

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ

DOKTORA TEZİ

TÜRKİYE'DE YETİŞTİRİLEN ÇÖREK OTU (NIGELLA SATIVA L.)
TOHUMLARINA ÖN UYGULAMA (PRIMING) VE BİYOTEKNOLOJİK
YÖNTEMLER UYGULAYARAK STANDARDİZE ÇÖREK OTU YAĞININ ELDE
EDİLMESİ

Selin IŞIK

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Murat KARTAL

Ocak

2018

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağılı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Selin IŞIK

ONAY

Prof. Dr. Murat KARTAL danışmanlığında Selin IŞIK tarafından hazırlanan bu çalışma 03/01/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Maksut COŞKUN

Üye: Prof. Dr. Murat KARTAL

Üye: Doç. Dr. Sinem ASLAN ERDEM

Üye: Prof. Dr. Osman ÜSTÜN

Üye: Prof. Dr. Ali ERGÜL

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

Türkiye’de Yetiştirilen Çörek Otu (*Nigella sativa* L.) Tohumlarına Ön Uygulama (Priming) ve Biyoteknolojik Yöntemler Uygulayarak Standardize Çörek Otu Yağının Elde Edilmesi

Selin IŞIK

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Prof. Dr. Murat KARTAL

Çörek otu (*Nigella sativa* L.) , dünyada ve ülkemizde gıda sektöründe yaygın olarak kullanılan ve gittikçe artan bir kullanım potansiyeli olan bir bitki türüdür. Tıbbi ve ekonomik olarak oldukça büyük bir öneme sahip olan ve Türkiye’de çörek otu olarak bilinen *Nigella sativa*, Türkiye’nin çeşitli bölgelerinde yetiştirilmektedir. Yağının en önemli bileşiği timokinondur. *Nigella sativa* alternatif tıpta kanser, romatizma, baş ağrısı ve daha birçok hastalığa karşı binlerce yıldır kullanılmaktadır. Bu tez çalışması 4 farklı etapta oluşmaktadır. İlk etapta çörek otu tohumlarına çeşitli ortamlarda ön uygulama işlemi yapılmış ve priming işleminin tohumlardaki timokinon miktarı üzerine etkisi yüksek performanslı sıvı kromatografisi (YBSK) ile araştırılmıştır. İkinci etapta, in vitro koşullarda çeşitli biyoteknolojik yöntemler kullanılarak doku kültürü ile çörek otu tohumlarından kallus elde edilmiş ve bu kallus içerisindeki timokinon miktarı araştırılmıştır. Üçüncü etapta; Ankara’da bulunan aktarlardan temin edilmiş 10’ar farklı çörek otu tohumu, tohum yağı ve tohum yağı kapsülleri içerdikleri timokinon miktarlarına göre yine YBSK ile incelenmiştir. Dördüncü ve son etapta ise piyasadan temin edilmiş ve timokinon miktarları incelenmiş olan tohum yağları ve tohum yağı kapsüllerinin Gaz Kromatografisi- Kütle Spektrometresi ile yağ asidi profilleri çıkartılmıştır.

2018, 147 sayfa

Anahtar kelimeler: *Nigella sativa* L.; çörek otu; YBSK; ön uygulama; timokinon; yağ asidi profili

ABSTRACT

PhD Thesis

Having Standardized Black Cumin Oil by Applying Priming and Biotechnological Methods On Black Cumin (*Nigella sativa* L.) Seeds Grown In Turkey

Selin IŞIK

Ankara University Biotechnology Institute

Prof. Dr. Murat KARTAL

Black cumin (*Nigella sativa* L.) is a plant which is widely used in food industry of the world and in our country, has an increasing potential for use. Medicinally and economically important plant *Nigella sativa*, popularly known as çörek otu in Turkey, is cultivated in many parts of Turkey. The most important component of its oil is thymoquinone. *Nigella sativa* is used in alternative medicine to treat cancer, rheumatism, headaches, and many diseases for thousands of years. This thesis study consists of 4 stages. For the first stage, priming treatment with different media, applied on black cumin seeds and the effect of priming treatment on thymoquinone amount in seeds were investigated with high performance liquid chromatography (HPLC). In the second stage, calluses were obtained in vitro conditions with using various biotechnological methods from black cumin seeds and the amounts of thymoquinone in these calluses were investigated. For the third stage, 10 different seed, seed oil and seed oil capsule samples that have been supplied from local markets in Ankara, were investigated for their thymoquinone contents by HPLC. In the fourth and the last stage, the fatty acid profiles of seed oil and seed oil capsule samples that have been supplied from local markets, obtained by gas chromatography – mass spectroscopy.

2018, 147 pages

Key words: *Nigella sativa* L.; black cumin; HPLC; priming; thymoquinone; fatty acid profile

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım süresince deneyim ve bilgisi ile beni yönlendiren değerli danışman hocam Prof. Dr. Murat KARTAL'a bilimsel katkılarının yanı sıra anlayışı ve desteği için teşekkür ederim. Tezimin her aşamasında yanımda olan, bıkmadan usanmadan her türlü problemimle, sıkıntıyla ilgilenen, gerek bilimsel olarak gerekse hayatla ilgili benim için çok değerli tecrübelerini paylaşan, hayatımda tanıdığım en iyi kalpli insan Doç. Dr. Sinem ASLAN ERDEM'e ihtiyaç duyduğum her an bana zaman ayırdığı için sonsuz teşekkür ederim. Tezde yer alan priming ve doku kültürü çalışmalarımı benimle birlikte tamamlayan ve hiçbir desteğini esirgemeyen Dr. Feresteh REZAEI'ye çok teşekkür ederim.

Doktora serüvenine başlamamın baş mimarı, en büyük destekçim, bana şu hayatta en çok emek veren kişi; sevgili annem Aysel AKBAŞ'a teşekkür ederim. Hayatı boyunca özellikle kız çocuklarının okuması gerektiğini düşünen ve bu konuda ömrü yettiğince çaba sarf edecek olan hayattaki ilk aşkı canım babam Şehmuz AKBAŞ'a; canım kardeşlerim, hayattaki en iyi arkadaşlarım, sırdaşlarım Seda ÖZATAY ve Esra GÜRKAN'a teşekkür ederim.

Ruhumun diğer yarısı sevgili eşim Serhat IŞIK'a doktora çalışmalarım sırasında her türlü kahrımı çektiği, beni anlayışla karşıladığı ve tezimi bitirmem konusundaki yoğun desteği için çok teşekkür ederim. Her vazgeçtiğim anda beni cesaretlendiren, bugüne kadar gördüğüm en güçlü kadın, sevgili kayınvalidem Habibe IŞIK'a ve kayınpederim Abdülkerim IŞIK'a sonsuz teşekkür ederim.

Son olarak daha dört aylıkken doktora tez çalışmalarımı, poster sunumlarımı ve tez izleme komitelerimi yaparken pusetinde uyuklayan ve bu tezi benimle birlikte bitiren canım oğlum, herşeyim Doğu IŞIK'a çok teşekkür ederim.

Bu tezimi şu an dört yaşında olan oğlum Doğu IŞIK'a adıyorum. Umarım büyüdüğü zaman, bilim dünyasına yön veren çalışmaların mimarı bir bilim adamı olarak insanlığa hizmet eder. Hiçbir çocuğun acı çekmediği, yatağına aç girmediği, hastalıklardan ve savaşlardan ölmediği bir dünya dileğiyle...

Selin IŞIK, 2018

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	i
ONAY	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TESEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
SEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvii
SİMGELER DİZİNİ	xviii
1. GİRİŞ	1
1.1. NİGELLA SATİVA L. BOTANİK ÖZELLİKLERİ	7
1.1.1. Bitkinin Sistematikteki Yeri.....	7
1.1.2. Ranunculaceae Familyasının Özellikleri.....	7
1.1.3. Cins Özellikleri.....	8
1.1.4. <i>Nigella sativa</i> L.'nin Özellikleri.....	8
1.2. KİMYASAL BİLEŞİKLER	8
1.2.1. Sabit Yağ.....	8
1.2.1.1. Doymamış Yağ Asitleri.....	8
1.2.1.2. Doymuş Yağ Asitleri.....	9
1.2.2. Kinonik Bileşikler.....	10
1.2.3. Uçucu Yağ.....	11

1.2.4. PROTEİNLER.....	12
1.2.5. ALKALOİDLER	13
1.2.6. SAPONOZİTLER	15
1.2.7. DİĞER BİLEŞİKLER.....	16
<u>2. KURAMSAL TEMELLER</u>	17
2.1. ÇÖREK OTUNUN ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTESİ.....	17
2.2. ÇÖREK OTUNUN ANTİOKSİDAN AKTİVİTESİ.....	18
2.3. ÇÖREK OTUNUN ANTİENFLAMATUAR ETKİSİ	20
2.4. ÇÖREK OTUNUN ANTİDİYABETİK ETKİSİ.....	21
2.5. ÇÖREK OTUNUN ANTİHİPERTANSİF ETKİSİ	22
2.6. ÇÖREK OTUNUN ANTİASTMATİK (ASTİM KARŞITI) ETKİSİ	22
2.7. ÇÖREK OTUNUN ANTİ-TÜMÖR ETKİSİ.....	23
2.8. ÇÖREK OTUNUN NÖROPROTEKTİF ETKİSİ	23
2.9. ÇÖREK OTUNUN GASTROPROTEKTİF ETKİSİ.....	24
2.10. SABİT YAĞ BİLEŞİMİ ÜZERİNE YAPILAN ÇALIŞMALAR	25
2.11. ÇÖREK OTU VERİM VE KALİTE ARAŞTIRMALARI.....	27
<u>3. GEREKCE VE AMAC</u>	28
<u>4. MATERYAL VE METOT</u>	29
4.1. ÖN UYGULAMA (PRİMİNG) ÇALIŞMALARI	29
4.1.1. ÖN DENEME ÇALIŞMALARI	29
4.1.2. ÖN UYGULAMA DENEMELERİ.....	30
4.1.3. ÖN UYGULAMA SONRASI ÇİMLENME YÜZDESİ	30
4.1.4. ÖN UYGULAMA SONRASI ÇİMLENME HIZI.....	31
4.1.5. ÖN UYGULAMA SONRASI ÇİMLENME GÜCÜ	31

4.1.6. ÖN UYGULAMA SONRASI SAPÇIK VE KÖKÇÜK UZUNLUĞU	31
4.1.7. ÖN UYGULAMA SONRASI SAPÇIK VE KÖKÇÜK YAŞ AĞIRLIĞI.....	31
4.1.8. ÖN UYGULAMA SONRASI SAPÇIK VE KÖKÇÜK KURU AĞIRLIĞI	31
4.1.9. TARLA DENEMELERİ.....	32
4.1.10. SERA DENEMELERİ	34
4.2. BİYOTEKNOLOJİ ÇALIŞMALARI	35
4.2.1. EKSPLANT SEÇİMİ.....	35
4.2.2. BİTKİ REJENERASYON AŞAMASI.....	35
4.2.3. ÇÖREK OTU TOHURLARDAN KALLUS ELDESİ	36
4.3. YBSK VE GK-KS ANALİZLERİ İÇİN EKSTRAKSİYON VE METOD ÇALIŞMALARI	38
4.3.1. KALLUS EKSTRAKSİYONU	38
4.3.2. PİYASADA SATILAN ÇÖREK OTU TOHURLARININ, YAĞLARININ VE KAPSÜLLERİNİN TEMİNİ.....	39
4.3.3. TOHUM EKSTRAKSİYONU	39
4.3.4. YAĞ VE KAPSÜL EKSTRAKSİYONU	39
4.3.5. YBSK KOŞULLARI	40
4.3.6. GAZ KROMATOĞRAFİSİ – KÜTLE SPEKTROMETRESİ (GK-KS) KOŞULLARI	41
4.3.6.1. Gaz Kromatografisi - Kütle Spektroskopisi	41
4.3.6.2. Gaz Kromatografisi Koşulları	41
4.3.6.3. Yağ Asidi Profili İçin Yağ Asidi Metil Esterlerinin Oluşturulması.....	42
<u>5. ARASTIRMA BULGULARI</u>	<u>44</u>
5.1. ÖN UYGULAMA DENEMELERİNİN SONUÇLARI.....	44
5.1.1. ÇİMLENME HIZI	44

5.1.2. ÇİMLENME GÜCÜ.....	45
5.1.3. SAPÇIK UZUNLUĞU.....	46
5.1.4. KÖKÇÜK UZUNLUĞU	46
5.1.5. SAPÇIK YAŞ AĞIRLIĞI	47
5.1.6. SAPÇIK KURU AĞIRLIĞI.....	48
5.1.7. KÖKÇÜK YAŞ AĞIRLIĞI.....	48
5.1.8. KÖKÇÜK KURU AĞIRLIĞI	49
5.2. DOKU KÜLTÜRÜ ÇALIŞMALARININ SONUÇLARI.....	49
5.2.1. ÇÖREK OTUNDA İN VİTRO KOŞULLARDA SÜRGÜN REJENERASYONU	51
5.2.1.1. Farklı Dozlardaki TDZ'nin Çörek Otu Tohumlarındaki Sürgün Rejenerasyonu Üzerine Etkisi	51
5.2.1.2. Çörek Otu Rejenerasyonu Üzerine Farklı Dozlardaki Kinetin'nin Etkisi.....	55
5.2.1.3. Çörek Otu Rejenerasyonu Üzerine Farklı Dozlarda NAA ve BAP'ın Etkisi ...	57
5.2.2. ÇÖREK OTU TOHUMLARINDAN KALLUS ELDESİ VE FARKLI DOZLARDA 2.4.D. VE KİNETİN'İN KALLUS ELDESİ ÜZERİNE ETKİLERİ	60
5.3. YBSK İLE TİMOKİNON MİKTARI TAYİN ÇALIŞMALARININ SONUÇLARI.....	61
5.3.1. VALİDASYON ÇALIŞMASI.....	61
5.3.2. TİMOKİNON STANDARTININ ALANI VE KROMATOGRAMI.....	62
5.3.3. TİMOKİNON STANDARTININ KALİBRASYON DENKLEMİ , TESPİT LİMİTİ (LOD) VE ÖLÇÜM LİMİTİ (LOQ) DEĞERLERİ	63
5.3.4. SERA DENEMELERİNDEN ELDE EDİLEN TOHUMLARIN ALANLARI VE KROMATOGRAMLARI.....	63
5.3.5. TARLA DENEMELERİNDEN ELDE EDİLEN TOHUMLARIN ALANLARI VE KROMATOGRAMLARI.....	65

5.3.6. PİYASADAN TEMİN EDİLMİŞ ÇÖREK OTU TOHUMLARININ ALANLARI VE KROMATOGRAMLARI.....	67
5.3.7. PİYASADAN TEMİN EDİLMİŞ ÇÖREK OTU YAĞLARININ ALANLARI VE KROMATOGRAMLARI.....	73
5.3.8. PİYASADAN TEMİN EDİLMİŞ ÇÖREK OTU YAĞI KAPSÜLLERİNİN ALANLARI VE KROMATOGRAMLARI.....	79
5.4. GK-KS İLE YAĞ ASİDİ PROFİLİ ELDESİ ÇALIŞMALARI.....	85
5.4.1. PİYASADAN TEMİN EDİLEN ÇÖREK OTU YAĞLARININ GK-KS KROMATOGRAMLARI VE YAĞ ASİDİ PROFİLİ.....	85
5.4.2. PİYASADAN TEMİN EDİLEN ÇÖREK OTU YAĞI KAPSÜLLERİNİN GK-KS KROMATOGRAMLARI VE YAĞ ASİDİ PROFİLİ	87
<u>6. TARTISMA VE SONUC</u>	<u>90</u>
6.1. ÖN UYGULAMA ÇALIŞMALARI	90
6.2. DOKU KÜLTÜRÜ İLE ÇÖREK OTU TOHULARINDAN KALLUS ELDESİ.....	91
6.3. PİYASADAN TEMİN EDİLEN ÇÖREK OTU TOHUMU, TOHUM YAĞI VE TOHUM YAĞI KAPSÜLLERİ İÇERİSİNDEKİ TİMOKİNON MİKTARININ ARAŞTIRILMASI	93
6.4. PİYASADAN TEMİN EDİLEN ÇÖREK OTU TOHUM YAĞI VE TOHUM YAĞI KAPSÜLLERİNİN YAĞ ASİDİ PROFİLLERİNİN ÇIKARILMASI	96
<u>KAYNAKLAR.....</u>	<u>99</u>
<u>EKLER</u>	<u>108</u>
<u>ÖZGEÇMİS</u>	<u>110</u>
<u>10. TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR.....</u>	<u>111</u>

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Çörek otu (<i>Nigella sativa</i> L.) bitkisinin genel görünümü	2
Şekil 1.2. Eikosadienoik asit, Linoleik asit, Linolenik asit ve Oleik asitin kimyasal yapılarına ait görünüm.....	9
Şekil 1.3. Palmitik asit, Stearik asit ve Miristik asitin kimyasal yapılarına ait görünüm....	10
Şekil 1.4. Timokinon, Ditimokinon, Timol ve Timohidrokinon'un kimyasal yapılarına ait görünüm.....	11
Şekil 1.5. p-Simen, Karvakrol, Terpeneol ve t-Anetol'ün kimyasal yapıları.....	11
Şekil 1.6. Arjinin, Glutamik Asit, Lösin, Lisin, Metionin, Trosin, Prolin ve Treonin'in kimyasal yapılarına ait görünüm	12
Şekil 1.7. Nigellimin, Nigellimin N-oksit, Nigellisin, Nigellidin, Nigellamin A1 , A2 , A3 , A4 , A5 , B1, B2 ve C'nin kimyasal yapılarına ait görünüm	14
Şekil 1.8. α -hederin'in kimyasal yapısına ait görünüm.....	15
Şekil 4.1. Farklı süreler ile priming yapılmış tohumların ön denemesinin genel görünümü.	29
Şekil 4.2. Çörek otu tohumların laboratuvar koşullarında kontrol, %20 PEG ve saf su ile priming sonucunda çimlenmiş tohumlarının genel görüntüsü	30
Şekil 4.3. %4 Mannitol priming uygulaması sonucunda toprak+kum+gübre karışımı içeren saksılarda çimlenmiş fidelerin 2-3 yaprak aşamasında elde edilen bir görünüm.....	32
Şekil 4.4. Çörek otu tarla denemesi.....	33
Şekil 4.5. Kontrol ve %4 Mannitol ile ön muamele yapılmış tohumlardan gelişen bitkilerin Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü'ne ait tarladaki görüntüsü .	33
Şekil 4.6. %4 Mannitol uygulaması sonrası tohumların (A) sera koşullarda çimlenen bitkilerin (B) , çiçeklenen bitkilerin (C) ve hasat edilmiş kapsüllerin (D) genel bir görünümü.....	34
Şekil 4.7. Kotiledon boğumu eksplantlarından 0,5 (A) ve 0,75 mg/L (B) Kinetin içeren MS besin ortamından elde edilen sürgünlerin köklendirme aşaması	36
Şekil 4.8. Kallus elde etme amacıyla 0,75mg/L dozunda hazırlanan 2.4.D ortamına ekilen tohumların görüntüsü.....	37

Şekil 4.9. Çörek otu tohumlarında 1 mg/L 2.4 D + 0,05 mg/L KN içeren MS besi ortamından elde edilen kallus	37
Şekil 4.10. Kallus (A), kallus ekstraksiyonu (B) ve kallus ekstraksiyonunun filtre kağıdından süzülmesinin (C) genel görünümü	38
Şekil 4.11. Tohum ekstraksiyonunun genel görünümü	39
Şekil 4.12. Yağ ekstraksiyonunun genel görünümü	40
Şekil 4.13. YBSK cihazının şematik görüntüsü	41
Şekil 5.1. Çimlenme hızı (%)	45
Şekil 5.2. Çimlenme gücü (%)	45
Şekil 5.3. Çörek otu kotiledon boğumu eksplantlarından 0,25 mg/L (A) ve 0,5 mg/L (B) TDZ içeren MS besi ortamında elde edilen sürgünler	52
Şekil 5.4. Çörek otu kotiledon eksplantlarından 0,5 mg/L TDZ içeren MS besi ortamında elde edilen kalluslar	52
Şekil 5.5. Çörek otu kotiledon eksplantlarından 0.25 mg/L TDZ içeren MS besi ortamında elde edilen sürgün örneği	53
Şekil 5.6. Çörek otu kotiledon boğumu eksplantlarından 0,5 mg/L (A) ve 0,75 mg/L (B) TDZ içeren MS besi ortamında elde edilen sürgünler	53
Şekil 5.7. Kotiledon ve kotiledon boğumundan elde edilen sürgünlerin sayısı (adet)	54
Şekil 5.8. Kotiledon ve kotiledon boğumundan elde edilen sürgünlerin uzunluğu (cm)	54
Şekil 5.9. Çörek otu hipokotil eksplantlarından 0,25 mg/L TDZ içeren MS besi ortamında elde edilen kalluslar	55
Şekil 5.10. Çörek otu kotiledon boğumu eksplantlarından 0,5 mg/L (A) ve 0,75 mg/L (B) Kinetin içeren MS besi ortamında elde edilen kallusların görüntüsü	56
Şekil 5.11. Kotiledon ve hipokotil boğumlarından elde edilen sürgünlerin sayısı (adet) ...	57
Şekil 5.12. Kotiledon ve hipokotil boğumlarından elde edilen sürgünlerin uzunluğu (cm)	57
Şekil 5.13. Çörek otu kotiledon boğumu eksplantlarından 0,05 mg/L BAP ve 0.25 mg/L NAA içeren MS besi ortamında elde edilen sürgünler	58
Şekil 5.14. Kotiledon boğumundan elde edilen sürgünlerin sayısı (adet)	58

