedcake Extracts. *Food Science and Biotechnology*, 23(4), 1029–1036. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s10068-014-0140-2.pdf>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Richter, B. E., Jones, B. A., Ezzell, J. L., Porter, N. L., Avdalovic, N., & Pohl, C. (1996). Accelerated solvent extraction: A technique for sample preparation. *Analytical Chemistry*, 68(6), 1033-1039.
- Salem, M. L. (2005). Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. seed. *International Immunopharmacology*, 5, 1749-1770.
- Sasikala, M., & Sundaraganapathy, R. (2017). Preliminary phytochemical evaluation of hydroalcoholic extract of *Ipomoea aquatica* Forssk. from Aliyar riverine in South India. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 8(3), 356-365.
- Savoire, R., Lanoiselle, J. L., & Vorobiev, E. (2013). Mechanical continuous oil expression from oilseeds: A review. *Food and Bioprocess Technology*, 6(1), 1-16.
- Seçmen, Ö., Gemici, Y., Görk, G., Bekat, L., & Leblebici, E. (2000). *Tohumlu bitkiler sistematiği*. Ege Üniversitesi Yayınları.
- Shah, S., & Kasturi, S. R. (2003). Study on antioxidant and antimicrobial properties of black cumin (*Nigella sativa* Linn). *Journal of Food Science and Technology - Mysore*, 40, 70-73.

- Sicker, D., Zeller, K. P., Siehl, H. U., & Berger, S. (2019). *Natural products: Isolation, structure elucidation, history*. John Wiley & Sons.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- Sultan, M. T., Butt, M. S., Anjum, F. M., Jamir, A., Akhtar, S., & Nasir, M. (2009). Nutritional profile of indigenous cultivar 10 of black cumin seeds and antioxidant potential of its fixed and essential oil. *Pakistan Journal of Botany*, 41(3), 1321-1326.
- Taka, E., Mazzio, E. A., Goodman, C. B., Redmon, N., Flores-Rozas, H., Reams, R., Darling-Reed, S., & Soliman, K. F. (2015). Anti-inflammatory effects of thymoquinone in activated BV-2 microglial cells. *Journal of Neuroimmunology*, 286, 5-12.
- Tan, G. (2018). Antioxidative, antiproliferative and antiangiogenic activities of *Nigella sativa* L. pulp, a waste material remaining from oil production [Journal article]. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 46(4), 629-642. <https://doi.org/10.15671/hjbc.2018.268>
- Tanker, N., Koyuncu, M., & Coşkun, M. (2004). *Farmasötik botanik* (Yayın No. 88). Ankara Üniversitesi Yayınları.
- Tonçer, Ö., & Kızıllı, S. (2004). Effect of seed rate on agronomic and technologic characters of *Nigella sativa* L. *International Journal of Agriculture & Biology* 6(3), 529-532.
- Üçler, B. (2023, September 6). *Çörek Otu (Nigella sativa L.)*. *Bilgi Çayı*. Retrieved June 22 from <https://bilgicayi.com/corek-otu-nigella-sativa-l/>
- Umar, S., Zargan, J., Umar, K., Ahmad, S., Katiyar, C. K., & Khan, H. A. (2012). Modulation of the oxidative stress and inflammatory cytokine response by thymoquinone in the collagen induced arthritis in Wistar rats. *Chemico-Biological Interactions* 197, 40-46.
- Uzuner, K. (2023). *Çörek otu küspesinden protein eldesi ve ekmekte kullanım olanaklarının araştırılması* [Yüksek lisans tezi, Bursa Teknik Üniversitesi].
- Wada, L., & Ou, B. (2002). Antioxidant activity and phenolic content of Oregon caneberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(12), 3495-3500.
- Yılmaz, E. (2019). *Çörek otu küspesinden hazırlanan biyosorbent yüzeyine boyar madde adsorpsiyonu* [Balıkesir University]. ProQuest Dissertations & Theses Global. Balıkesir, Turkey. <https://www.proquest.com/dissertations-theses/çörek-otu-küspesinden-hazırlanan-biyosorbent/docview/3133930671/se-2?accountid=11301>
- Yılmaz, G., Bıyık, N., & Dökülen, Ş. (2020). Seçilmiş bazı çörek otu (*Nigella sativa*) populasyonlarının Tokat-Niksar şartlarında performanslarının belirlenmesi. *Ziraat Fakültesi Dergisi*, 186-193.
- Yılmaz, H. (2023). The use of proteins isolated from *Nigella sativa* in model food emulsions and the tribological investigation of their oral processes [Çörek otundan izole edilen proteinlerin model gıda emülsiyonlarında kullanımı ve oral prosesinin tribolojik incelenmesi.]. *GIDA - Journal of Food*, 48(2), 435-444. <https://doi.org/10.15237/gida.GD23016>

- Yimer, E. M., Tekewe, A., & Tesfaye, A. (2019). Nigella sativa L. (black cumin): A promising natural remedy for wide range of illnesses. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Article ID 1528635, 1528616 pages. <https://doi.org/10.1155/2019/1528635>
- Zaky, A. A., Shim, J.-H., & Abd El-Aty, A. M. (2021). A Review on Extraction, Characterization, and Applications of Bioactive Peptides From Pressed Black Cumin Seed Cake. *Frontiers in Nutrition*, 8, Article 743909. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnut.2021.743909/full>
- Zent, İ. (2019). Soğuk preslenmiş çörek otu posalarından protein hidrolizatlarının üretilmesi ve hidrolizatların biyoaktif özelliklerinin değerlendirilmesi İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda ...].
- Zhang, Q. W., Lin, L. G., & Ye, W. C. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chinese Medicine*, 13, Article 20.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64(4), 555-559.
- Zuorro, A. (2014). Use of cell wall degrading enzymes for the production of high-quality functional products from tomato processing waste. *Chemical Engineering Transactions*, 38, 355-360.