Şekil 5.15. Kotiledon boğumundan ve hipokotilden elde edilen kallus oranı(%).....	59
Şekil 5.16. Çörek otu hipokotil eksplantlarından 0.05 mg/L BAP + 0,5 mg/L NAA içeren MS besi ortamında elde edilen sürgünlerin (A) ve kallusların (B) görüntüsü.....	59
Şekil 5.17. Çörek otu kotiledon eksplantlarından 0,05 mg/L BAP + 0, 25 mg/L NAA içeren MS besi ortamında elde edilen kallusların (A) ve sürgünlerin (B) görüntüsü.....	60
Şekil 5.18 Çörek otu tohumlarında 1 mg/L 2.4 D + 0,05 mg/L KN içeren MS besi ortamından elde edilen kallusların görüntüsü.....	60
Şekil 5.19. Çörek otu tohumlarında 1 mg/L 2.4.D + 0,05 mg/L KN içeren MS besi ortamından elde edilen kallusların görüntüsü.....	61
Şekil 5.20. 2.4.D ve Kinetin (KN) 'in farklı dozlarının kallus oranı üzerine etkileri (%)...	61
Şekil 5.21. 1000 ppm konsantrasyondaki Timokinon standardının YBSK kromatogramı .	62
Şekil 5.22. Sera denemelerinden elde edilen kontrol tohumlarında YBSK kromatogramı.	64
Şekil 5.23. Sera denemelerinden elde edilen %4 Mannitol ile priming yapılmış tohumlara ait YBSK kromatogramı.....	64
Şekil 5.24. Sera denemelerinden elde edilen kontrol ve %4 Mannitol ile priming yapılmış tohumlardaki Timokinon miktarı	64
Şekil 5.25. Tarla denemelerinden elde edilen kontrol tohumlarında YBSK kromatogramı	65
Şekil 5.26. Tarla denemelerinden elde edilen %4 Mannitol ile priming yapılmış tohumlarında YBSK kromatogramı.....	66
Şekil 5.27. Tarla denemelerinden elde edilen kontrol ve Mannitol ile priming yapılmış tohumlarda timokinon miktarı	66
Şekil 5.28. Timokinon standardının metanollü ekstresine ait YBSK kromatogramı	68
Şekil 5.29. ÇT1 kodlu çörek otu tohumunun metanollü ekstresine ait YBSK kromatogramı	68
Şekil 5.30. ÇT2 kodlu çörek otu tohumunun metanollü ekstresine ait YBSK kromatogramı	69
Şekil 5.31. ÇT3 kodlu çörek otu tohumunun metanollü ekstresine ait YBSK kromatogramı	69

Şekil 5.32. ÇT4 kodlu çörek otu tohumunun metanollü ekstresine ait YBSK kromatogramı	70
Şekil 5.33. ÇT5 kodlu çörek otu tohumunun metanollü ekstresine ait YBSK kromatogramı	70
Şekil 5.34. ÇT6 kodlu çörek otu tohumunun metanollü ekstresine ait YBSK kromatogramı	71
Şekil 5.35. ÇT7 kodlu çörek otu tohumunun metanollü ekstresine ait YBSK kromatogramı	71
Şekil 5.36. ÇT8 kodlu çörek otu tohumunun metanollü ekstresine ait YBSK kromatogramı	72
Şekil 5.37. ÇT9 kodlu çörek otu tohumunun metanollü ekstresine ait YBSK kromatogramı	72
Şekil 5.38. ÇY1 kodlu çörek otu yağının metanollü ekstresine ait YBSK kromatogramı ..	74
Şekil 5.39. ÇY2 kodlu çörek otu yağının metanollü ekstresine ait YBSK kromatogramı ..	74
Şekil 5.40. ÇY3 kodlu çörek otu yağının metanollü ekstresine ait YBSK kromatogramı ..	75
Şekil 5.41. ÇY4 kodlu çörek otu yağının metanollü ekstresine ait YBSK kromatogramı ..	75
Şekil 5.42. ÇY5 kodlu çörek otu yağının metanollü ekstresine ait YBSK kromatogramı ..	76
Şekil 5.43. ÇY6 kodlu çörek otu yağının metanollü ekstresine ait YBSK kromatogramı ..	76
Şekil 5.44. ÇY7 kodlu çörek otu yağının metanollü ekstresine ait YBSK kromatogramı ..	77
Şekil 5.45. ÇY8 kodlu çörek otu yağının metanollü ekstresine ait YBSK kromatogramı ..	77
Şekil 5.46. ÇY9 çörek otu yağının metanollü ekstresine ait YBSK kromatogramı	78
Şekil 5.47. ÇY10 çörek otu yağının metanollü ekstresine ait YBSK kromatogramı	78
Şekil 5.48. ÇK1 kodlu çörek otu yağı kapsülünün metanollü ekstresine ait YBSK kromatogramı	80
Şekil 5.49. ÇK2 kodlu çörek otu yağı kapsülünün metanollü ekstresine ait YBSK kromatogramı	80
Şekil 5.50. ÇK3 kodlu çörek otu yağı kapsülünün metanollü ekstresine ait YBSK kromatogramı	81

Şekil 5.51. ÇK4 kodlu çörek otu yağı kapsülünün metanollü ekstresine ait YBSK kromatogramı	81
Şekil 5.52. ÇK5 kodlu çörek otu yağı kapsülünün metanollü ekstresine ait YBSK kromatogramı	82
Şekil 5.53. ÇK6 kodlu çörek otu yağı kapsülünün metanollü ekstresine ait YBSK kromatogramı	82
Şekil 5.54. ÇK7 kodlu çörek otu kapsülünün metanollü ekstresine ait YBSK kromatogramı	83
Şekil 5.55. ÇK8 kodlu çörek otu yağı kapsülünün metanollü ekstresine ait YBSK kromatogramı	83
Şekil 5.56. ÇK9 kodlu çörek otu yağı kapsülünün metanollü ekstresine ait YBSK kromatogramı.....	84
Şekil 5.57. ÇK10 kodlu çörek otu yağı kapsülünün metanollü ekstresine ait YBSK kromatogramı	84
Şekil 5.58. ÇY1 kodlu metillenmiş çörek otu yağına ait GK-KS kromatogramı.....	85
Şekil 5.59. ÇY2 kodlu metillenmiş çörek otu yağına ait GK-KS kromatogramı.....	85
Şekil 5.60. ÇY3 kodlu metillenmiş çörek otu yağına ait GK-KS kromatogramı.....	85
Şekil 5.61. ÇY4 kodlu metillenmiş çörek otu yağına ait GK-KS kromatogramı.....	86
Şekil 5.62. ÇY5 kodlu metillenmiş çörek otu yağına ait GK-KS kromatogramı.....	86
Şekil 5.63. ÇY7 kodlu metillenmiş çörek otu yağına ait GK-KS kromatogramı.....	86
Şekil 5.64. ÇY8 kodlu metillenmiş çörek otu yağına ait GK-KS kromatogramı.....	86
Şekil 5.65. ÇY9 kodlu metillenmiş çörek otu yağına ait GK-KS kromatogramı.....	86
Şekil 5.66. ÇK1 kodlu metillenmiş çörek otu yağı kapsülüne ait GK-KS kromatogramı ..	87
Şekil 5.67. ÇK2 kodlu metillenmiş çörek otu yağı kapsülüne ait GK-KS kromatogramı ..	87
Şekil 5.68. ÇK3 kodlu metillenmiş çörek otu yağı kapsülüne ait GK-KS kromatogramı ..	87
Şekil 5.69. ÇK4 kodlu metillenmiş çörek otu yağı kapsülüne ait GK-KS kromatogramı ..	87
Şekil 5.70. ÇK5 kodlu metillenmiş çörek otu yağı kapsülüne ait GK-KS kromatogramı ..	88

Şekil 5.71. ÇK6 kodlu metillenmiş çörek otu yağı kapsülüne ait GK-KS kromatogramı ..	88
Şekil 5.72. ÇK7 kodlu metillenmiş çörek otu yağı kapsülüne ait GK-KS kromatogramı ..	88
Şekil 5.73. ÇK8 kodlu metillenmiş çörek otu yağı kapsülüne ait GK-KS kromatogramı ..	88
Şekil 5.74. ÇK9 kodlu metillenmiş çörek otu yağı kapsülüne ait GK-KS kromatogramı ..	88
Şekil 5.75. ÇK10 kodlu metillenmiş çörek otu yağı kapsülüne ait GK-KS kromatogramı	89
Şekil 6. 1. Timokinon biyosentezinin olası yolağına ait görünüm	91
Şekil 6. 2. Çörek otu tohumundan yağ elde etmek için kullanılan soğuk pres makinesinin genel görünümü (A) ve makinenin dikkat edilmediğinde fazla ısınıp, yağın yüksek ısıya maruz kalarak yanmasına sebep olan parçasının (B) görünümü (Fotoğraf Prof. Dr. Maksut Coşkun tarafından çekilmiş olup izinleri alınarak kullanılmıştır).....	95

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Gaz Kromatografisi Sıcaklık Programı	42
Çizelge 5.1. Farklı Ön uygulamaların Yapıldığı çörek otunda çimlenme hızı ve gücü ortalamaları (%).....	44
Çizelge 5.2. Farklı ön uygulamaların yapıldığı çörek otunda sapçık uzunluğu ortalamaları (cm).....	46
Çizelge 5.3. Farklı ön uygulamaların yapıldığı çörek otunda kökçük uzunluğu ortalamaları (cm).....	47
Çizelge 5.4. Farklı ön uygulamaların yapıldığı çörek otunda sapçık yaş ağırlığı ortalamaları (mg)	47
Çizelge 5.5. Farklı ön uygulamaların yapıldığı çörek otunda sapçık kuru ağırlığı ortalamaları (mg).....	48
Çizelge 5.6. Farklı ön uygulamaların yapıldığı çörek otunda kökçük yaş ağırlığı ortalamaları (mg).....	48
Çizelge 5.7. Farklı ön uygulamaların yapıldığı çörek otunda kökçük kuru ağırlığı ortalamaları (mg).....	49
Çizelge 5.8. Farklı sterilizasyonlarda doz ve süre uygulanmasının çörek otunun çimlenmesi üzerine ait yüzdeler.....	50
Çizelge 5.9. Farklı sterilizasyon dozlarında, 10 dk. süresinde çörek otu tohumlarında kontamine oran yüzdeleri	50
Çizelge 5.10. Çörek otunda rejenerasyonu üzerine farklı TDZ dozlarının etkisine ait yüzde oranlar.....	51
Çizelge 5.11. Çörek otu rejenerasyonu üzerine farklı Kinetin dozlarının etkisine ait ortalama gruplandırması.....	55
Çizelge 5.12. Timokinon Standardının Kromatogram Alanları ve Ortalamaları	62
Çizelge 5.13. Kalibrasyon eğrisi formülü, tespit ve ölçüm limitleri	63
Çizelge 5.14. Sera denemelerinde elde edilen tohumlarda Timokinon miktarı	63

Çizelge 5.15. Tarla denemelerinde elde edilen tohumlarda Timokinon miktarı.....	65
Çizelge 5.16. Piyasadan temin edilen çörek otu tohumlarının alanları ve içerisindeki % timokinon miktarları [marka isimleri ÇT (Çörek otu tohumu) olarak kısaltılmıştır].....	67
Çizelge 5.17. Piyasadan temin edilen çörek otu yağlarının alanları ve içerisindeki % timokinon miktarları [marka isimleri ÇY (Çörekotu yağı) olarak kısaltılmıştır].....	73
Çizelge 5.18. Piyasadan temin edilen çörek otu yağlarının alanları ve içerisindeki % timokinon miktarları (marka isimleri ÇY (Çörek otu yağı) olarak kısaltılmıştır).....	79
Çizelge 6. 1. Daha önce yapılan çalışmalar derlenerek oluşturulan çörek otu tohum yağına ait yağ asidi miktarlarının tahmini aralıklarını içeren yağ asidi profili	97



SİMGELER DİZİNİ

µg	Mikrogram
L	Litre
cm	Santimetre
mm	Milimetre
kg	Kilogram
g	Gram
PEG	Poli Etilen Glikol
KCl	Potasyum Klorür
dk	Dakika
K ₃ PO ₄	Tripotasyum Fosfat
KNO ₃	Potasyum Nitrat
DNA	Deoksiribonükleik asit
KH ₂ PO ₄	Monopotasyum Fosfat
RNA	Ribonükleik asit
GK-KS	Gaz Kromatografisi- Kütle Spektrometresi
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
YBSK	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
NP-HPLC	Normal Fazlı Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
HPLC-MS	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi – Kütle Spektrometresi

MIC	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
GSH	Glutasyon
LPX	Lipitperoksit
I/R	İskemik/Reperfüzyon
LDH	Laktat dehidrogenaz
SOD	Süperoksit dismutaz
TIC	Toplam iyon taraması
akb	Atomik kütle birimi
RF	Radyo frekansı
DC	Doğru akım
CI	Kimyasal iyonizasyon
EI	Elektron bombardımanı ile iyonizasyon
CIMS	Kimyasal iyonlaşmalı kütle spektrometresi
SIM	Seçilmiş iyon taraması
PTZ	Pentilanetetrazol
MES	Maksimal elekteroşok
t-PA	doku-tipi plaminojen aktivatör
u-PA	ürokinaz-tipi plaminojen aktivatör
PAI-I	Plasminojen aktivatör inhibitör tip I

1. GİRİŞ

Tıbbi bitkiler ve bitkisel tıbbi preparatlar yüzyıllardan beridir kullanılmakta ve günümüzde halen kullanılmaya devam edilmektedir. Tıbbi bitkilerden hazırlanan ve modern ilaç formları kullanılarak hazırlanan bu preparatlara günümüzde farklı ülkelerde bitkisel ürünler, bitkisel ilaçlar, fitoterapötikler, bitkisel tedaviler, fitofarmasötikler ve geleneksel tedavi edici ilaçlar gibi farklı isimlerle anılmaktadırlar. Avrupa Birliği ülkelerinde bu karmaşaya son vermek ve ortak bir terim kullanmak amacıyla AIDA (Avrupa İlaç Değerlendirme Ajansı) tarafından bu tür ürünlere “Tıbbi Bitkisel Ürünler” (Herbal Medicinal Products) teriminin kullanılmasına karar verilmiştir (1).

Dünya Sağlık Örgütü'nün (World Health Organization) 1980'lerin başında yaptığı bir çalışmada, bitkisel ürünlerin; temel sağlık ihtiyaçlarının karşılanmasında dünya nüfusunun %80'ini tarafından kullandığını ortaya çıkmıştır. Bitkisel ürünlere olan ilginin Avrupa ülkelerinde gittikçe artması ile bu ülkelerde standartların olgunlaştırılması konusu da önem kazanmıştır. Bu konuda Mayıs 1997'de EMEA Bünyesinde “Tıbbi Bitkisel Ürünler Çalışma Grubu” Avrupa Parlamentosu ve Avrupa Komisyonu tarafından kurulmuş ve standartların olgunlaştırılma çalışmalarına başlanmıştır (1).

Tıbbi Bitkisel Ürünler en basit olarak şu şekilde tarif edilebilir:

Bitkileri veya bitkilerin çeşitli kısımlarının direkt olarak veya çeşitli işlemlerden geçirildikten sonra hazırlanan ambalajlanmış şekilde ticarete sunulan tıbbi ürünler veya farmasötik preparatlardır. Hastalıkları iyileştirmek, şiddetini hafifletmek, hastalıklardan korunmak, tedaviye yardımcı olmak veya teşhis amacıyla kullanılmaktadır (1).

Nigella sativa, halk arasında çörek otu, *kara tohum*, *siyah kimyon* veya *bereket tanesi* olarak da isimlendirilmektedir. Bitki Avrupa, Kuzey Afrika ve Anadolu'da yabani tür olarak bulunur.

Şekil 1.0'de resmi verilen çörek otu (*Nigella sativa* L.); 20-40 cm boyunda, az çok tüylü, haziran-temmuz ayları arasında mavimsiyah renkli 5 parçalı çiçekler açan, gövde dik ve kısa tüylü, alt yaprakları saplı, üst yaprakları sapsız, çiçekleri uzun saplı ve tek tek olan, meyvesi ise 2,5-4 mm uzunluğunda 1,5-2 mm uzunlukta siyah renkli, acımtırak tadı olan

ve karakteristik kokulu tohumları içeren kapsül şeklinde olan ve Türkiye’de iç Anadolu da kültüre alınmış tek *Nigella* türü olan ve ülkemizde iyi bilinen ve yaygın olarak kullanılan baharatlardandır (Şekil 1.1.) (2,3).



Şekil 1.1. Çörek otu (*Nigella sativa* L.) bitkisinin genel görünümü

Bitkinin ekimi ilkbahar aylarında gerçekleştirilir ve çiçeklenme zamanı iklim şartlarına bağlı olmakla birlikte, normal mevsim şartlarında haziran-temmuz aylarında çiçek açar. Hasat zamanı ise, kapsüller koyu kahverengi olunca (Ağustos-Eylül ayları arasında) gerçekleştirilir. Verim ise; yine iklim şartlarına, tarım tekniğine ve toprağın yapısına bağlı olarak değişmekle birlikte, ortalama olarak 170-240 kg tohum/dekar arasında gerçekleştiği belirtilmektedir (4). Bu türün en büyük özelliklerinden biri de, bitkinin gelişimi çok hızlı olduğu için ikinci ürün olarak da tarımı yapılabilecek özelliğindedir.

Nigella sativa bitkisi çok dikkat çekici bir tarihsel ve dinsel geçmişe sahiptir (98). Tarihsel olarak, *Nigella sativa* tohumlarının eski Mısırlı ve Yunanlı hekimler tarafından diş ağrılarında, migrende, burun tıkanıklığında, ve bağırsak kurtlarında tedavi amaçlı kullanıldığı ve ayrıca, menstürel dönem düzenleyici ve anne sütü artırıcı olarak da reçetelendiği kaydedilmiştir (4,5,6).

HZ. MUHAMMED (S.A.V.) ise hadislerinde "Çörek otuna kıymet verin, zira o ölümden başka her derde şifadır" buyurmuştur. Ayrıca çörek otundan; Hippokrates ve Dioscorides'in eserlerinde "Melanthion" adı kullanılarak söz edilmiştir. Avrupa ülkelerinde Ortaçağ'ın başlarında önem kazanan çörek otu, Alman krallarından Ludwig der Fromme ve Büyük Karl, ülkelerinde çörek otu tarımına başlamıştır. 1031 yılında İbn-i Sina'nın eserlerinde çörek otunun tedavi edici etkilerini açıklamasıyla, çörekotu önemli bir tıbbi bitki haline gelmiştir. Çörek otu, halk arasında 1750'li yıllara kadar yılan ısırıkları, kuduz ve tümörlerin tedavisinin yanı sıra, iltihap önleyici ve anne sütü artırıcı olarak yaygın bir şekilde kullanılmıştır. Bu ihtişamlı geçmişe rağmen batılı ülkelerde yaklaşık 200 yıl kadar unutulduktan sonra, 21. Yüzyılın başlarında tesadüfen yeniden keşfedilmiştir (7,8).

Çörek otu bitkisinin tohumları halk hekimliğinde mide ile ilgili hastalıkların tedavisinde, bağırsaklarda gaz giderici ve idrar sökücü olarak da kullanılmaktadır (4). Astım, bronşit gibi solunum yolu hastalıklarının yanı sıra, dizanteri, hipertansiyon enfeksiyonlar, obezite, kas ve eklem ağrıları dahil geniş bir hastalık grubunun tedavisinde geleneksel ilaç olarak Uzak Doğu ve Orta Doğu halkı tarafından uzun süredir kullanılmaktadır. Egzama ve deri hastalıklarında kullanılması da dünya genelinde kabul edilmiştir (9,10).

Bu bitkinin tohumları ve tohumlarından elde edilen materyallerden; çok sayıda farmakolojik özellikleri nedeniyle birçok hastalığın tedavisinde faydalanılmaktadır. Örneğin, tansiyon düşürücü (11), idrar sökücü ve anne sütü artırıcı, iştah açıcı ve adet söktürücü olarak kullanılmakta olup, ayrıca çörek otu yağı; saç dökülmesini ve kepeği önlemek amacıyla başa sürülerek kullanılmaktadır (6). Tohum yağının en önemli tıbbi uygulaması, müshil ilaçlarında koku ve tadı değiştirici olarak kullanılmasıdır. Bunlara ilaveten çörek otu tohumu, sabit ve uçucu yağ bileşenlerinin çok sayıda farmakolojik etkiye sahip olduğu yapılan bilimsel çalışmalar neticesinde belirlenmiştir. Türkiye'nin değişik yörelerinden toplanan çörek otu tohumları sabit yağ ve uçucu yağ bileşimlerinin

belirlenmesi üzerine yapılan bir çalışmada; tohumların % 0,09 - 0,36 uçucu yağ ve %24,96 - 37,17 sabit yağ içerik değerlerine sahip olduğu belirlenmiştir (12). Çörek otu tohumları; uçucu yağ ve sabit yağ yanında aynı zamanda acı madde ve saponinler de içermektedir.

Çörek otu sarılık hastalığına da iyi gelmektedir (13). Çörek otu tohumlarından çıkarılan sabit yağın saç dökülmesini engellediği ve kepek oluşumuna karşı da kullanıldığı bildirilmektedir. *Nigella* sp.'nin bazı türlerinin tohumlarının baharat olarak ve bunlardan elde edilen uçucu yağın güzel kokusu sebebiyle bazı ilaçların yapımında hoş olmayan kokuyu ve tadı değiştirmede kullanıldığını belirtmiştir (14,15).

Çörek otu tohumu ve bileşenlerinin, anti-tümör (16), anti-bakteriyel (17), antioksidan (18) etkilere sahip olduğu ve bağışıklılık sistemini güçlendirdiği (2) gibi daha birçok faydalı farmakolojik etkiye sahip oldukları belirlenmiştir. Türkiye'de yetişen tohumlarda yapılan çalışmaların çoğu, çörek otu yağı ve yağ asitlerinin karakterizasyonu üzerinedir (12,19).

Çörek otu tohumları ekmek, çörek, bisküvi gibi fırın ürünleri ile tulum, çökelek gibi bazı peynir çeşitlerinde kullanılmaktadır (20). Halk arasında kavrulmuş tozu bal ile karıştırılıp sabahları kuvvetlendirici olarak alınmaktadır (15). İnsan ve hayvanlarda hastalığa neden olan ve ayrıca gıda zehirlenmelerine yol açan Gram negatif (*Escherichia coli*), Gram pozitif (*Staphylococcus aureus*) ve patojenik bira mayası (*Cveida albicans*)'nda *Nigella sativa* tohum ekstrelerinin anti-mikrobiyal etkisi sonucu bu bakterilerin gelişimini engellediği konusunda olumlu sonuçlar alınmıştır. Bu nedenle çörek otunun gıda bozulması ve gıda zehirlenmelerine karşı kullanılabileceği ümidi güç kazanmıştır.

Çörek otunun ilk hasat bilgilerine ait kanıtlar yetersiz olmasıyla birlikte Tutankamon'un mezarı dahil birçok antik Mısır mezarlarına kalıntılara rastlanmıştır. Antik Mısır kültüründeki yeri tam olarak bilinmemesine rağmen, Firavunun mezarına ölümden sonraki yaşam için konulduğu düşünülmektedir (21).

Ülkemizde çörek otu üretiminin en sık görüldüğü iller; Gaziantep, Isparta, Amasya, Afyon, Burdur, İstanbul, Mersin ve Kahramanmaraş'tır (13). Çörek otunda en uygun ekim nöbeti çapa bitkilerinden sonra gelmektedir. Ekimden hemen önce toprağın çok iyi hazırlanması ve ilkbaharda mümkün olduğu kadar erken ekilmesi gerekmektedir.

Çörek otu bitkisinin çiftlik gübresine hassastır dolayısı ile doğrudan uygulama yapılmaması gerekmektedir (4).

Çörek otu tohumunun besinsel değeri üzerine yapılan bir çalışmada, Türkiye, Hindistan ve Suriye kökenli çörek otu tohumlarının protein etkinliği incelenmiştir. Yapılan çalışmalar neticesinde numunelerin protein içeriklerinin (g/kg) ve kalorifik değerlerinin 241 (Hindistan, 23,03 mJ/kg), 209 (Suriye; 22,19 mJ/kg) ve 213 (23,52 mJ/kg; Türkiye) olduğu belirtilmiştir (22).

Tarımsal bir üretimde yüksek verimin elde edilmesi açısından ekilen tohumun tek formda, hızlı ve eksiksiz olarak çimlenmesi oldukça önemlidir. Sıcaklık, nem, toprak tuzluluğu gibi çevresel ve coğrafi faktörler çimlenmeyi etkilemekte (23,24) ve eşzamanlı çimlenmeye engel olmakla beraber çimlenme ve çıkış oranını azaltarak istenen bitki sıklığının sağlanamamasına neden olmaktadır. Özellikle Ekim ayında toprak sıcaklığının düşük olması, hızlı çimlenme ve çıkış için uygun şartların oluşmasını engellemektedir. Uygun olmayan bu şartlarda çıkış yapan fidelerin büyüme hızı yavaş olmakta ve toprak ile tohum kökenli patojenlere karşı hassasiyet göstermektedirler (25).

Çimlenme ve çıkış esnasında yaşanabilecek bütün olumsuzlukları gidermek, eğer varsa dormansiyi (dinlenme, çimlenme durgunluğu) kırmak, yeterli bir fide eldesi ve verime ulaşmak amacıyla tohumlar ekim öncesi genel olarak priming adı verilen çeşitli uygulamalara tabi tutulmaktadır (26).

Ön uygulama işlemi; tohumun su ve değişik kimyasallar ile muamele edilmesinde çimlenmenin ilk aşamasının gerçekleşmesi ve kökçük çıkışı meydana gelmemesi olarak tanımlanmaktadır. Priming; tohumda lipid peroksidasyonunun etkisini azaltan enzim aktivitesini arttırmaktadır. Ayrıca, osmo priming lipid peroksidasyonunu önleyici enzimlerin (superoksit dismutaz, katalaz, glutatyon reduktaz) aktivitelerini arttırmaktadır (27).

Priming çalışmaları, genelde sıcaklık ve nem gibi tohumların çimlenme oranlarını azaltıcı etki yapan olumsuz çevre koşullarına karşı tohumların çimlenme süresini kısaltmak, çimlenme oranını arttırmak ve güçlü fide çıkışı sağlayarak bitkide oluşacak zararı en aza indirmek için birçok bitki türünde uygulanmaktadır (28).

Ön uygulama; otuz yılı aşkın süredir pek çok sebze, tahıl ve çiçek türünde hızlı ve uniform fide çıkışı için temel bir tohum uygulaması olmuştur. Priming terimi, “kötü çevre koşulları altında çimlenme ve fide çıkışını hızlandırmak amacıyla yapılan ekim öncesi tohum uygulamaları” olarak tanımlanmaktadır. Priming uygulaması tohum neminin çimlenme eşiğine kadar artırılarak bazı biyokimyasal olayların tetiklenmesi ve ekimden sonra çıkışın hızlandırılması esasına dayanmaktadır (29). Priming uygulamalarında yaygın olarak Poli Etilen Glikol (PEG), Mannitol, Gliserol, Sukroz gibi ozmotik stres oluşturan ozmolitler; KCl, K₃PO₄, KNO₃, KH₂PO₄ gibi ozmotik çözeltiler ve K, Na ve Mg gibi inorganik tuzlar kullanılmaktadır (30,31,32).

Tohumda priming uygulamasının ilk aşamasında bir miktar DNA sentezlenmekle birlikte hücre büyümesi olmakta, dolayısıyla embriyo iki kat büyümektedir. Bu esnada artan mRNA ve özellikle protein sentezi hücre büyümesine doğrudan etki etmektedir. Aynı zamanda enzim ve diğer metabolik faaliyetler de artmaktadır (32).

Priming uygulamaları sayesinde başta tuzluluk (33,34) olmak üzere, abiyotik stres ve birçok olumsuz çevre ve toprak koşullarında (27,35) çimlenmenin arttığı ve hızlandığı kabul edilmiştir.

Standardizasyon, fitoterapinin temel koşuludur. Standardizasyon; bitkisel drogtan elde edilen bir ürünün, bir madde üzerinden veya etkinliği bilinen bir madde veya madde grubu üzerinden yardımcı maddeler, bitkisel drog ya da ürünle karıştırılarak ayarlanmasıdır. Standardize bir ekstreden hazırlanan bitkisel ilacın; kolayca doze edilebilmesi, istenen optimum etkinin sağlanması ve her kullanımda aynı etkiyi oluşturması gibi avantajları vardır (36).

Doğadan doğrudan toplanan tıbbi ve aromatik bitkiler ile üretimi yapılanları arasında standardizasyon farklılıkları mevcuttur. Kalite standartları açısından bakıldığında, kaynağı üretimden elde edilen bitkilerin, diğerlerine göre yüksek kalitede ve sanayi standartlarında olduğu görülmektedir. Bitkisel çay ve baharat olarak doğrudan kullanılan bitkiler için ülkemizde Türk Standartları Enstitüsü (TSE) tarafından belirlenen kalite standartları mevcuttur. Ancak, ülkemizde ticareti yapılan pek çok ham madde ve ürün için belirlenen standartlar bulunmamakta ve mevcut standartların da ivedilikle yeniden gözden geçirilmesi gerekmektedir (37).

1.1. *NIGELLA SATIVA* L. BOTANİK ÖZELLİKLERİ

1.1.1. BİTKİNİN SİSTEMATİKTEKİ YERİ

Bölüm : Spermatophyta

Altbölüm : Angiospermae

Sınıf : Dicotyledonae

Takım : Ranales

Familiya : Ranunculaceae

Cins : *Nigella*

Tür : *Nigella sativa* L.

(38)

1.1.2. RANUNCULACEAE FAMILYASININ ÖZELLİKLERİ

Kuzey yarım kürenin ılıman ve soğuk yörelerinde yetişen, bir veya çok yıllık, çoğu otsu, bir kısmı çalı formunda veya tırmanıcı, nemli yerleri seven bitkilerdir. Yapraklar alternan dizilişli, bazen opozit veya hepsi tabanda toplanmıştır. Lamina tam, az veya çok parçalı, pennat veya palmat damarlıdır. Çiçekler aktinomorf veya zigomorf, hermafrodit, parçaları asiklik dizilişlidir. Periant, ya kaliks-korolla şeklinde ayrılmıştır ya da petaloittir; üyeleri serbesttir. Çoğunlukla nektaryum görülür; bazen petaller bazen stamenler nektaryum şekline dönüşmüştür; entemogamdır. Reseptakulum konveks ve uzamıştır. Stamenler çok sayıda; ovaryum bir veya çok karpelli ve apokarp, ovüller tek veya çok sayıdadır. Bu familyada, folikül (*Helleborus*), nuks (*Anemone*), kapsula (*Nigella*) ve bakka (*Actea*) gibi değişik meyva tiplerine rastlanır. Nuks tipindeki meyvalarda, uzun ve tüylü stilüs görülebilir (*Pulsatilla*) veya meyva üzerinde çengeller vardır (*Ranunculus arvensis*).

Bazı nuks meyvalarda rüzgarda uçmayı, suda yüzmeyi kolaylaştırıcı kanatlar gelişmiştir. Yeryüzünde 35 Anadolu'da 17 cinsi yetişen, zehirli bitkilerin bulunduğu çok zengin ve önemli bir familyadır (15, 38).

1.1.3. CİNS ÖZELLİKLERİ

Yeşilimsi açık mavi çiçeklerin altında ince involukrum'ları bulunan, 30-40 cm boyunda otsu, tek yıllık bitkilerdir. Çiçek örtüsü perigon şeklindedir, dış dairede açık mavi ve oval 5, iç dairede loplulu ve nektaryum'lu 5-8 adet tepal bulunur. Stilus altta birleşmiş, uçta birkaç parçalı ve dışa kıvrıktır (15).

1.1.4. *NİGELLA SATİVA* L.'NİN ÖZELLİKLERİ

Orta ve Batı Anadolu' da kültürü yapılan, çiçekleri açık mavi ve aktinomorf olan tek yıllık bir türdür. İnvolutrum filiform parçalıdır. Stiluslar foliküllerin tepesinde, kalıcıdır. Tohumlar çok sayıda, siyah renkli ve köşelidir. Çalı tipinde, kendiliğinden dalları olan, beyaz veya soluk renkten, koyu mavi renge değişen çiçeklere sahiptir. Kendi kendini döller ve çok sayıda beyaz ve üç kenarlı olan bir meyve kapsülü oluşturur. Bu meyve kapsülü olgunlaştığında, açılır ve içerisinde bulunan tohumlar havayla temasa geçer ve siyah renk alır (10, 38).

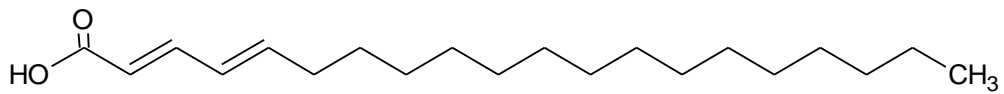
1.2. KİMYASAL BİLEŞİKLER

1.2.1. SABİT YAĞ

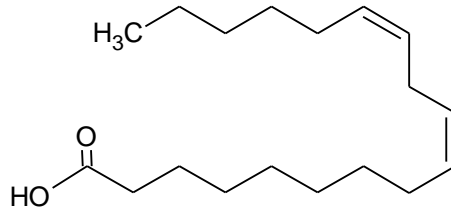
Nigella sativa tohumları % 32-40 sabit yağ içermektedir (9). Bu yağ doymamış ve esansiyel yağ asitleri açısından zengindir. Toplam lipidlerin kimyasal karakteristikleri ve yağ asidi profili, en önemli doymamış yağ asidinin linoleik asit olduğunu ve ardından oleik asit geldiğini ortaya koymuştur. Ayrıca sabit yağ β -sitosterol bakımından zengindir (10,39,40). Sabit yağın kimyasal analizleri; yağın % 85' inin doymamış yağ asitleri olduğunu göstermiştir (41).

1.2.1.1. Doymamış Yağ Asitleri

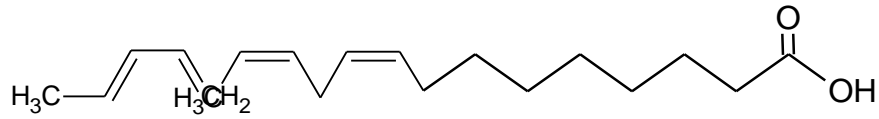
Nigella sativa sabit yağı %21.9 oleik asit, %60.8 linoleik asit, %1.7 eikosadienoik asit, eser miktarda araşidonik asit ve linolenik asit içermektedir (9,19).



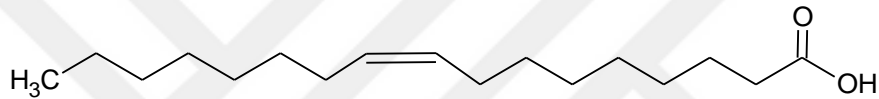
Eikosadienoik Asit



Linoleik Asit



Linolenik Asit



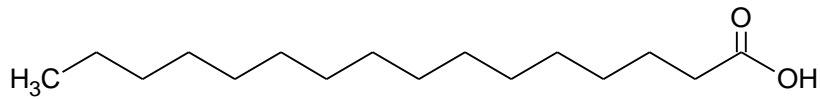
Oleik Asit



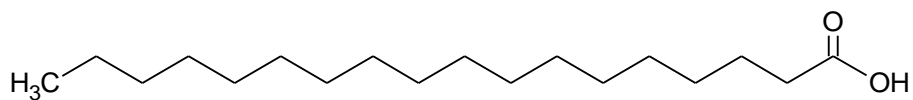
Şekil 1.2. Eikosadienoik asit, Linoleik asit, Linolenik asit ve Oleik asitin kimyasal yapılarına ait görünüm

1.2.1.2. Doymuş Yağ Asitleri

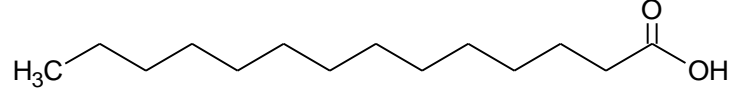
Nigella sativa sabit yağı doymuş yağ asidi olarak %1,2 miristik asit, %11,4 palmitik asit ve %2,9 stearik asit içermektedir (Şekil 1.3.) (19).



Palmitik Asit



Stearik Asit



Miristik Asit

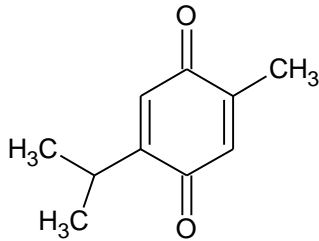
Şekil 1.3. Palmitik asit, Stearik asit ve Miristik asitin kimyasal yapılarına ait görünüm

1.2.2. KİNONİK BİLEŞİKLER

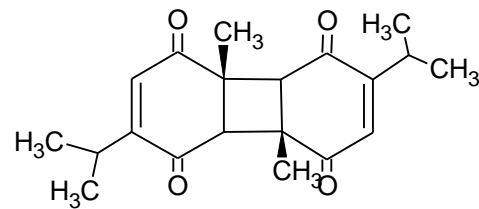
Nigella sativa tohumlarında timokinon, ditimokinon (nigellone), timohidrokinon ve timol bileşikleri majör bileşikler olarak kabul edilmiştir (Şkil 1.4.). *Nigella sativa* sabit yağında YBSK analizi sonucu timokinon 5.26×10^{-2} , timohidrokinon 7.76×10^{-4} ve timol 9.12×10^{-3} oranında saptanmıştır (42).

Yapılan bir çalışmada, çörek otu yağında bulunan, farmakolojik etkiye sahip olan bileşenlerin miktarının YBSK yöntemiyle analiz edilmesi sonucunda; timokinon (0,0526 g/100g), timohidrokinon (0,000767 g/100g), ditimohidrokinon (0,000212 g/100g değerinin altında) ve timol (0,00912 g/100g) olarak belirlendiği rapor edilmiştir (42).

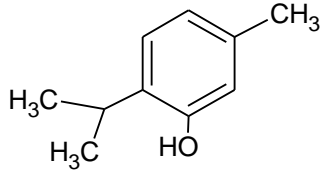
Nigella sativa tohumlarının majör bileşiği olan timokinon ilk olarak 1959 yılında sentez edilmiştir (43). Timokinon 5-izopropil-2-metil-1,4-benzokininon yapısındadır. Sabit yağda %27.8 - 57.0 oranında bulunur (44).



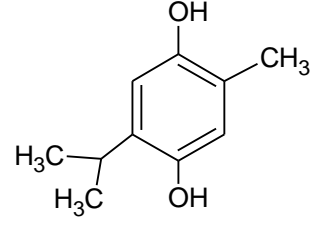
Timokinon



Ditimokinon



Timol

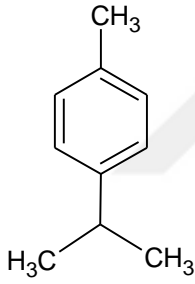


Timohidrokinon

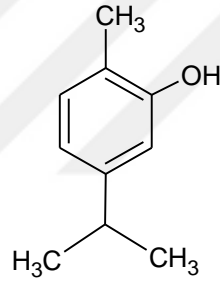
Şekil 1.4. Timokinon, Ditimokinon, Timol ve Timohidrokinon'un kimyasal yapılarına ait görünüm

1.2.3. UÇUCU YAĞ

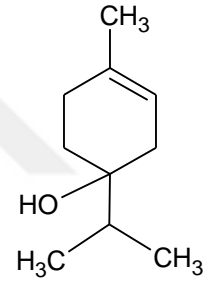
Nigella sativa tohumları %0.4-2.5 oranında uçucu yağ içermektedir (44). Uçucu yağın GK-KS analizi sonucu p-simen (% 7.1 -% 15.5) karvakrol (% 5.8 - % 11.6), t-anetol (% 0.25 - % 2.3), 4-terpineol (% 2.0 - % 6.6) ve longifolin (% 1.0 - 8.0) saptanmıştır (9,45).



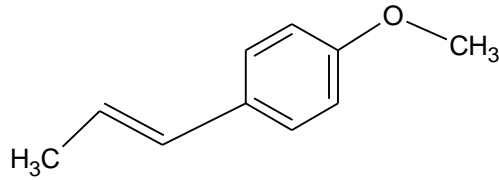
p-Simen



Karvakrol



Terpineol

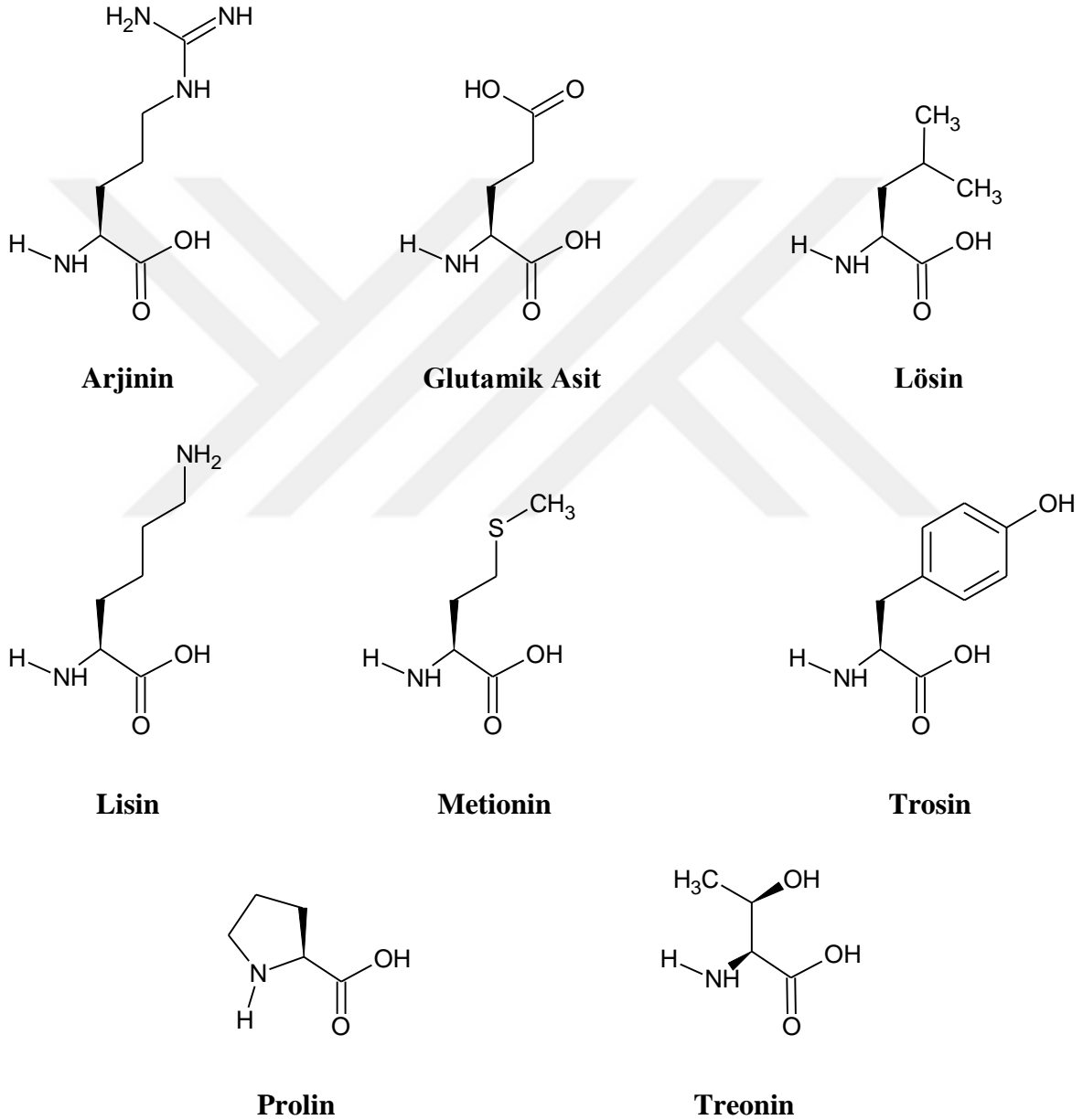


t-Anetol

Şekil 1.5. p-Simen, Karvakrol, Terpineol ve t-Anetol'ün kimyasal yapıları

1.2.4. PROTEİNLER

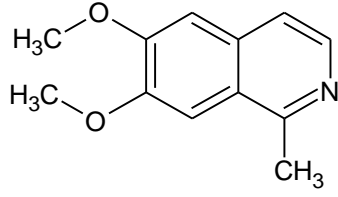
Tüm *Nigella sativa* tohumlarının SDS-PAGE kullanılarak yapılan fraksiyonlanması sonucu moleküler kütlesi 10 ila 94 arasında değişen bir dizi protein bandı bulunduğu görülmüştür (46). *Nigella sativa* tohumlarında ham protein oranı %20 ile %27 arasında olarak bulunmuştur (39). Dokuz temel amino asitten 8 'i bulunmakta olup bu amino asitler arjinin, glutamik asit, lösin, lizin, metionin, trosin, prolin ve treonin' dir (Şekil 1.6.) (9,10,47).



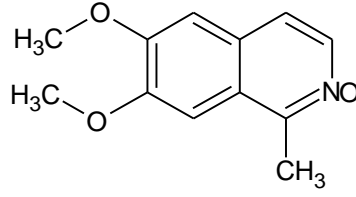
Şekil 1.6. Arjinin, Glutamik Asit, Lösin, Lysin, Metionin, Trosin, Prolin ve Treonin'in kimyasal yapılarına ait görünüm

1.2.5. ALKALOİDLER

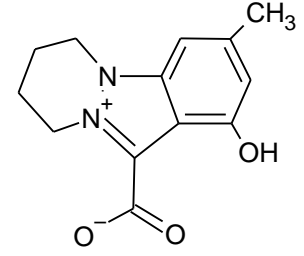
Nigella sativa tohumlarında bulunan majör alkaloidlerden nigellisin ve nigellidin imidazol halkası; nigellimin ve nigellimin N-oksit izokinolein halkası taşımaktadır (44). Ayrıca 8 adet tropan alkaloidleri içermektedir. Bunlar Nigellamin A1 , A2 , A3 , A4 , A5 , B1, B2 ve C' dir (Şekil 1.7.) (48).



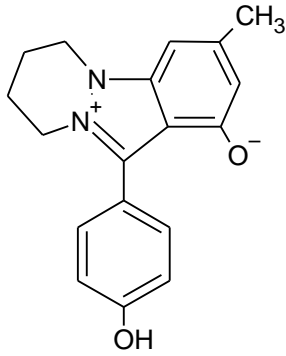
Nigellimin



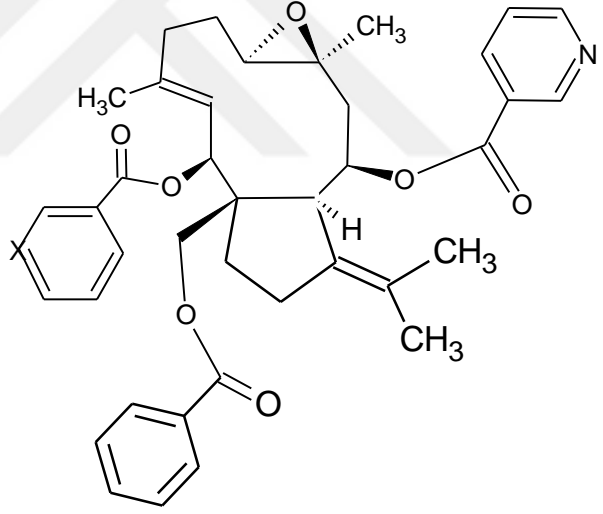
Nigellimin N-oksit



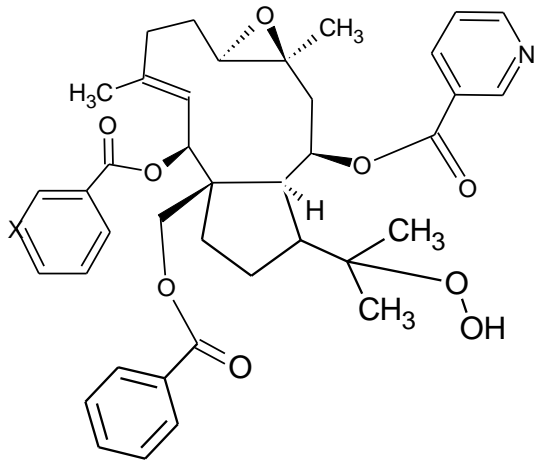
Nigellisin



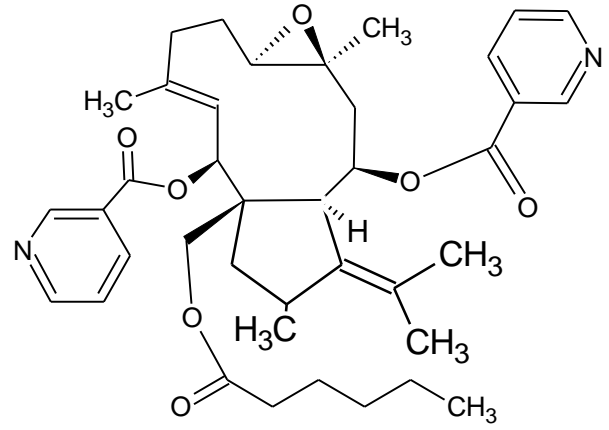
Nigellidin



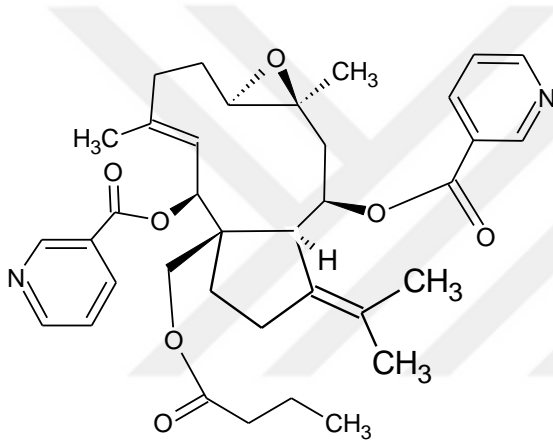
Nigellamin A1: X=CH, N. A2: X=N



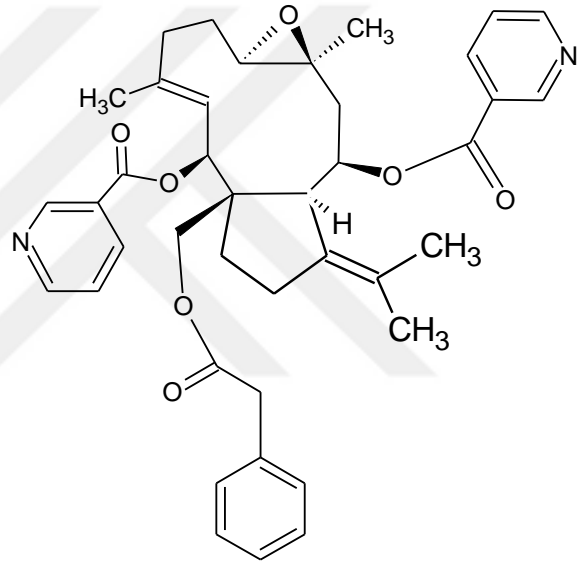
Nigellamin B1: X=CH, N. B2: X=N



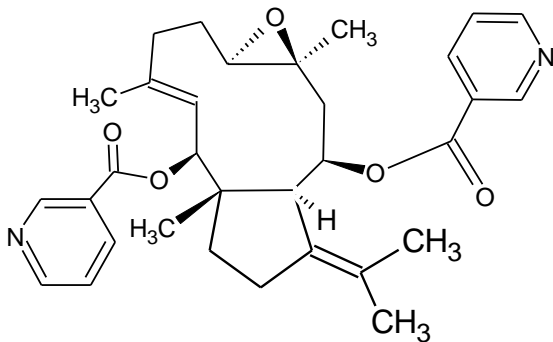
Nigellamin A3



Nigellamin A4



Nigellamin A5

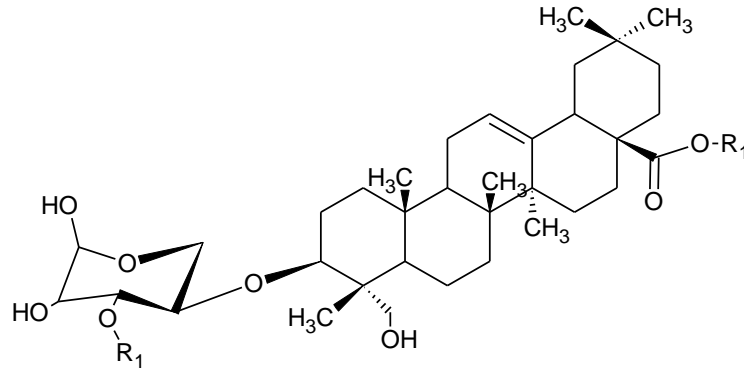
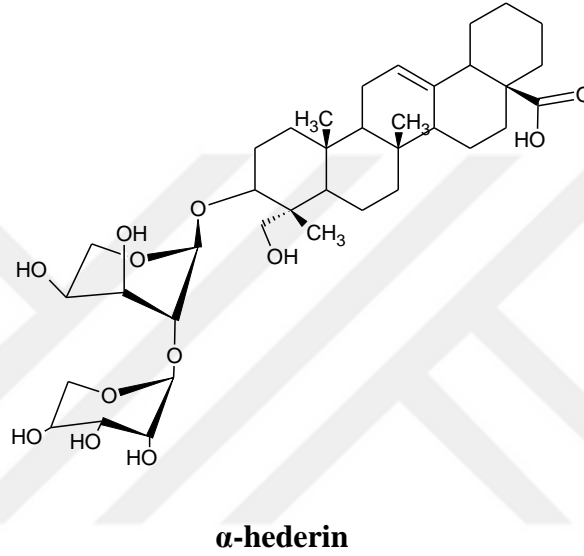


Nigellamin C

Şekil 1.7. Nigellimin, Nigellimin N-oksit, Nigellisin, Nigellidin, Nigellamin A1 , A2 , A3 , A4 , A5 , B1, B2 ve C'nin kimyasal yapılarına ait görünüm

1.2.6. SAPONOZİTLER

Nigella sativa tohumları triterpen yapısında α -hederin, 3-O-[β -D-ksilopiranosil-(1 \rightarrow 3)- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranosil]-28-O-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-glikopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glikopiranosil]-hederagenin (**1**), 3-O- α -Lramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranosil]-28-O-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -Dglikopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glikopiranosiyil]-hederagenin (**2**) ve 3-O-[β -Dksilopiranosil-(1 \rightarrow 3)- α -Lramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranosil]-hederagenin (**3**) taşımaktadır (12).



R1

- 1 β -D-ksil(1 \rightarrow 3)- α -L-ra
- 2 α -L-ra
- 3 β -D-ksil(1 \rightarrow 3)- α -L-ra

R2

- α -L-ra(1 \rightarrow 4)- β -D-gli(1 \rightarrow 6)- β -D-gli
- α -L-ra(1 \rightarrow 4)- β -D-gli(1 \rightarrow 6)- β -D-gli
- H

Şekil 1.8. α -hederin'in kimyasal yapısına ait görünüm

1.2.7. DİĞER BİLEŞİKLER

Nigella sativa tohumları kumarinlerden 6-metoksi kumarin, 7-hidroksi kumarin ve 7-oksi kumarin içermektedir (9).

Ayrıca *Nigella sativa* tohumları vitamin ve mineral yönünden zengindir. 100g tohumda 831 µg B1 (tiamin), 63 µg B2 (riboflavin), 789 µg B6 (pridoksin) 6311 µg B3 (niasin), 42 µg B9 (Folik asid) (19) , karotenoit, α- tokoferol, γ-tokoferol ve t-retinol ihtiva eder (49). Ayrıca 1 kg tohum 105mg Fe, 18.4mg Cu, 596.0mg Na, 5257.0mg K, 1859.0mg Ca, 60.4mg Zn , 5265.0mg P ve 0.16mg Se gibi mineralleri de içerir (22).

Nigella sativa tohumlarında nem içeriğinin % 5,2 ile % 7,43 arasında, kül % 3,77 ile % 4,92 arasında ve karbonhidrat oranı miktarı % 23,5 ile % 33,2 arasında değişmektedir (39).

2. KURAMSAL TEMELLER

Çörek otu tohumlarının oldukça geniş terapötik etkisi olduğu yıllardır yapılan araştırmalar sonucunda ortaya konmuştur. Gösterdiği terapötik etkilere başlıca deri hastalıkları, sindirim sistemi problemleri, romatizma, diyabet, bronşit, hipertansiyon, anoreksiya, astım, soğuk algınlığı, bronşit, baş ağrısı, ateş, influenza ve egzama örnek verilebilir. Çörek otunun en aktif maddesi olan timokinonun tüm bu etkilerden sorumlu ana bileşiği olduğu kabul edilmektedir.

Bu güne kadar yapılan çalışmalarda, çörek otu birçok farmakolojik etki ile ilişkilendirilmiştir. Antioksidan (50), anti-anksiyete (51), anti-ülser (52), antiastimatik (53), anti-kanser, anti-inflamatör , immünomodülatör ve anti-tümör özelliğın (10,54,55) yanı sıra gastrik ülser tedavisi (56), tümör büyümesini engelleme (57), erkeklerde kısırlık tedavisi (58), kardiyovasküler rahatsızlıklar (59), hafıza gelişimi (60), süt üretiminin artırılması (61), lipit peroksidasyon için koruyucu etki (50), antibakteriyel aktivite (62), cytomegalovirüse karşı antiviral aktivite (2) gibi birçok farmakolojik etki bu tıbbi bitki için rapor edilmiştir.

2.1. ÇÖREK OTUNUN ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTESİ

Bu güne kadar yapılan çalışmalarda; bütün olarak çörek otu bitkisinin antimikrobiyal mekanizması üzerine herhangi bir çalışma raporlanmamış, bunun yerine çörek otunda bulunan önemli bileşikler timokinon ve malanın bu özellikten sorumlu tutulmuşlardır (63).

Filtre kağıdı disklerine dietil eterli *N. sativa* (25-400 mikrogram/disk) ekstresi emdirilmiş olan gram-pozitif baktresi *Staphylococcus aureus* ve gram-negatif bakterileri *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* ile patajonik bir maya olan *Candida albicans*'ın (*Salmonella typhimurium* üzerine etkili değildir) konsantrasyona bağlı inhibisyonu araştırılmış; ekstrenin streptomisin ve gentamisin ile antibakteriyel sinerji gösterdiği; doksisisiklin, spektinomisin, eritromisin, tobramisin, amfilisin, kloram-fenikol, nalidiksik asit, linkomisin ile sulfa-metoksazol ve trimetoprim kombinasyonu ile antibakteriyel etkiye katkı sağladığı kanıtlanmıştır (64).

Nigella sativa'nın farklı ekstrelerinin antibakteriyel etkisi üzerine yapılan bir çalışmada, 16 adet gram- negatif ve 6 adet gram- pozitif olmak üzere çeşitli bakteri grupları izole edilmiş ve bu bakteri gruplarından özellikle gram- negatif olanlar antibiyotiklere karşı çoklu direnç gösterenler arasından seçilmişlerdir. Çalışmanın sonunda en etkili ekstrelerin ham alkaloid ve su ekstreleri olduğu ve özellikle çoklu antibiyotik direnci gösteren gram- negatif bakterileri üzerinde etkili olduğu gözlenmiştir (17).

Çörek otunun anti bakteriyel etkisinin incelemesi amacı ile metanollü, sulu ve kloroformlu ekstreleri ile esansiyel yağı *Staphylococcus aureus* (ATCC 29737) ve *Escherichia coli* (ATCC 8739) bakterileri üzerinde denenmiş ve sonuçlar neticesinde metanollü ve kloroformlu ekstrelerinin ve uçucu yağının her iki mikroorganizma üzerinde belirgin bir etki yarattığı gözlenmiştir (62).

Timokinonun akut pyelonefritin (PYN) tedavisinde etkili olup olmadığının kontrolü için obstrüktif sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada *Escherichia coli*'nin enjeksiyonundan öncesi ve sonrası incelenmiş, bunun için enjeksiyondan 24 saat önce ve 24 saat sonra herbir safha için 10 mg/kg timokinon uygulanmıştır. Çalışma sonuçlarında timokinonun PYN yüzünden oluşan oksidatif hasarı azalttığı gözlenmiştir. Ayrıca timokinonun PYN vasıtası ile salınan serbest radikallere karşı böbre dokularını koruyucu etkisi de histolojik deneyler ile de doğrulanmıştır (65).

2.2. ÇÖREK OTUNUN ANTIOKSİDAN AKTİVİTESİ

Vücudumuzda reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretimi doğal antioksidatif savunma sistemi ile dengelenmektedir. Fazla miktarda ROT vücudun savunma sistemini alt etmekte ve sonuç olarak hastalık patojenlerinde rol almaktadır. Bu durum aynı zamanda DNA, RNA ve lipitlerin de dengesini bozmaktadır. Bitkiler ve içerdikleri kimyasal bileşikler antioksidan etkisi açısından zengindirler ve vücudun savunma mekanizması ve ROT açısından önemli bir yere sahiptirler.

Çörek otu esansiyel yağının antioksidan aktivitesinin belirlenmesi için yapılan bir çalışmada yağda bulunan timokinon, karvakrol, t-anetol ve 4-terpineol gibi bileşiklerin radikal süpürücü özellikleri ince tabaka kromatografisi vasıtası ile gözlenmiştir (18).

Çörek otunun metanollü ekstresinin (500 ve 800 mg/kg günde) ve sabit yağının (2 ve 4 ml/kg günde) 21 gün boyunca oral olarak uygulanması durumunda toplam kan antioksidan ve plazmatik antioksidan kapasitelerinin 2,2-difenilpikrilhidrazil (DPPH) radikallerine doğru arttığı kanıtlanmıştır (66).

Nigella sativa'nın antioksidan özelliğinin incelenmesi açısından fareler üzerinde yapılan bir diğer önemli çalışmada, 1,2-dimetilhidrazin sebebi ile kırmızı kan hücrelerindeki çeşitli oksidatif stresle değişim gösteren biyokimyasal değişkenlere, timokinonun tedavi öncesi yararını ölçmek için uygulama yapılmıştır (67).

Timokinonun oral olarak uygulandığı bir çalışmada karbon tetraklorür sebebi ile oluşmuş hepatoksisite gibi serbest radikal üretici ajanların yarattığı oksidatif hasara karşı çeşitli organları korumakta merkezi bir rol oynadığı gözlemlenmiştir (68). Ayrıca yine fareler üzerinde yapılan başka bir çalışmada timokinonun hepatoksisiteyi indükleyen sodyum florürün etkisini düşürmesi de timokinonun yüksek antioksidan özelliği ile ilişkilendirilmiştir (69).

Hindistan kökenli çörek otu tohumunun aseton ekstresi ve uçucu yağının antioksidan ve antimikrobiyal aktivitesini araştırmak amacıyla yapılan bir çalışmada, çörek otu uçucu yağının ve aseton ekstresinin antioksidan aktivitesi çeşitli metotlarla (linoleik asit sistemi, DPPH ve Fe³⁺'ü Fe²⁺'ye indirgeme gücü) günümüzde yaygın olan sentetik antioksidanlara (BHA, BHT ve PG), antifungal ve antibakteriyel etkisi çeşitli patojenik mantar ve bakteri türlerine karşı incelenmiştir. Yapılan deneyler sonucunda, aseton ekstresi, uçucu yağ ve sentetik antioksidanların radikal süpürme etkisi sırasıyla %82,1-92,1 (uçucu yağ), %90,37-97,18 (ekstre) ve bu değerlerin konsantrasyon artışıyla lineer olarak arttığı gözlenmiştir, %86,58-94,7 (BHA), %84,1-90,4 (BHT) ve %84,98-93,1 (PG) olarak tespit edilmiştir. Sonuç olarak, hem uçucu yağın hem de ekstrenin sentetik antioksidanlara eşit ya da daha yüksek derecede etki gösterdikleri, bu yüksek etkinin uçucu yağ ve ekstrede bulunan karvakrol, timol ve 4-tert-butilkatekol gibi fenolik 124 yapıdaki maddelerden kaynaklandığı rapor edilmiştir. Aynı zamanda bazı patojenik bakteri ve mantarlara karşı iyi derecede etki gösterildiği ifade edilmiştir (70).

Üç tür tohumun antioksidan aktivitesinin araştırılması üzerine yapılan bir çalışmada; kimyon (*Cuminum cyminum*), çörek otu "black cumin" (*Nigella sativa*) ve acı kimyon

(*Cuminum nigrum*)'un sulu ve %80'lik metanol ekstralarının, antioksidan aktivitelerini DPPH metoduyla belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda metanolik ekstraların toplam fenolik madde içerikleri (mg/g) sırasıyla 4,1 (çörek otu), 8,6 (kimyon) ve 53,6 (acı kimyon) olarak belirlenmiş olup hem sulu hem de % 80'lik metanol ekstresi bakımından en yüksek fenolik madde içeriğine acı kimyonun sahip olduğu görülmüştür. DPPH radikal süpürme aktivite göstergesi olan IC50 (mg) değeri (sulu; %80'lik metanol) ise 2,8; 1,24 (çörek otu), 1; 0,52 (kimyon) ve 0,48; 0,1 (acı kimyon) olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlardan en yüksek antioksidan aktivite gösteren türün acı kimyon olduğu belirlenmiştir (71).

Çörek otu tohumunun uçucu yağının antioksidan aktivitesi üzerine yapılan çalışmada, elde edilen uçucu yağın ana bileşenlerinin timokinon (%30-48), p-simen (%7-15), karvakrol (%6-12), 4-terpineol (%2-7), t-anetol (%1-4) ve seskaterpen longifolin (%1-8) olduğu ve antioksidan çalışmaları sonucunda, sentetik (timokinon, karvakrol, kersetin, BHA ve askorbik asit) maddelerin ve uçucu yağın DPPH radikal süpürme aktivitesinin göstergesi olan IC50 ($\mu\text{g/mL}$) değerlerinin sırasıyla, 460,0 (uçucu yağ), 211,0 (timokinon), 28,8 (karvakrol), 1,31 (kersetin), 12,12 (BHA) ve 3,76 (askorbik asit) olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlara dayanarak, çörek otu tohumunun, ateş yapıcı çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanımının faydalı olacağı önerilmiştir (18).

2.3. ÇÖREK OTUNUN ANTIENFLAMATUAR ETKİSİ

Enflamasyon tedavisi için kullanılan bazı sentetik ilaçlar biyolojik aktivelerin değişimine sebep olmakta ve ters etki yaratmaktadır. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda timokinonun sitoprotektif etki gösterdiği kanıtlanmış ve bu etki temel olarak timokinonun antioksidan ve antienflamatuar etkisi ile ilişkilendirilmiştir (68).

Enflamatuar etkinin araştırılması amacı ile yapılan bir çalışmada; *Nigella sativa* filizlerinin ve tohumlarının metanollü ekstraları kullanılmış ve tohumların metanollü ekstralarının hekzan fraksiyonunun nitrik oksit yükselmesini inhibe ederek belirgin bir antienflamatuar etki gösterdiği, filizlerin metanollü ekstralarının de antienflamatuar aktiviteyi azalttığı gözlenmiştir (72).

Albino sıçanlar üzerinde çörek otu tohumlarının etanollü ekstrelerinin analjezik etkisinin incelendiği bir çalışma sonucunda ekstrenin belirgin bir şekilde analjezik etki gösterdiği ve diklofenak sodyumun neden olduğu % 72,82'lik inhibisyona kıyasla % 41,91'lik bir inhibisyon ürettiği gözlenmiştir (73).

Çörek otu, vitamin C, E ve selenyumun, bir karsinojenik madde olan N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidin uygulanan tavşanların tüylerindeki iz element (Zn, Cu, Mn) derişimleri üzerine olan etkisinin araştırılması amacıyla yapılan çalışma sonucunda, hem çörek otu hem de vitamin uygulanan tavşanların tüylerindeki iz elementlerin derişimlerinin, diğerlerine göre yüksek olduğu ve bunun sonucu olarak da nitrozoguanidinin neden olduğu zararlı etkilere karşı bu maddelerin koruyucu olabileceği düşüncesi ortaya atılmıştır (74).

2.4. ÇÖREK OTUNUN ANTİDİYABETİK ETKİSİ

Çörek otunun anti-diyabetik etkisinin incelenmesi amacı ile gönüllüler kullanılarak yapılan bir çalışmada gönüllülere günde 2gr *Nigella sativa* tozu oral olarak verilmiş ve 1 hafta sonra kandaki glikoz seviyesinin belirgin oranda düştüğü gözlenmiştir (75).

Streptozotosin indüklü diyabetik fareler üzerinde timokinon tedavisi uygulanmış ve bu tedavinin yükselmiş olan serum glikozunda keskin bir düşüşe ve düşük olan serum insülin konsantrasyonunda da yükselmeye sebep olduğu gözlenmiştir (76). Yapılan bir diğer önemli çalışmada çörek otunun antidiyabetik özelliğini araştırmak amacıyla metformin ile mukayese edilmiş ve hiçbir rahatsızlığı olmayan fareler üzerinde çörek otunun sulu ekstresi günde 2g/kg, metformin de günde 300 mg/kg dozunda uygulanmıştır. 6 hafta boyunca süren çalışmanın neticesinde çörek otunun sulu ekstresinin metformin kadar glikoz toleransını iyileştirdiği ve bunun yanı sıra vücut ağırlığını azalttığı gözlenmiştir (77).

Diyabetik farelere çörek otu yağı ile tedavi uygulanmış ve uygulama yapılmayan farelere kıyasla kan glikoz düzeylerinin, trigliseritlerinin, kolestrollerinin, aspartat aminotransferazının (ALT), alanin aminotransferazının (ALT) ve ürik asit miktarının önemli ölçüde azaldığı gözlenmiştir (78).

Yapılan bir çalışmada, çörek otu tohumlarından alınan uçucu yağın tavşanlarda glikoz ve insülin seviyeleri üzerine etkisi araştırılmıştır. Açlık normal ve alloxan-diyabetik

tavşanlara *N. sativa* tohumlarından elde edilen yağın (50 mg / kg) uygulanması, tutarlı ve zamana bağlı belirgin hipoglisemik etkiler göstermiştir. Normal hayvanlarda, tedaviden sonra açlık plazma glikoz düzeylerinde 4 saat ve 6 saatlerde sırasıyla % 15 ve % 23 azalma tespit edildi. Aynı uygulama, diyabetik tavşanlardaki açlık glikoz düzeylerinde sırasıyla 4 saat ve 6 saatlik aralıklarla % 12 ve % 21 azalma sağlamıştır. Uçucu yağın uygulanmasının, tüm hayvan gruplarında bazal insülin düzeylerini değiştirmedeği gözlenmiş, bu da hipoglisemik etkinlik için insülin aracılı olmayan bir etki mekanizması olduğunu düşündürmüştür (49).

Çörek otu tohum ekstresinin, insülin salgılama üzerine olan etkisini incelemek amacıyla yapılan bir çalışma sonucunda, çörek otu ekstresinin insülin salgılanması üzerine düzenleyici etkisinin olduğunu ortaya konmuştur (79).

2.5. ÇÖREK OTUNUN ANTİHIPERTANSİF ETKİSİ

Hipertansiyon dünya genelinde oldukça yaygın ve birçok hastalıktan sorumlu bir sağlık problemidir. Hipertansiyonu kontrol altında tutmak ve neden olduğu rahatsızlıkları gidermek için tıbbi ürünler önemli rol oynamaktadır. Çörek otunun hipertansiyon tedavisindeki yararlılığını ölçmek için yapılan çalışmalarda, timokinonun hem arteriyel kan basıncını hem de kalp ritmini azaltıcı etkisi olduğu kanıtlanmıştır (80).

Çörek otunun hipertansiyon üzerine etkisini belirlemek üzere yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen veriler doğrultusunda, hafif hipertansiyonu olan hastalara 2 ay boyunca çörek otu tohumu ekstresi tedavisi önerilmiş ve oksidatif stresi kontrol altında tuttuğu, hipertansiyonu düşürücü etki gösterdiği belirtilmiştir (81,82).

2.6. ÇÖREK OTUNUN ANTİASTMATİK (ASTİM KARŞITI) ETKİSİ

Astım; sanayileşme sonucunda veya mesleki şartlar nedeni ile dünya genelinde gittikçe yaygınlaşan en önemli kronik hastalıklardan biri haline gelmiştir. Günümüzde tedavi için kullanılan alopateye dayalı ilaçlar etkili olmakla beraber farklı komplikasyonlar da yaratmaktadırlar. Çörek otunun ve içerdiği bileşiklerin antiinflamatuvar, immünomodülatör ve antihistaminik etkilerde önemli rol alması, aynı düşünceyi antiastmatik etkide de gösterdiği kanısını oluşturmaktadır. Çörek otunun başlıca bileşiği olan timokinon ile zerdeçalın etken bileşiği kurkuminin, astımı oluşturan biyolojik değişikliklere karşı inhibitör

etkilerinin karşılaştırıldığı *in vivo* bir çalışmada; timokinonun astıma neden olan enflamasyon değişikliklerini daha fazla inhibe ettiği kanıtlanmıştır (83).

Timokinonun hava aracılığı ile enflamasyon sonucu oluşan alerjik astıma olan etkisinin fareler üzerinde araştırıldığı bir çalışma sonucunda, timokinonun Th2 sitokinlerini ve eozinofil infiltrasyonunu inhibe ederek havadaki etkenlerle oluşan alerjik astımın etkisini azalttığı görülmüştür (84).

2.7. ÇÖREK OTUNUN ANTI-TÜMÖR ETKİSİ

Çörek otunun anti-tümör özelliğini kanıtlayan en önemli çalışmalardan birinde tümör taşıyan farelere 10 mg/kg timokinon tedavisi uygulanmıştır. Çalışma sonucunda uygulama yapılmış farelerde, uygulama yapılmayanlara oranla tümör boyutunun %1,25 oranında küçüldüğü, uygulama yapılmayan farelerde ise tümör boyutunun %209,82 oranında arttığı gözlemlenerek timokinonun tümör büyümesini geciktirici hatta küçültücü etkisi kanıtlanmıştır (85).

Yapılan diğer bir *in vivo* çalışmada; timokinonun göğüs kanseri hücre hatları olan MCF-7, MDA-MB-231 ve BT-474 'ün büyümesini doz ve zamana bağlı olarak inhibe ettiği, ayrıca MCF-7 hücrelerinde doksorubisin ve 5-flurourasil gibi kemoterapotik ajanların sitotoksik etkisini arttırdığı bildirilmiştir (86).

Çörek otunun insanlarda akciğer, karaciğer, kolon ve göğüs kanseri gibi birçok kanser türüne ait hücrelerde hücre ölümüne sebep olduğu yapılan çalışmalar neticesinde ortaya konmuştur (87). *Nigella sativa* tohumlarının farklı ekstrelerini kullanarak A-549 gibi insan akciğer kanser hücre hatlarındaki, *in vitro* sitotoksik aktivitelerinin incelendiği bir çalışmada; *Nigella sativa* ekstrelerinin ve yağlarının A-549 hücrelerinde sitotoksik etki gösterdiği belirtilmiştir (88). Hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak yapılan çalışmalarda, çörek otunun etkili bileşiği timokinonun tümör anjiyogenezi ve büyümesini etkili bir biçimde inhibe ettiği kanıtlanmıştır (89).

2.8. ÇÖREK OTUNUN NÖROPROTEKTİF ETKİSİ

Sayısızca doğal ürün ve tıbbi bitki nöroprotektör olarak terapötik etki göstermektedir. Çörek otunun nöroprotektif etkisinin kanıtlanması amacı ile yapılan önemli bir çalışmada;

siyatik sinirlerinde nöronal incinme olmuş farelere *Nigella sativa* ile tedavi uygulanmış ve tedavi neticesinde çörek otunun travma sonrası nöronların dejenerasyonunu redüklediği ve şekli bozulmuş nöronların tamamen kaybolduğu gözlenmiştir (90).

Nigella sativa'nın, hipokampus nöronlarındaki geniş çaplı iskemik reperfüzyon hasarı üzerindeki koruyucu etkisini araştırmak üzere yapılan bir çalışmada; çörek otu ekstresi 50 mg/kg dozunda uygulanmış ve internöronlardaki intraselüler ödemi belirgin bir şekilde önlediği belirtilmiştir (91).

Çörek otununun kloroformlu ve petrol eterli ekstralarının fareler üzerinde kullanılarak yapıldığı bir çalışmada, bu ekstraların tıkalı olan orta serebral arterlerdeki ölü hücrelerin miktarını azalttığı ve lokomotor aktiviteyi iyileştirdiği kanıtlanmıştır (92).

Timokinonun etanol indüklü nöronal apoptozda koruyucu bir etki gösterdiği (93), ayrıca oksidatif stresi azaltarak serum/glikoz yoksunluğuna karşı PC12 hücrelerini koruyucu etki gösterdiğini belirten çalışmalar da mevcuttur (94).

Yapılan çalışmalar sonucunda; çörek otunun aktif bileşiği olan timokinonun; 6-OHDA nörotoksitesine karşı lipit peroksidasyonunu hafifleterek nöroprotektör etki gösterdiği (95) ve ön beyindeki iskemik-indüklü nöronal hasar bulunan farelere ön tedavi yapıldığında ölü hippokampal nöronal hücrelerde belirgin bir azalma yarattığı belirtilmiş ve bu sonuçlar timokinonun iskemik reperfüzyonda koruyucu etkisi olduğunun kanıtı olarak gösterilmiştir (96).

2.9. ÇÖREK OTUNUN GASTROPROTEKTİF ETKİSİ

Gastrik ülser birçok hastalığın patojeni olarak önemli rol oynamaktadır ve bu yüzden dünya genelinde önemli bir sağlık problemidir. Genellikle stres, sigara kullanımı, beslenme eksiklikleri ve enfeksiyonlar sonucu ortaya çıkmakta birlikte steroid olmayan antiinflamatuvar ilaçların kullanımı da bu hastalığı tetiklemektedir (97). En güvenli ve etkili tedavi şekli bile peptik ülseri kontrol altında tutmayı gerektirir. *N. sativa* ve içerdiği bileşikler gastrik mukozayı arttırıp gastrik asit üretimini azaltarak ülser oluşumunu engellemekte önemli rol oynamaktadır. Albino fareler üzerinde yapılan bir araştırmada çörek otunun ve etkili bileşiği olan timokinonun, alkolden kaynaklanan zararlara karşı gastrik mukozayı koruduğu ve ülser tedavisine katkı sağladığı belirtilmiştir (76).

Çörek otunun midedeki PGE (Parasitic gastroenteritis)'nin sitoprotektif biyosentezine karşı araşidonik asitin biyoyararlanımını arttırarak gastrik mukozayı koruyucu etki gösterdiği (98) ve çörek otu yağının etanolle endüklenen gastrik mukozal hasarına karşı gastroprotektif etki gösterdiği de çalışmalar sonucunda kanıtlanmıştır (99–101).

Cerrahi olarak tiroidektomi yapılmış ve strese maruz bırakılmış iki grup fareler üzerinde yapılan bir araştırmada, çörek otu yağı ile oral tedavi uygulanan grupta gastrik sıvının belirgin bir seviyede azalma olduğu rapor edilmiştir (102). Bir başka çalışmada ise çörek otu tohumlarının sıvı ekstresinin asetilsalisilik asit muamelesi ile oluşturulan ülser modelinde antiülser tedavisi uygulanan farelerde de gastrik sıvıdaki asit yoğunluğunu azalttığı belirtilmiştir (92). Ayrıca çörek otunun etanollü ekstresi, etil asetat fraksiyonu ve saflaştırılmış fraksiyonunun farelerde indometasinden kaynaklanan gastrik ülserle karşı koruyucu etki gösterdiği de kanıtlanmıştır (103).

2.10. SABİT YAĞ BİLEŞİMİ ÜZERİNE YAPILAN ÇALIŞMALAR

Çörek otu tohumunun nötral lipit sınıfları üzerine yapılan bir çalışmada, incelenen nötral sınıfların hepsinde miktar bakımından en fazla linoleik asit (C18:2) sonra oleik asit (C18:1) ve palmitik asit (C16:0)'in bulunduğu belirtilmiştir (94). İran kökenli çörek otu tohumunun sabit ve uçucu yağ bileşimi üzerine yapılan bir çalışmada, sabit yağın başlıca linoleik asit (%55,6), oleik asit (%23,4) ve palmitik asit (%12,5) gibi önemli yağ asitlerinden oluştuğu, uçucu yağın ise trans-anetol (% 38,5), p-simen (%14,8), limonen(%4,3) ve karvon (% 4,0) başlıca bileşenlerden oluştuğu belirtilmiştir (104).

Tunus ve İran kökenli çörek otu tohumlarının fizikokimyasal karakteristikleri ve kimyasal bileşimi üzerine yapılan bir çalışmada ise, Tunus ve İran türleri için bu içerikler sırasıyla protein (%26,7; 22,6), yağ (%28,48; 40,35), linoleik asit (%50,3; 49,2), oleik asit (%25,0; 23,7), palmitik asit (%17,2; 18,4), sabunlaşma sayısı (211, 217 mg KOH/g yağ) ve polifenol içeriği (245±9,16; 309±12,31 mg gallik asit/kg yağ) olarak belirlenmiştir (105).

Çörek otu tohumunun bileşimi üzerine azotun etkisinin incelenmesi konulu bir çalışmada, toprağa 30 kg N/ha uygulanması durumunda çörek otu tohumunun sabit yağ içeriğinin %32,7'den %37,82'ye yükseldiğini belirtilmiştir (106).

Çörek otu yağındaki izopropilmetilfenollerin (karvakrol “5-izopropil-2-metilfenol”, timol “2-izopropil-5- metilfenol”) voltametik metotla belirlenmesi üzerine yapılan çalışma neticesinde kayda değer başarılar elde edilmiştir (107). 126 adet Mısır kökenli çörek otu tohumundan elde edilen yağın bileşimi üzerine, uygulanan ekstraksiyon metodu türünün etkisini araştırmak amacıyla yapılan çalışmada, deneyler neticesinde yağın fiziksel ve kimyasal özelliklerinin uygulanan ekstraksiyon metoduna göre değiştiği tespit edilmiştir. Örneğin, soğuk pres yöntemiyle yağ veriminin %24,76 ve solvan (petrol eteri) ekstraksiyonu sonucunda ise %34,78 olduğu belirtilmiştir. Özellikle de insan sağlığı açısından son derece önem arz eden sterol türü olan β -sitosterolün miktarı 636 ± 35 mg/100 g yağ (soğuk pres yöntemi), solvan ekstraksiyonu sonucunda 960 ± 60 mg/100g yağ değerine yükselmiştir (39).

Çörek otu tohumunda çözücü ekstraksiyonu uygulamasıyla elde edilen yağın verimi ve bileşimi üzerine çözücü etkisini araştırmak amacıyla yapılan bir çalışmada, çözücü olarak n-hekzan ve kloroform/metanol (2:1, v:v) karışımı kullanılmıştır. Ekstraksiyon çalışmaları sonucunda yağ verimleri %37,9 (n-hekzan) ve %39,2 (kloroform/metanol) olarak elde edilmiş ve yağın bileşimi üzerine yapılan çalışmalar; çözücü türünün, yağ asidi bileşimi üzerinde kayda değer bir etkisinin olmadığını ortaya koymuştur. Yağ asitler arasında en yüksek oranda linoleik asit (%57) (C18:2n-6) ve oleik asit %24 (C18:1n-9) olduğu belirlenmiş olup, linoleik asit'in oleik asite oranının (~2,4); 2,1'in üstünde olduğu ve bu değerlerin literatürde yer alan soya (C18:2n-6 = % 52, C18:1n-9 = %25) ve mısır (C18:2n-6 = %58,7; C18:1n-9 = %26,6) yağı değerlerine yakın olduğu bildirilmiştir (108).

Türkiye kökenli çörek otu tohumlarının bileşimi üzerine yapılan bir çalışmada, İzmir yöresinden temin edilen çörek otu tohumlarının bileşiminde, yağ asidi olarak linoleik (%60,8 \pm 2,67), oleik (%21,9 \pm 1,0) ve palmitik (%11,4 \pm 1,0) asit, sterol olarak β -Sitosterol (%69,4 \pm 2,78), tokoferol olarak γ -tokoferol (250 \pm 13,0 μ g/g) ve toplam tokoferol (340 \pm 8,66 μ g/g), toplam polifenol (1744 \pm 10,6 μ g/g), yağ (%32,0 \pm 0,54), ham protein (%20,2 \pm 0,82), karbonhidrat (%37,4 \pm 0,87) ve potasyum (1180 \pm 10,0 mg/100 g) en fazla oranda olduğu belirtilmiştir (19).

Çörek otu tohumundan yağ eldesinde, yüksek ve düşük basınçlı süperkritik karbondioksit ekstraksiyon yöntemi uygulanarak yapılan çalışmada elde edilen ekstre içindeki yağ oranı

ve antioksidan aktivite üzerine basıncın etkisinin olup olmadığı araştırılmıştır. Sonuçta, yüksek basınçlı sistemden elde edilen ekstre içindeki uçucu yağ oranının, düşük basınçlı sistemden elde edilenin iki katı olduğu ve antioksidan aktivite bakımından da diğerine üstün olduğu belirtilmiştir (109).

Üç farklı çörek otu tohumundan elde edilen yağlarda bulunan glikolipitlerin çeşitli tekniklerle izole edilmesi üzerine yapılan bir çalışmanın sonucunda, çörek otu tohum yağının glikolipit bakımından diğerlerine göre daha üstün olduğu belirlenmiştir (40).

Kişniş otu tohum yağı, çörek otu tohum yağı ve nijer tohum yağının oksidatif stabilitesi ve toplam fenolik madde içeriklerinin incelenmesi amacıyla yapılan bir çalışmada, bir dizi yapılan oksidatif stabilite belirleme çalışmaları neticesinde, stabilite bakımından kişniş>çörek otu ve nijer sıralaması elde edilmiş olup fenolik madde içeriği bakımından ise en büyük değeri çörek otu numunesinden elde edilmiştir (110).

2.11. ÇÖREK OTU VERİM VE KALİTE ARAŞTIRMALARI

Eskişehir’de 10 farklı çörek otu popülasyonunda verim ve kalite özelliklerinin belirlenmesi amacı ile yapılan bir çalışmada; özellikler arasındaki doğrudan ve dolaylı ilişkileri saptamıştır. Ekim sırasında dekara saf 4 kg fosfor ve 6 kg azot gübre uygulanmış, çıkışta ve çiçeklenmede sulama yapıldığı bildirilmiştir. Sulamanın yöntemi ve miktarı bildirilmemiş olmasıyla birlikte, denemede popülasyonların bitki boyu 16,6-25,2 cm, toplam dal sayısı 3,1-4,6 adet/bitki, toplam kapsül sayısı 5,6-9,2 adet/bitki, kapsül çapı 1.1-1,3 cm, kapsüldeki tohum sayısı 60,5-94,2 adet/kapsül, kapsüldeki tohum ağırlığı 0,24-0,32 g/kapsül, bitkide tohum sayısı 317,0-589,5 adet/bitki, tek bitki verimi 1,02-1,74 g, tohum verimi 905,3-1881,3 kg/ha, bin tane ağırlığı 1,21- 2,62 g, ilk 9 çiçeklenme süresi 55-70 gün ve vejetasyon süresi ise 110-117 gün arasında değiştiği bildirilmiştir (111).

3. GEREKÇE ve AMAÇ

Bu doktora tez çalışmasının amacı; tıbbi ve ekonomik önemi yüksek olan *Nigella sativa* 'da çeşitli kimyasallar ile ön uygulama yapılan tohumlarından ve biyoteknolojik yöntemler kullanılarak çoğaltılmış bitkilerdeki ve kalluslardaki timokinon miktarları değişiminin i) YBSK ile gözlemlenmesi; ii) tohum yağlarına ait yağ asidi profillerinin de GK/KS teknikleri kullanılarak belirlenmesidir.

Günümüzde satılan çörek otu ve yağlarında timokinon ve etkili bileşiklerin miktarı ölçülmemekte ve bilinmemektedir. Etkili bileşiklerin miktarının bilinmesi, dünya piyasasında yer alacak bitkisel kökenli hammadde üretiminde en önemli güven unsurlarından biri olarak öne çıkmaktadır. Bitkisel ilaç hammaddesi üretiminde tarımsal üretim, maliyetin önemli bir bölümünü oluşturmaktadır. Yapılan araştırma ile bitkisel hammaddeye ekonomik açıdan katma değer katılmıştır ve tezde belirtilen yöntemler kullanılarak elde edilen bulgular niteliğindeki ürün, pazarda daha kolay yer alabilecektir.

Tezin bu temel çıktılarına ilaveten, aktif bileşiklerin kalitatif ve/veya kantitatif farklılıklarının incelenmesi ve hammadde üretimi gibi doğrudan ilaç sanayisini ilgilendiren konularda bilimsel stratejilerin oluşturulmasına katkısı dikkate değer bir olgudur. Piyasadan toplanan örnekler ile tarafımızca üretilen standardize çörek otu tohumu, tez konusu olan parametrelerce karşılaştırılmıştır.

Tez ile ülkemizde kültürü yapılmakta olan çörek otunun ve yağının etkili bileşiği olan timokinonun miktarı ön uygulama yapılarak arttırılmış ve tezdeki priming uygulamaları ile katma değeri yüksek bir ürün elde edilerek ülkemiz için yeni bir kazanç sağlanmıştır. Bu tez ile çörek otu yağında hammadde kaynağının sürekliliği ve standardizasyonu sağlanmıştır. Bu tez çalışması yukarıda vurgulanan noktalarda kayda değer gelişmeler yarattığı için oldukça özgündür.

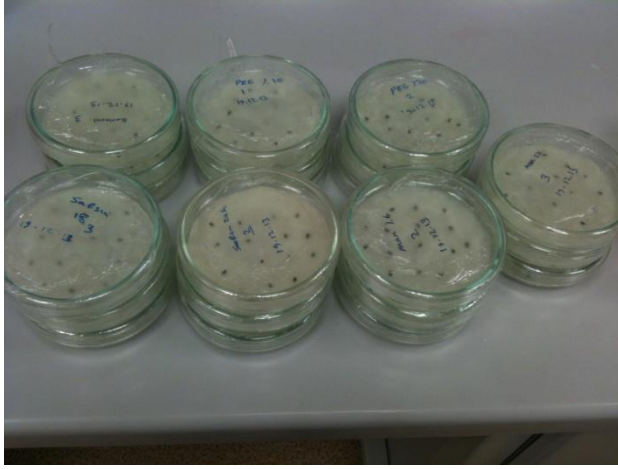
4. MATERYAL VE METOT

4.1. ÖN UYGULAMA (PRİMING) ÇALIŞMALARI

4.1.1. ÖN DENEME ÇALIŞMALARI

Ön deneme, uygun ve yararlı dozları belirlemek amacıyla yapılmıştır. Bu denemede iyi sonuç veren ön uygulama süresi belirlendikten sonra bu süreler ile ön uygulama muamelesi yapılan tohumlar laboratuvar denemelerinde kullanılmıştır.

Ön deneme sonucunda önceden kullanılmasına karar verilmiş olan 12 ,20, 24 saat süre ile uygulanan çörek otu tohumlarından 20 saat süre ile priming yapılan tohumlarda en iyi çimlenme sonucu elde edilmiştir. Bu uygulama üç kez tekrarlanmış ve hepsinde de benzer sonuçlar alınmıştır. Ön deneme sonuçlarına göre tohumlarda ilk çıkış 21 saat sonra görülmüştür; bu nedenle 24 saat uygulama süresi yerine çörek otu tohumlarında priming için 20 saat uygulama süresinin daha uygun olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.1. Farklı süreler ile priming yapılmış tohumların ön denemesinin genel görünümü.

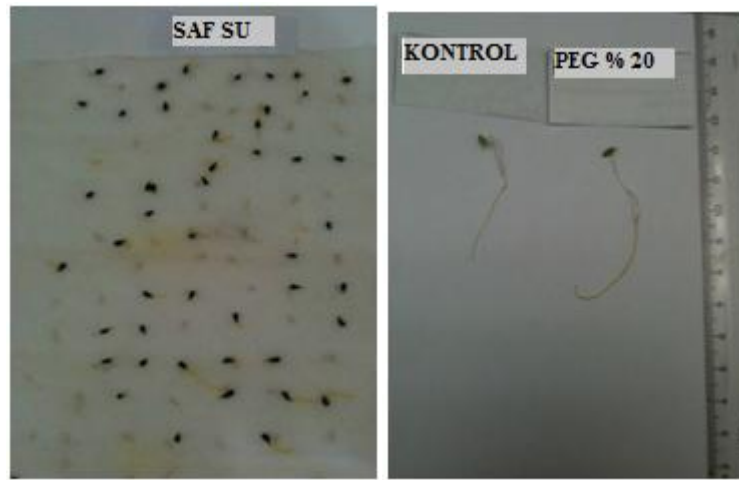
4.1.2. ÖN UYGULAMA DENEMELERİ

Ön uygulama ortamı olarak; saf su, PEG (Polyethylene glycol), Mannitol (Alkollü şeker) kullanılmıştır. Kontrol ve üç ön uygulama dozları olarak; PEG (%10, %20), Mannitol (%4, %6) ve saf su (18, 20 saat) hazırlandıktan sonra tohumlar 20 saat bu sıvılarda bekletilmiş olup, 24 saat süre ile havlu kağıtlar üzerinde ve oda sıcaklığında ($24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) kurutulmuştur.

Priming denemelerinden elde edilen sonuçlarına göre, en iyi sonuç elde eden kimyasal ve dozu belirlenmiş olup, sonuçlara göre Mannitol (%4) ile priming sonuçları en iyi olarak belirlenmiştir. Daha sonra yapılmış denemelerde %4 Mannitol ile priming uygulaması tercih edilmiştir.

4.1.3. ÖN UYGULAMA SONRASI ÇİMLENME YÜZDESİ

Uygulama sonrası tohumların çimlenme yüzdelerinin belirlenmesi için tohumlar 4×50 tohum 20×20 cm boyutlarındaki kurutma kağıtları arasında çimlenmeye bırakılmıştır. Her bir kurutma kağıdına 6 ml saf su eklenerek, nem kaybını önleyici ağzı kilitli torbalar içerisinde yerleştirildikten sonra % 70 nem içeren çimlendirme kabinlerinde, standart çimlenme sıcaklığı olarak ($24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) 'ye ayarlanarak çimlendirilmiştir. 17 gün boyunca süren çalışmada; 2 mm'lik kökçük çıkışı çimlenme kriteri olarak kabul edilmiştir. Çimlenme testlerinde ISTA (Uluslararası Tohum Test Birliği) kuralları esas alınmış ve sonuçlar % olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.2. Çörek otu tohumlarının laboratuvar koşullarında kontrol, %20 PEG ve saf su ile priming sonucunda çimlenmiş tohumlarının genel görüntüsü

4.1.4. ÖN UYGULAMA SONRASI ÇİMLENME HIZI

Çimlendireye konulan tohumlarda her gün sayım yapılmış, ISTA kurallarına göre çimlenme hızını belirlemek için 7. günde yapılan sayımda, tespit edilen değer çimlenme hızı olarak belirlenmiştir.

4.1.5. ÖN UYGULAMA SONRASI ÇİMLENME GÜCÜ

Çimlenme hızı ayarlandıktan sonra tohumlar çimlendirme kabiniinde tutulmaya devam edilmiş ve 17. günde yapılan sayımda elde edilen değerlerden çimlenme gücü hesaplanmıştır.

4.1.6. ÖN UYGULAMA SONRASI SAPÇIK VE KÖKÇÜK UZUNLUĞU

Çimlendirmenin 17.gününde her tekerrürden alınan 10 adet fidenin kökçük ve sapçık uzunlukları cm olarak ölçülmüştür.

4.1.7. ÖN UYGULAMA SONRASI SAPÇIK VE KÖKÇÜK YAŞ AĞIRLIĞI

Her tekerrürden seçilen 10 fidenin sapçık ve kökçüklerini ayrılarak hassas teraziyle ağırlıkları tartılıp sapçık ve kökçük yaş ağırlıkların ortalaması mg/fide olarak belirlenmiştir.

4.1.8. ÖN UYGULAMA SONRASI SAPÇIK VE KÖKÇÜK KURU AĞIRLIĞI

Her tekerrürden seçilen 10 fidenin sapçık ve kökçüklerini ayrılarak + 80°C'de 24 saat kurutulduktan sonra hassas teraziyle tartılıp sapçık ve kökçük kuru ağırlıkların ortalaması mg/fide olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.3. %4 Mannitol priming uygulaması sonucunda toprak+kum+gübre karışımı içeren saksılarda çimlenmiş fidelerin 2-3 yaprak aşamasında elde edilen bir görünüm.

4.1.9. TARLA DENEMELERİ

Çörek otu tohumları; %4 Mannitol'ün, timokinon üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla, ön uygulama işlemi gördükten sonra 24 saat oda sıcaklığında kurutulmuş olup, iki parselde kontrol (hiç bir uygulama yapılmamış tohumlar) ve ön muamele yapılmış tohumlar şeklinde Nisan ayında tarla ekimi Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü uygulama alanlarında yapılmıştır. Düzenli olarak hasat dönemine kadar sulama ve bakım işlemleri yapılmış, hasat mevsiminde elde edilen tohumlar timokinon miktarını belirlemek amacıyla analiz edilmiştir.



Şekil 4.4. Çörek otu tarla denemesi



Şekil 4.5. Kontrol ve %4 Mannitol ile ön muamele yapılmış tohumlardan gelişen bitkilerin Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü'ne ait tarladaki görüntüsü

4.1.10. SERA DENEMELERİ

Ön uygulamanın, çörek otundaki timokinon miktarı üzerinde etkileri incelemek amacıyla yürütülmüştür. Deneme öncesi; toprak karışımı (toprak+kum+gübre) hazırlanmış ve saksılara doldurulmuştur. Daha sonra, her saksıda 10 adet kontrol ve %4 Mannitol ile ön muamele yapılmış çörek otu tohumları ekilmiştir. Saksılarda eşit bitki olması için çıkış sonrası saksı başına bitki sayısı beş adet olarak seyreltilmiştir. İhtiyaç duyulunca her saksı aynı düzende sulanmış ve gerekli bakım işlemleri yapılmıştır. Deneme bitkilerinden elde edilen tohumlar hasat edildikten sonra timokinon miktarı ölçülmüştür.



Şekil 4.6. %4 Mannitol uygulaması sonrası tohumların (A) sera koşullarda çimlenen bitkilerin (B) , çiçeklenen bitkilerin (C) ve hasat edilmiş kapsüllerin (D) genel bir görünümü

4.2. BİYOTEKNOLOJİ ÇALIŞMALARI

Denemelerde MS mineral tuz ve vitaminleri, %3 sükröz ve %0,7'lik agar (Type A, Sigma) içeren temel besi ortamı kullanılmıştır. Ortamların hazırlanışında bidistile su kullanılmış olup, deneme ihtiyacına göre besi ortamlarına değişik konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicileri olan TDZ (tidiazuron), BAP (benzil aminopurin), NAA (naftalin asetik asit), Kinetin ve 2,4-D (2,4 diklorofenoksi asetik asit) eklenmiştir. Besi ortamlarının asitlik bazlık değerleri (pH'sı) 1 N HCl veya 1 N NaOH kullanılarak 5,6 – 5,8'e ayarlanmıştır. 121 °C'de ve 118 kPa basınç altında otoklavda 20 dakika boyunca tutularak steril edilmiştir.

Doku kültürü işlemleri steril kabin içersinde gerçekleştirilmiştir. Her muamele için, 10 adet eksplantın bulunduğu 3 tekerrürlü petri kutuları (100 x 10 mm) ya da magenta (Sigma - Aldrich GA-7) kapları kullanılmıştır. Ortamların, magenta kaplarının ve saf suyun sterilizasyonunda 118 kPa basınç, 121 °C ve 20 dk ayarlı otoklav kullanılmıştır. Cam petri kutuları 160 °C'de 2 saat etüvde steril edilmiştir.

Çörek otu tohumlarının yüzey sterilizasyonu amacıyla, ticari çamaşır suyunun (Ace) %30, %40, %50, %75' lik dozlarının her biri 4 farklı sürede (10, 15, 20 dk.) uygulanmıştır. Yüzey sterilizasyonundan sonra tohumlar steril saf su ile 5×3 dk durulanmıştır. Steril edilen tohumlar yine steril petri kapları içerisinde MS besi ortamında 24±2 °C'de çimlendirilmiştir.

4.2.1. EKSPLANT SEÇİMİ

Steril edilen tohumlardan elde edilen 7–10 günlük bitkiciklerin hipokotil, kotiledon ve kotiledon boğumu eksplantları kullanılmıştır.

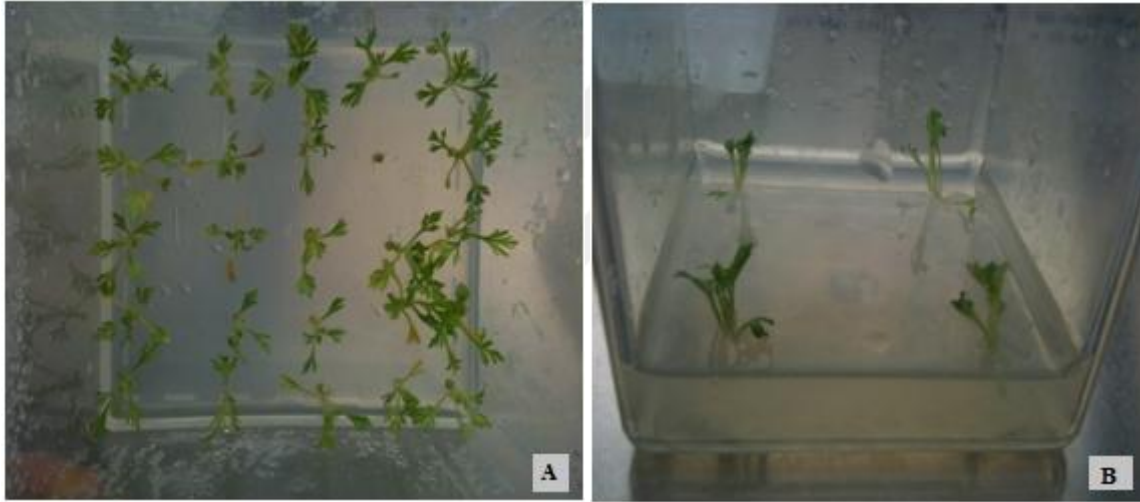
4.2.2. BİTKİ REJENERASYON AŞAMASI

Çeşitli dozlarda TDZ, BAP, NAA, Kinetin, 2,4-D, IAA vb. hormonları içeren MS besin ortamları hazırlanmıştır. *İn vitro* fidelerden izole edilecek kotiledon, kotiledon boğumu ve hipokotil eksplantları üzerinde adı geçen hormonların etkisi araştırılmıştır.

Mannitol ile ön uygulama yapılmış tohumlarda, ilk önce tohumları antibakteriyel sıvı sabunda 2 dk. tutulduktan sonra, 10 dk. %50 çamaşır suyu ile yüzey sterilizasyon

sağlanmıştır. Denemelerde MS mineral tuz ve vitaminleri, %3 sükröz ve %0,7'lik agar (Type A, Sigma) içeren temel besi ortamı kullanılmıştır. Sürgün rejenerasyonunda, denemede besin ortamlarına değişik konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicileri olan TDZ, BAP, NAA, Kinetin, 2,4-D ve IAA ilave edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, TDZ ve kinetinden sürgünler elde edilip köklendirmeye alınmıştır. Ayrıca, kalluslarda timokinin miktarının artmasını incelemek amacıyla çörek otu tohumlarında çeşitli dozlarda 2,4,D içeren MS besi ortamları hazırlanıp, sonuçları gözlenmiştir.

Çeşitli TDZ dozları (0,25, 0,5, 0,75 mg/L) ve Kinetin (0,5, 0,75, 1 mg/L) denemeleri sonucunda elde edilen kalluslar üzerinde gelişen sürgünler ve sürgün uzunluğu değerlendirilip, sürgünler tek tek çeşitli köklendirme ortamlarına alınmıştır.



Şekil 4.7. Kotiledon boğumu eksplantlarından 0,5 (A) ve 0,75 mg/L (B) Kinetin içeren MS besin ortamından elde edilen sürgünlerin köklendirme aşaması

In vitro fidelerden izole edilmiş kotiledon, kotiledon boğumu ve hipokotil eksplantları 0,05 mg/L BAP ve 0,25, 0,5, 0,75 ve 1 mg/L NAA içeren MS besin ortamlarında kültüre alınmıştır ve aralarındaki rejenerasyon kapasitesi kıyaslanmıştır.

4.2.3. ÇÖREK OTU TOHURLARDAN KALLUS ELDESİ

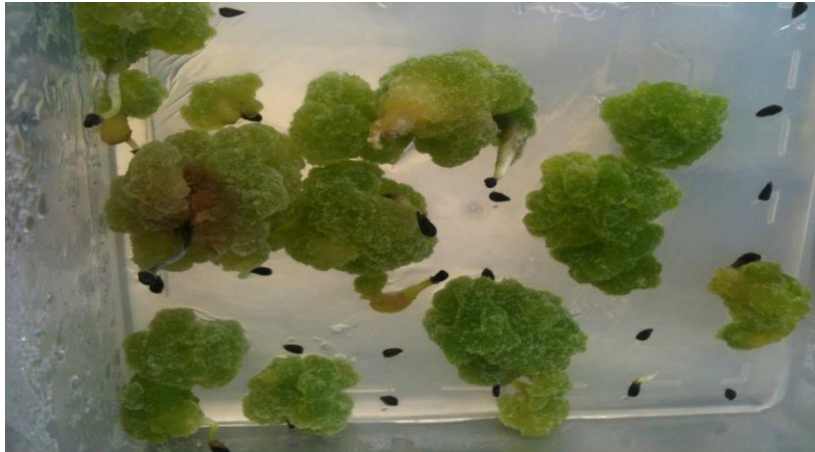
Çörek otunda %4 Mannitol ile ön uygulama yapılmış tohumlardan elde edilen kalluslarda; ön uygulama işleminin kalluslardaki timokinin miktarı üzerindeki etkisini belirlemek amacı ile yapılmıştır. Yapılan denemelerde 2,4,D hormonunun çeşitli dozları

kullanılmıştır. Kurulan denemelerde 2.4.D ve Kinetin'in çeşitli dozları (1 mg/L 2.4.D, 1mg/L 2.4.D + 0.05 mg/l KN, ; 1 mg/L 2.4.D + 0.1 mg/L KN; 1 mg/L 2.4.D + 0.5 mg/L KN; 1 mg/L 2.4.D + 1 mg/L KN; 1 mg/L 2.4.D + 1,5 mg/L KN) kullanılmıştır.



Şekil 4.8. Kallus elde etme amacıyla 0,75mg/L dozunda hazırlanan 2.4.D ortamına ekilen tohumların görüntüsü

Yapılan denemelerde 2,4,D hormonunun çeşitli dozları kullanılmıştır. Kurulan denemelerde 2.4.D ve Kinetin'in çeşitli dozları (1 mg/L 2.4.D; 1mg/L 2.4.D + 0,05 mg/L KN; 1 mg/L 2.4.D + 0,1 mg/L KN; 1 mg/L 2.4.D + 0,5 mg/L KN; 1 mg/L 2.4.D + 1 mg/L KN; 1 mg/L 2.4.D + 1.5 mg/L KN) kullanılmıştır. Yapılan denemelerin sonucunda 2. denemeden daha hızlı ve daha iri kalluslar elde edilmiştir.



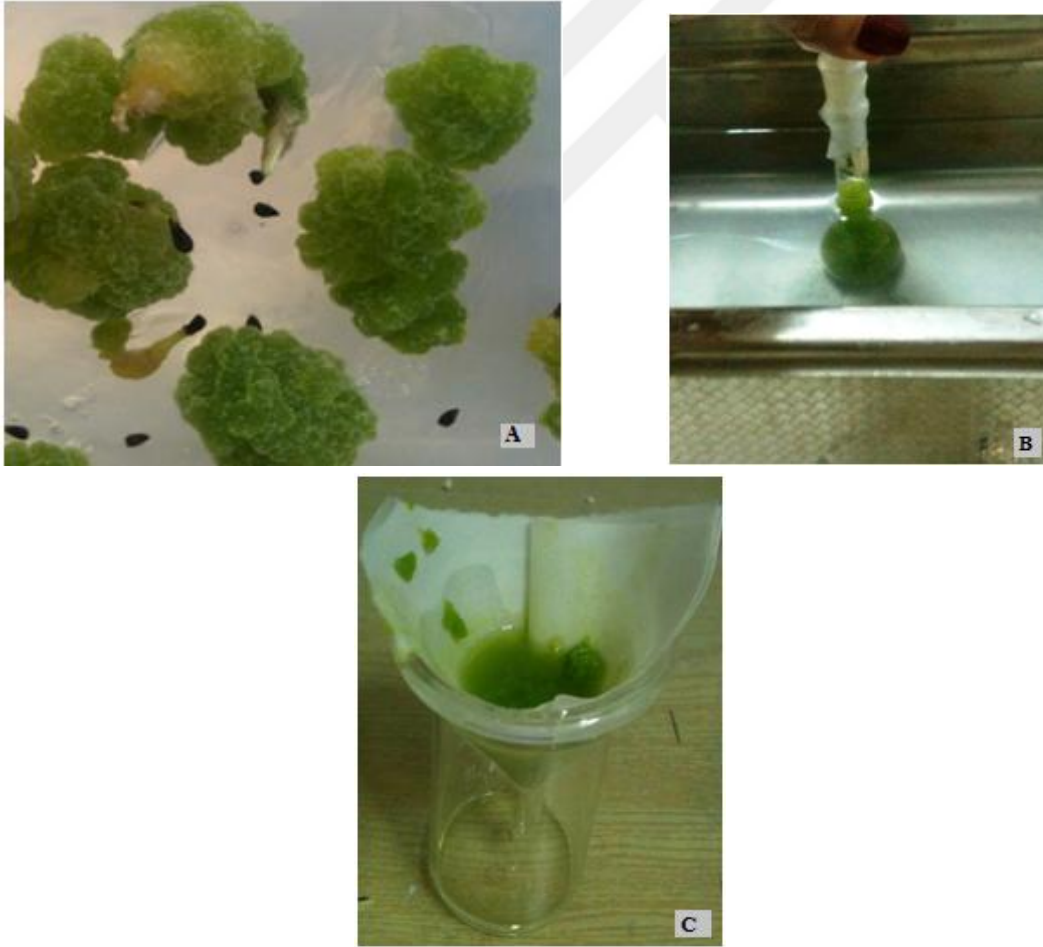
Şekil 4.9. Çörek otu tohumlarında 1 mg/L 2.4 D + 0,05 mg/L KN içeren MS besi ortamından elde edilen kallus

4.3. YBSK VE GK-KS ANALİZLERİ İÇİN EKSTRAKSİYON VE METOD ÇALIŞMALARI

Tohumların ekstraksiyonunda ve analizlerinde kullanılan metanol ve 2-propanol (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) YBSK saflığındadır. Saf su Milli-Q (Millipore Corp., Milford, MA) sisteminden süzülerek elde edilmiştir. Timokinon standardı ise Sigma- Aldrich firmasına ait olmakla birlikte kodu 274666'dır.

4.3.1. KALLUS EKSTRAKSİYONU

5g kallus tartılmış ve 10 ml'lik balon jojelere yerleştirilmiştir. Üzerine 5 ml Metanol eklenip, ultrasonik su banyosunda 10 dakika boyunca ekstraksiyonu yapılmıştır. Ultrasonik su banyosu ile ekstraksiyonundan sonra yine metanol ile 10 ml'ye tamamlanarak, 5 dakika daha ultrasonik su banyosuna tabii tutulmuştur. Hazırlanan ekstreler mikro enjektör filtreleri ile süzülerek viallere aktarılmıştır (Şekil 4.10.).



Şekil 4.10. Kallus (A), kallus ekstraksiyonu (B) ve kallus ekstraksiyonunun filtre kağıdından süzülmesinin (C) genel görünümü

4.3.2. PİYASADA SATILAN ÇÖREK OTU TOHUMLARININ, YAĞLARININ VE KAPSÜLLERİNİN TEMİNİ

Piyasada bulunan çeşitli çörek otu preparatlarının timokinon miktar analizi için çeşitli aktarlardan ve eczanelerden 10'ar adet çörek otu tohumu, çörek otu yağı ve çörek otu yağı kapsülü temin edilmiştir. Tohumların, yağların ve yağ kapsüllerinin orijinleri ve markaları birbirinden farklı olup, ekstraksiyonları aşağıdaki ana başlıklarda belirtildiği gibi yapılmıştır. Çörek otu tohumları ÇT; yağları ÇY; kapsülleri ise ÇK olarak kodlanmıştır.

4.3.3. TOHUM EKSTRAKSİYONU

Tohumların ekstraksiyonu için literatür taraması yapılmış ve en uygun yöntem seçilmiş ve bu yöntemde çeşitli modifikasyonlar yapılarak uygulanmıştır (42). Öncelikle 5 gr tohum iyice ezilerek üzerine 200 ml metanol eklenmiştir. Manyetik karıştırıcıda 2 saat çalkalanarak süzgeç kağıdından süzülüş ve rotary evaporatörde kurutulmuştur. Kalan madde pastör pipeti kullanılarak metanolla azar azar çözülmüş ve 50 ml'lik balon jojeye konularak 50 ml'ye metanolla tamamlanmıştır. Enjektör filtresi ile vialle süzülüp analize verilmiştir (Şekil 4.11.).



Şekil 4.11. Tohum ekstraksiyonunun genel görünümü

4.3.4. YAĞ VE KAPSÜL EKSTRAKSİYONU

Çörek otu yağı ekstraksiyonu için literatür taraması yapılmış ve en uygun yöntem seçilerek uygulanmıştır (42). Yağların ekstraksiyonu için Agilent ZORBAX SPE C18 (EC) kartuş kullanılmıştır. Katı faz ekstraksiyonu (SPE); analitlerin çözeltilerden emilme (sorpsiyon) yoluyla konsantre edilip arındırılmasının ardından, emilen bu analitin enstrümental analiz

için (YBSK –KS gibi) uygun bir solvent ile yıkanması (elüsyon) şeklinde gerçekleşen bir numune hazırlama metodudur. SPE C18 kartuş içerisinde 20 µL çörek otu yağı eklenmiştir. Üzerine 2x400µL metanol eklenip direkt vialle süzölmüştür (Şekil 4.12.).



Şekil 4.12. Yağ ekstraksiyonunun genel görünümü

4.3.5. YBSK KOŞULLARI

Cihaz: Agilent Technologies 1200 series

Akış Hızı: 0.9 ml/min

Mobil Faz: Su: Metanol: 2- propanol (50:45:5)

Kolon: Eclipse XDB-C18 column (150 mm x 4.6 mm, 5µm)

Süre: 50 dakika

Enjeksiyon hacmi: 10µl

Dedektör: Diyod Array Dedektör (254 nm dalga boyunda çalışılmıştır.)

Analiz Yöntemi: İzokritik



Şekil 4.13. YBSK cihazının şematik görüntüsü

4.3.6. GAZ KROMATOĞRAFİSİ – KÜTLE SPEKTROMETRESİ (GK-KS) KOŞULLARI

4.3.6.1. Gaz Kromatografisi - Kütle Spektroskopisi

Bileşiklerin kütle spektrumları; 7890A gaz kromatografisi (Agilent, Santa Clara, CA, USA) ile kombine edilmiş dik hızlanma uçuş zamanlı kütle spektrometresi GCT Premier (Waters) kullanılarak kaydedilmiştir. Örnekler 10:1 split oranında 220 °C'de enjekte edilmiştir. Kromatografik ayırma J&W DB-5MS kapiler kolon (30 m x 0,25 mm, film kalınlığı 0,25 µm) kullanılmıştır. GK sisteminde taşıyıcı gaz olarak helyum ile sürekli akış modu (1 ml/dk) çalıştırılmıştır. Sıcaklık programı şöyledir: 60°C (0 dk), sonra 37°C/dk artışla 150 °C'ye, daha sonra 38°C/dk artışla 380°C'ye (9 dk). Kimyasal İyonizasyon (CI) spektrumu pozitif iyon modunda, reaktif gaz olarak metan kullanılarak kaydedilmiştir. İyon kaynağı sıcaklığı 140 °C'dir.

4.3.6.2. Gaz Kromatografisi Koşulları

Cihaz: Agilent 6890N Network GC system

Dedektör: Agilent 5973 Network Mass Selective Detector (GC-MS)

Kolon: Agilent 19091N-136 (HP Innowax Capillary; 60,0 m x 0,25 mm x 0,25 µm)

Taşıyıcı Gaz: Helyum

Akış hızı: 3,3 ml/dk

Enjeksiyon Hacmi: 1 µl

Split oranı: 20:1

Enjektör Sıcaklığı: 250°C

FID Sıcaklığı: 250°C

Çizelge 4.1. Gaz Kromatografisi Sıcaklık Programı

Sıcaklık °C	Artış Miktarı	Tutulma Zamanı (dk.)	Toplam Zaman (dk.)
100	----	1	1
170	10	----	8
215	5	5	22
240	10	10,5	35

Çörek otu sabit yağının bileşenlerinin teşhisi; kütle spektrumlarının Wiley ve Nist GK-KS Kütüphaneleri ile ve ilgili literatürlerden sağlanan verilerle karşılaştırılarak yapılmıştır. Sabit yağ bileşenlerinin yüzde miktarları; normalizasyon metodunun kullanılması ile GK pik alanlarından yararlanarak hesaplanmıştır.

4.3.6.3. Yağ Asidi Profili İçin Yağ Asidi Metil Esterlerinin Oluşturulması

Piyasadan elde edilen çörek otu yağları ve kapsüllerinin GK (gaz kromatografisi) kullanılarak yağ asidi profillerinin çıkarılması için metilasyon işlemi yapılmıştır. Bunun için 150 mg yağ 25 ml'lik balon jodede tartılarak üzerine 4 ml 0,5 N metanollü NaOH çözeltisi ilave edilmiştir. Hiç yağ damlacığı kalmayınca kadar su banyosunda ısıtıldıktan sonra üzerine 4 ml metanollü BF₃ eklenerek kaynatılmıştır. Soğuması beklendikten sonra 25 ml'ye tamamlanacak şekilde, üzerine doymuş NaCl çözeltisi ilave edilmiştir. 2 ml n-

hekzan eklenerek üst faz pastör pipeti vasıtası ile toplanıp GK-KS'de analiz edilmek üzere viallenmiştir.



5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. ÖN UYGULAMA DENEMELERİNİN SONUÇLARI

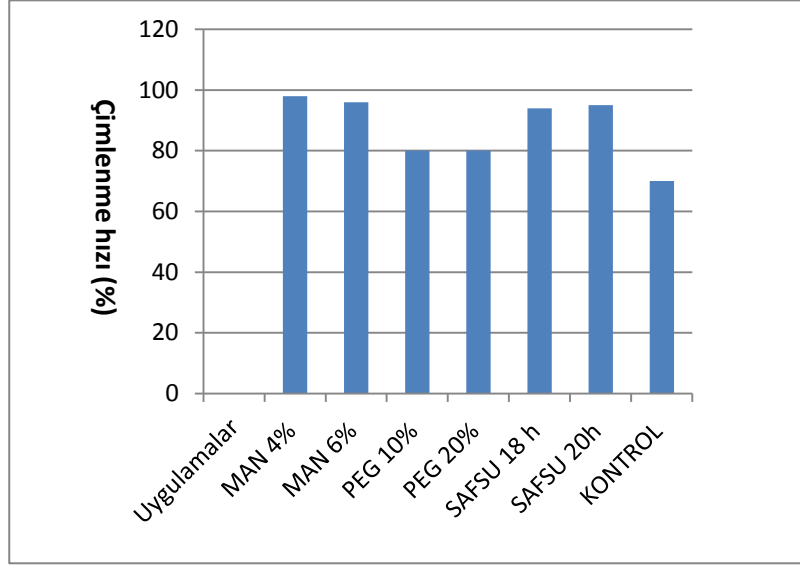
Çörek otunda ön uygulamanın ilk gelişme dönemindeki etkilerini belirlemek için, çimlenme ve çıkış oranları, sapçık, kökçük uzunluğu ile yaş ve kuru ağırlık değerlerine ilişkin elde edilen veriler ve bu verilerin değerlendirilmesi ayrı başlıklar altında açıklanmıştır.

Çizelge 5.1. Farklı Ön uygulamaların Yapıldığı çörek otunda çimlenme hızı ve gücü ortalamaları (%)

Uygulamalar	Çimlenme Hızı (%)	Çimlenme Gücü (%)
SAFSU 18 saat	94	97
SAFSU 20saat	95	96
MAN %4	98	98
MAN %6	96	98
PEG %10	80	95
PEG %20	80	95
KONTROL	70	90

5.1.1. ÇİMLENME HIZI

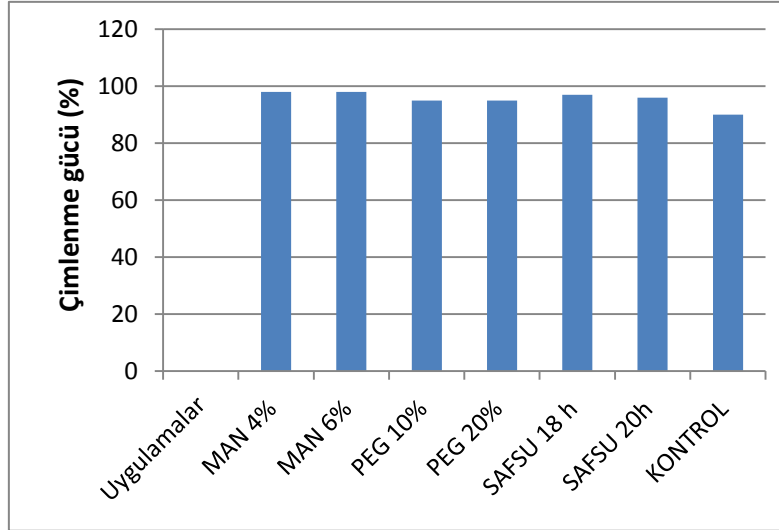
ISTA kurallarına göre çimlenme hızının belirlenmesi için 7. günde yapılan sayımda, elde edilen değer % çimlenme hızı olarak belirlenmiştir. Çizelge 5.1.'de görüldüğü gibi en yüksek çimlenme hızı % 98 olarak Mannitol % 4 elde edilmiş bunu saf su 18 ve 20 saat ile ön uygulama yapılan tohumlar izlemiştir. En düşük çimlenme hızı ise % 70 olarak kontrolde saptanmıştır.



Şekil 5.1. Çimlenme hızı (%)

5.1.2. ÇİMLENME GÜCÜ

Çimlenme hızı belirlendikten sonra tohumlar çimlendirme kabiniinde tutulmaya devam edilmiş, 17. günde yapılan sayımda elde edilen değer, % çimlenme gücü olarak elde edilmiştir. Şekil 5.2.'de görüldüğü gibi çimlenme gücü yönünden %98 olarak %4 Mannitol ve % 6 Mannitol en yüksek olarak saptanır iken, en düşük çimlenme gücü %90 olarak Kontrol'de saptanmıştır.



Şekil 5.2. Çimlenme gücü (%)

5.1.3. SAPÇIK UZUNLUĞU

Sapçık uzunluğu bakımından uygulamalar arası farklılık 0,01 düzeyinde önemli bulunmuştur. Uygulamalar arasındaki farklılık gruplandırılması için Duncan testi yapılmış ve sonuçlar Çizelge 5.2.' de verilmiştir.

Çizelge 5.2. Farklı ön uygulamaların yapıldığı çörek otunda sapçık uzunluğu ortalamaları (cm)

Uygulamalar	Sapçık Uzunluğu Ortalamaları (cm)
Saf su 18 sa	3,567ab
Saf su 20 sa	3,533ab
% 4 Mannitol	4,267a
% 6 Mannitol	3,330b
% 10 PEG	3,010b
% 20 PEG	2,913bc
Kontrol	2,267c

Çizelge 5.2.'de görüldüğü gibi; sapçık uzunluğu yönünden kontrolde daha düşük ortalamalar ortaya çıkmıştır. % 4 Mannitol ile priming yapılan tohumların en yüksek sapçık uzunluğuna sahip olduğu gözlenmiştir.

5.1.4. KÖKÇÜK UZUNLUĞU

Kökçük uzunluğu ortalamaları Çizelge 5.3.' te verilmiştir. En yüksek kökçük uzunluğu 7,023 cm olarak %4 Mannitol ile ön uygulama yapılan tohumlarda saptanır iken, en düşük kökçük uzunluğu 2,933 cm olarak kontrolde gözlenmiştir.

Çizelge 5.3. Farklı ön uygulamaların yapıldığı çörek otunda kökçük uzunluğu ortalamaları (cm)

Uygulamalar	Kökçük Uzunluğu Ortalamaları (cm)
Saf su 18 sa	6,333
Saf su 20 sa	5,300
% 4 Mannitol	7,023
% 6 Mannitol	5,067
% 10 PEG	6,010
% 20 PEG	5,313
Kontrol	2,933

5.1.5. SAPÇIK YAŞ AĞIRLIĞI

Çizelge 5.4.'te görüldüğü gibi, verilere göre en yüksek sapçık yaş ağırlığı ortalaması %4 Mannitol'de 21,60 mg ile saptanırken, en düşük sapçık yaş ağırlığı 15,33 mg ile kontrolde gözlenmiştir.

Çizelge 5.4. Farklı ön uygulamaların yapıldığı çörek otunda sapçık yaş ağırlığı ortalamaları (mg)

Uygulamalar	Sapçık Yaş Ağırlığı Ortalamaları (mg)
Saf su 18 sa	16,10
Saf su 20 sa	17,57
% 4 Mannitol	21,60
% 6 Mannitol	19,00
% 10 PEG	16,37
% 20 PEG	16,57
Kontrol	15,33

5.1.6. SAPÇIK KURU AĞIRLIĞI

Çizelge 5.5'te görüldüğü gibi; sapçık kuru ağırlığı ortalaması yönünden en yüksek sapçık kuru ağırlığı 0,001467 g ile %4 Mannitol uygulamasında saptanır iken en düşük sapçık kuru ağırlığı 0,00008 g ile kontrolde gözlenmiştir.

Çizelge 5.5. Farklı ön uygulamaların yapıldığı çörek otunda sapçık kuru ağırlığı ortalamaları (mg)

Uygulamalar	Sapçık Kuru Ağırlığı Ortalamaları (mg)
Saf su 18 sa	1,100
Saf su 20 sa	1,133
% 4 Mannitol	1,467
% 6 Mannitol	1,333
% 10 PEG	1,100
% 20 PEG	1,067
Kontrol	0,800

5.1.7. KÖKÇÜK YAŞ AĞIRLIĞI

Çizelge 5.6.'da görüldüğü gibi kökçük yaş ağırlığı ortalaması yönünden en yüksek değer 10,74 mg olarak %4 Mannitol ile ön uygulama yapılan tohumlarda saptanır iken en düşük kökçük yaş ağırlığı 2,367 mg ile kontrolde gözlenmiştir.

Çizelge 5.6. Farklı ön uygulamaların yapıldığı çörek otunda kökçük yaş ağırlığı ortalamaları (mg)

Uygulamalar	Kökçük Yaş Ağırlığı Ortalamaları (mg)
Saf su 18 sa	6,767
Saf su 20 sa	6,367
% 4 Mannitol	10,47

Çizelge 5.6. (devam) Farklı ön uygulamaların yapıldığı çörek otunda kökçük yaş ağırlığı ortalamaları (mg)

% 6 Mannitol	9,200
% 10 PEG	7,933
% 20 PEG	5,000
Kontrol	2,367

5.1.8. KÖKÇÜK KURU AĞIRLIĞI

Çizelge 5.7.'de görüldüğü gibi kökçük kuru ağırlığı ortalaması yönünden en yüksek 0,7867 mg olarak % 4 Mannitol ile ön uygulama yapılan tohumlarda saptanır iken en düşük kökçük kuru ağırlığı 0,1333 mg olarak kontrolde saptanmıştır.

Çizelge 5.7. Farklı ön uygulamaların yapıldığı çörek otunda kökçük kuru ağırlığı ortalamaları (mg)

Uygulamalar	Kökçük Kuru Ağırlığı Ortalamaları (mg)
Saf su 18 sa	0,6033
Saf su 20 sa	0,5867
% 4 Mannitol	0,7867
% 6 Mannitol	0,6600
% 10 PEG	0,5300
% 20 PEG	0,6100
Kontrol	0,1333

5.2. DOKU KÜLTÜRÜ ÇALIŞMALARININ SONUÇLARI

Bu çalışmada, yüzey sterilizasyonunda en uygun eksplant kaynağı olarak tarladan toplanan çörek otu tohumları tercih edilmiştir. Yüzey sterilizasyonu için herhangi bir deformesi olmayan üniform tohumlar seçilmiş ve steril cam beher içerisinde sterilizasyonları yapılmıştır. Tohumlar 2 dakika antibakteriyel sıvı sabunla yıkandıktan sonra, %30, %40,

%50, %60 ticari çamaşır suyunda (Ace®,%5 NaOCl) 20, 15 ve 10 dakika yzey sterilizasyonundan sonra 5 × 3 dk. steril saf su ile durulanmıştır.

erek otu tohumlarında sterilizasyon doz ve suresinde uygulamalar arası farklılık gürlmektedir. Uygulamalar arasındaki farklılık sonuçları izelge 5.8.' de verilmiştir.

Çizelge 5.8. Farklı sterilizasyonlarda doz ve süre uygulanmasının erek otunun çimlenmesi üzerine ait yzdelere

Çamaşır Suyu Konsantrasyonları (%)	10 dk. Çamaşır Suyu İle imlenme Yzdesi (%)	15 dk. Çamaşır Suyu İle imlenme Yzdesi (%)	20 dk. Çamaşır Suyu İle imlenme Yzdesi (%)
%30 amaşır suyu	67,22	63,57	48,55
%40 çamaşır suyu	52,52	46,83	41,67
%50 çamaşır suyu	86,90	82,14	49,90
%60 çamaşır suyu	49,17	45,84	38,00

Çizelge 5.8.' de gürldüğü gibi 10 dakika sürede %50 çamaşır suyu ile sterilizasyon yapıldığında en yüksek çimlenme oranı %86,90 olarak elde edilmiştir. Süre arttıkça çimlenme yzdesinde düşüş gözlenmiştir.

Çizelge 5.9. Farklı sterilizasyon dozlarında, 10 dk. süresinde erek otu tohumlarında kontamine oran yzdelere

Çamaşır Suyu Konsantrasyonları (%)	10 dk. Çamaşır Suyu Uygulaması Sonucunda Elde Edilen Bulaşıklığın Yzdesi (%)
%30 amaşır suyu	7,3
%40 çamaşır suyu	5,3
%50 çamaşır suyu	0,3
%60 çamaşır suyu	2,6

Çizelge 5.9.'da görüldüğü gibi 10 dakika sürede %50 çamaşır suyu ile sterilizasyon yapıldığında en az kontamine oranı gözlenmektedir. En çok kontamine oranı ise %30 çamaşır su ile sterilizasyon yapılmış tohumlarda saptanmıştır.

Bu sonuçlar dikkate alınarak çalışmalarda en iyi sterilizasyon dozu ve süresi olarak %50 çamaşır suyu (en az süre) ve 10 dk sterilizasyon kombinasyonunun uygulanması tercih edilmiştir. Mannitol ile priming yapılmış tohumlarda ise, ilk önce tohumlar antibakteriyel sıvı sabunda 2 dakika tutulduktan sonra, 10 dakika %50 çamaşır su ile yüzey sterilizasyonu sağlanmıştır. %4 oranında Mannitol hazırladıktan sonra filtreden geçirerek sterilizasyonu sağlanmıştır. Tohumlar hazırlanmış % 4 Mannitol sıvısında 20 saat bekletilmiş, daha sonra steril saf su ile 3 kez yıkanıp, daha önce hazırlanan steril kurutma kağıtları üzerinde 24 saat oda sıcaklığında kabin içerisinde kurutulduktan sonra ortamlara alınmıştır.

5.2.1. ÇÖREK OTUNDA İN VİTRO KOŞULLARDA SÜRGÜN REJENERASYONU

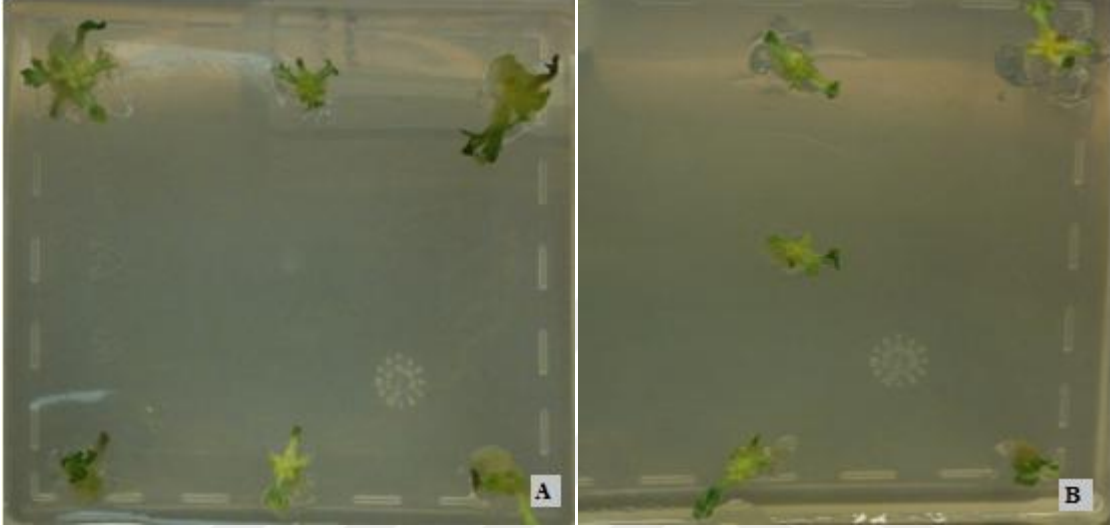
5.2.1.1. Farklı Dozlardaki TDZ'nin Çörek Otu Tohumlarındaki Sürgün Rejenerasyonu Üzerine Etkisi

Yüksek oranda bir sürgün rejenerasyonu elde etmek amacıyla in vitro ortamda gelişen bitkiciklerden elde edilen kotiledon, hipokotil ve kotildeon boğumu eksplantları 0,25, 0,5, 0,75 mg/L TDZ içeren MS besi ortamında kültüre alınmıştır.

Çizelge 5.10. Çörek otunda rejenerasyonu üzerine farklı TDZ dozlarının etkisine ait yüzde oranlar

Uygulanan TDZ Dozu (mg/L)	Kotiledon Boğumu Kallus Oranı (%)	Kotiledon Kallus Oranı (%)
0,25	97,00	77,33
0,5	80,33	63,86
0,75	78,67	58,00

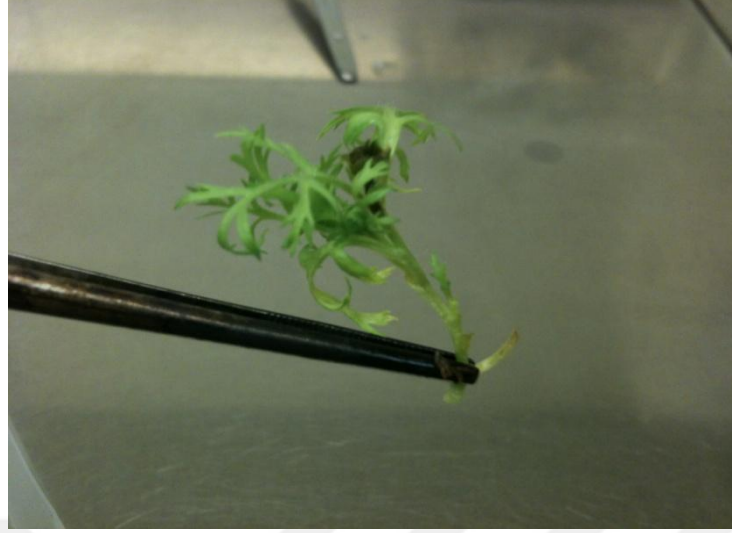
Çizelge 5.10.'da görüldüğü gibi; kallus oluşum oranı ortalaması yönünden kotiledon boğumundan alınan eksplantlarda en yüksek kallus oluşum oranı 0,25 mg/L TDZ içeren MS besi ortamında (Şekil 5.3.) ile kültüre alınmış eksplantlarda saptanır iken en düşük kallus oranı %78,67 mg/L TDZ 0,75 de saptanmıştır. Bitkinin kotiledon yapraklarından alınan eksplantlarda ise en yüksek kallus oluşum oranı 0,25 mg/L TDZ' de görülmektedir (Şekil 5.5.). Ayrıca en düşük kallus oranı ise 0,75 mg/L TDZ'de saptanmıştır.



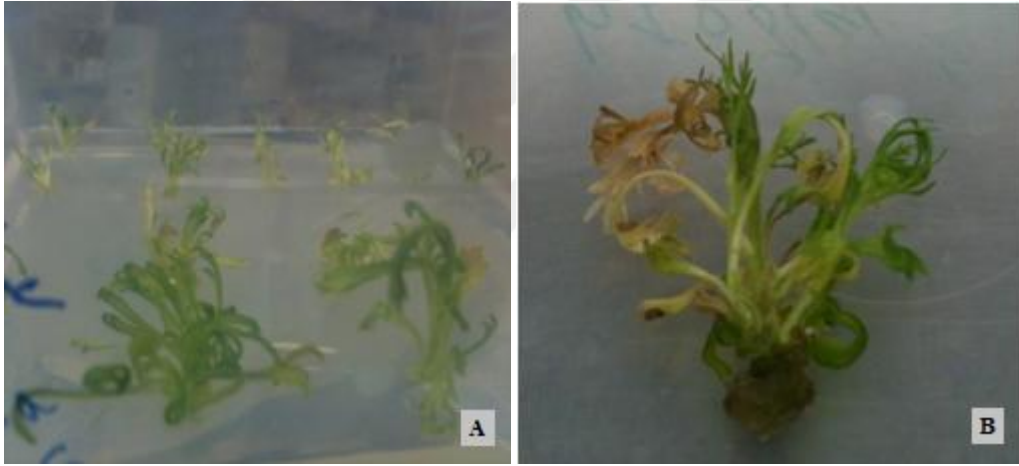
Şekil 5.3. Çörek otu kotiledon boğumu eksplantlarından 0,25 mg/L (A) ve 0,5 mg/L (B) TDZ içeren MS besi ortamında elde edilen sürgünler



Şekil 5.4. Çörek otu kotiledon eksplantlarından 0,5 mg/L TDZ içeren MS besi ortamında elde edilen kalluslar

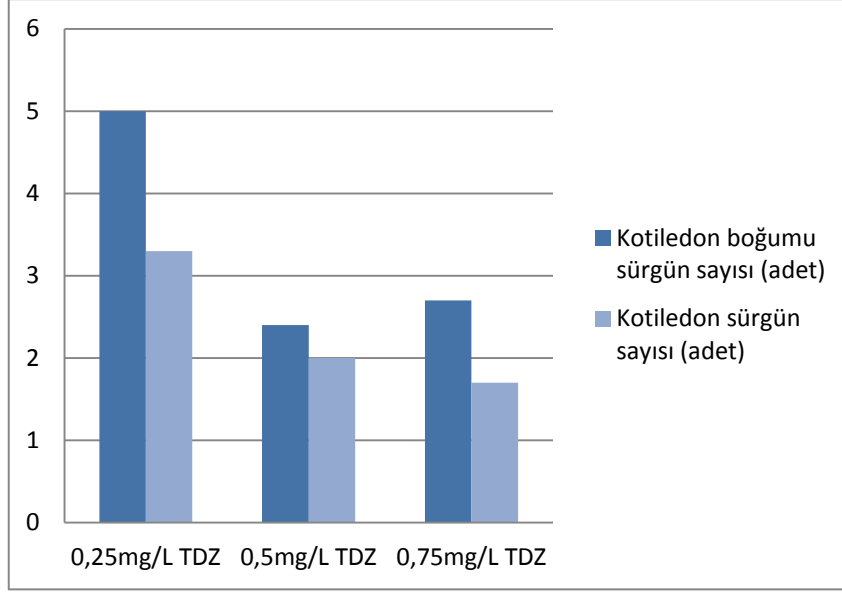


Şekil 5.5. Çörek otu kotiledon eksplantlarından 0.25 mg/L TDZ içeren MS besi ortamında elde edilen sürgün örneği

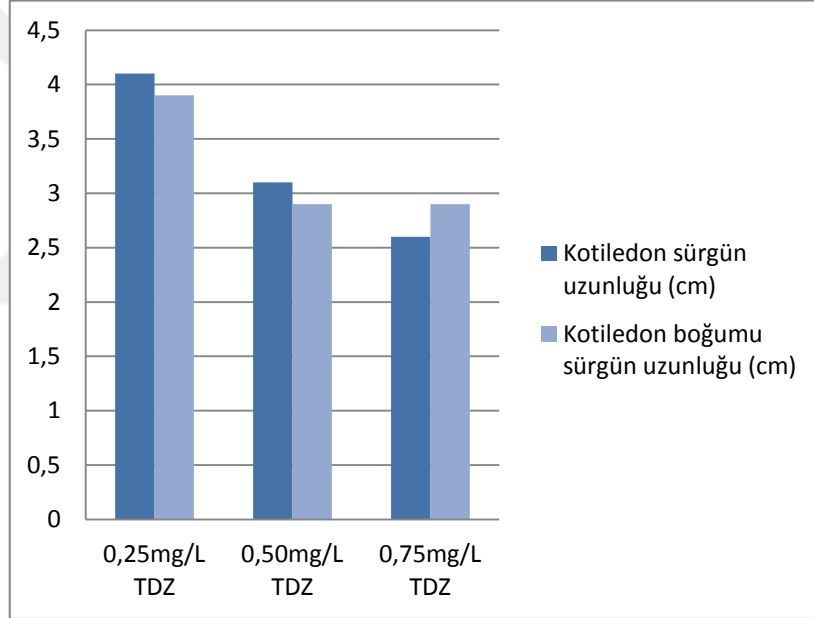


Şekil 5.6. Çörek otu kotiledon boğumu eksplantlarından 0,5 mg/L (A) ve 0,75 mg/L (B) TDZ içeren MS besi ortamında elde edilen sürgünler

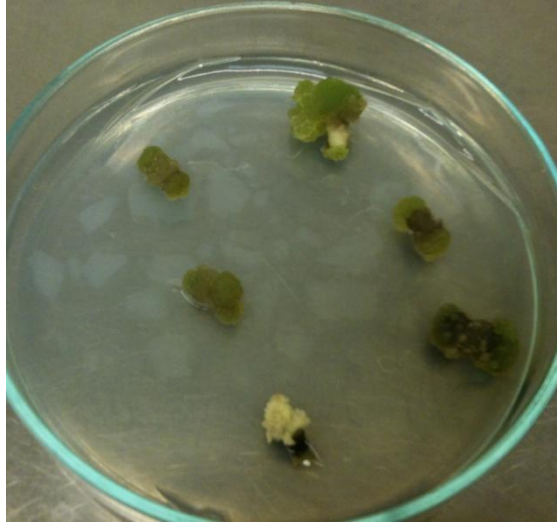
Kotiledon boğumundan alınan eksplantlarda en yüksek sürgün sayısı 0,25 mg/L TDZ içeren MS besi ortamında ile kültüre alınmış eksplantlarda saptanır iken en düşük sürgün sayısı 2,333 adet ile 0,5 mg/L TDZ' de saptanmıştır. Sürgün uzunluğu yönünden ise en çok sürgün uzunluğun 3,967 cm olarak 0,25 mg/L TDZ içeren MS besi ortamında kültüre alınmış eksplantlardan oluşmuştur (Şekil 5.7.). Bitkinin kotildon yapraklarından alınan eksplantlarda ise en yüksek sürgün sayısı 3,333 adet olarak 0,25 mg/L TDZ' de görünmektedir. Ayrıca en düşük sürgün sayısı 1,667 adet, 0,75 mg/L TDZ 'de saptanmıştır (Şekil 5.8.).



Şekil 5.7. Kotiledon ve kotiledon boğumundan elde edilen sürgünlerin sayısı (adet)



Şekil 5.8. Kotiledon ve kotiledon boğumundan elde edilen sürgünlerin uzunluğu (cm)



Şekil 5.9. Çörek otu hipokotil eksplantlarından 0,25 mg/L TDZ içeren MS besi ortamında elde edilen kalluslar

5.2.1.2. Çörek Otu Rejenerasyonu Üzerine Farklı Dozlardaki Kinetin'in Etkisi

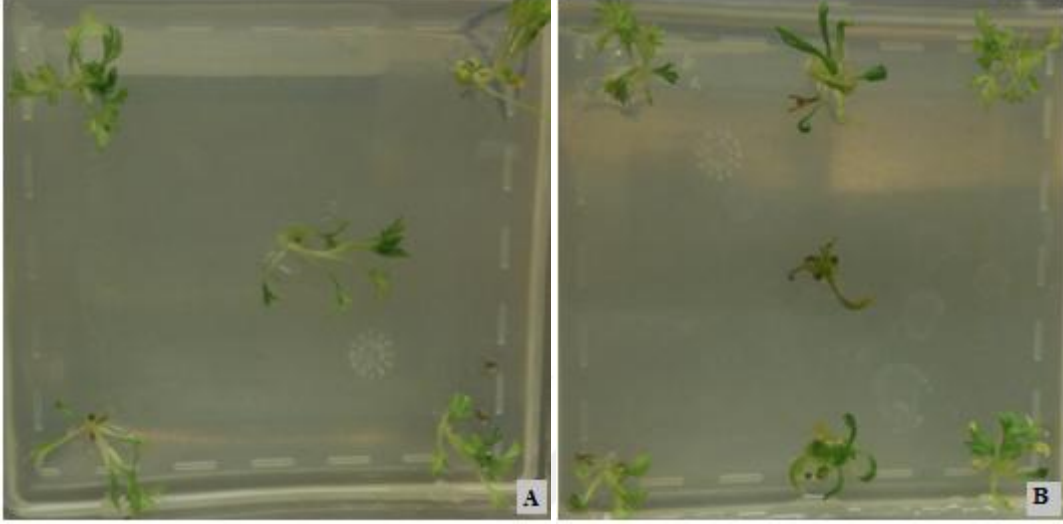
Sürgün rejenerasyonu elde etmek amacıyla in vitro gelişen bitkiciklerden elde edilen kotiledon, hipokotil ve kotildeon boğumu eksplantları 0,5, 0,75, 1 mg/L TDZ içeren MS besi ortamında kültüre alınmıştır.

Çizelge 5.11. Çörek otu rejenerasyonu üzerine farklı Kinetin dozlarının etkisine ait ortalama gruplandırması

Uygulamalar Kinetin Dozu (mg/L)	Kotildeon Boğumu Kallus Oranı(%)	Hipokotil Kallus Oranı(%)
0.5	96,00	20,00
0.75	90,00	23,33
1	85,00	45,00

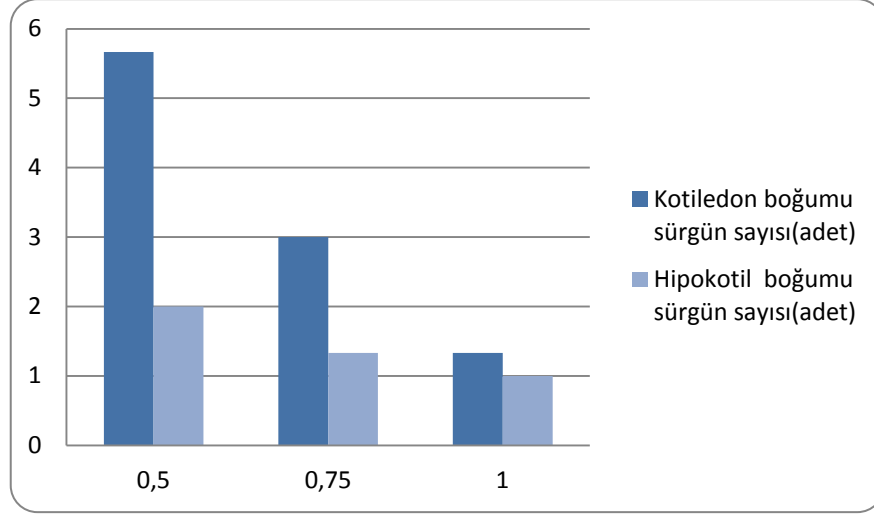
Çizelge 5.11.'de görüldüğü gibi; kallus oluşum oranı ortalaması yönünden kotiledon boğumundan alınan eksplantlarda en yüksek kallus oluşum oranı 0,5 mg/L Kinetin içeren MS besi ortamında ile kültüre alınmış eksplantlarda saptanır iken en düşük kallus oranı 0.75mg/L Kinetin'de saptanmıştır. Bitkinin hipokotilden alınan eksplantlarında ise en

yüksek kallus oluşum oranı 1 mg/L Kinetin' de görülmektedir. Ayrıca en düşük kallus oranı ise 0,5 mg/L Kinetin' de saptanmıştır.

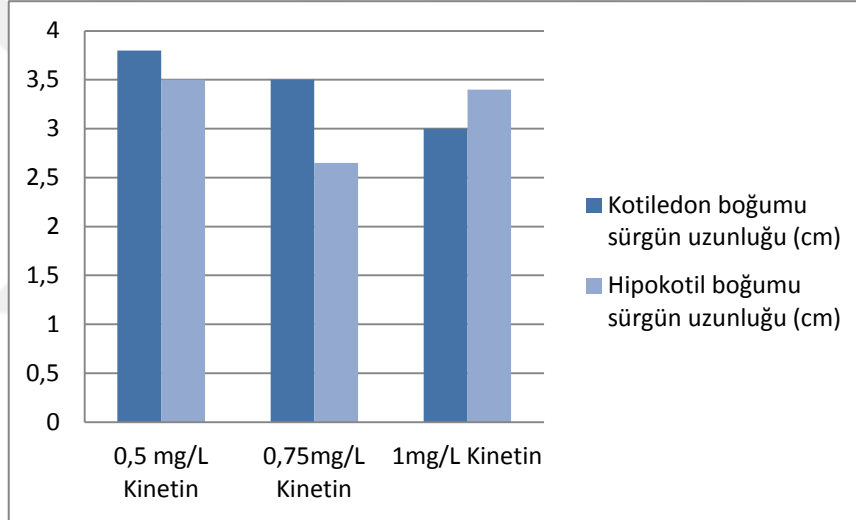


Şekil 5.10. Çörek otu kotiledon boğumu eksplantlarından 0,5 mg/L (A) ve 0,75 mg/L (B) Kinetin içeren MS besi ortamında elde edilen kallusların görüntüsü

Sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu ortalamaları yönünden kotiledon boğumundan alınan eksplantlarda en yüksek sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu 0,5 mg/L Kinetin içeren MS besi ortamında ile kültüre alınmış eksplantlarda saptanır iken, en düşük sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu 1mg/L Kinetin'de saptanmıştır. Bitkinin hipokotilden alınan eksplantlarda ise en yüksek sürgün sayısı 0,5 mg/L Kinetin'de de görülmektedir. Ayrıca en düşük sürgün sayısı 1mg/L Kinetin'de ve düşük sürgün uzunluğu ise 0,75 mg/L Kinetin'de saptanmıştır.



Şekil 5.11. Kotiledon ve hipokotil boğumlarından elde edilen sürgünlerin sayısı (adet)



Şekil 5.12. Kotiledon ve hipokotil boğumlarından elde edilen sürgünlerin uzunluğu (cm)

5.2.1.3. Çörek Otu Rejenerasyonu Üzerine Farklı Dozlarda NAA ve BAP'ın Etkisi

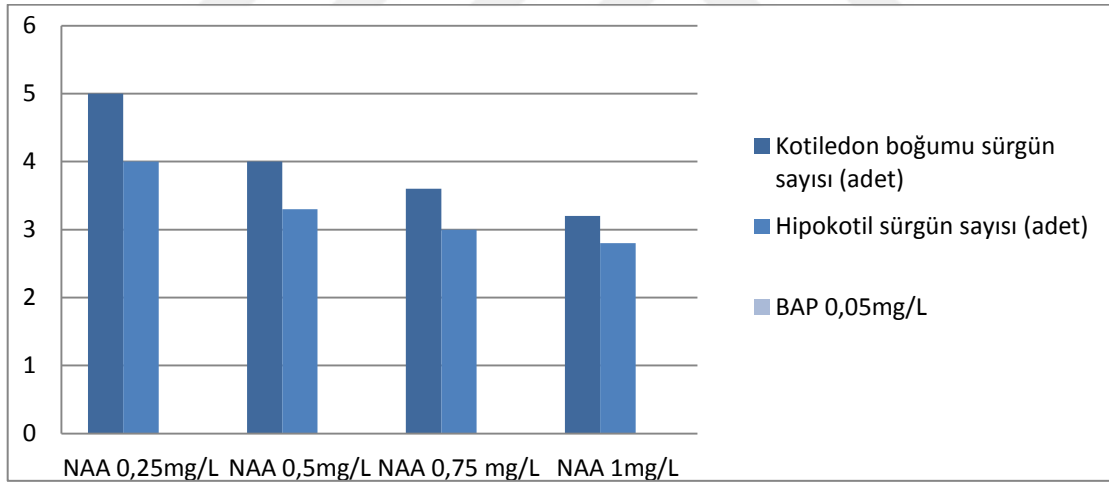
Sürgün rejenerasyonu elde etmek amacıyla in vitro gelişen bitkiciklerden elde edilen kotildon, hipokotil ve kotildeon boğumu eksplantları, 0,05 mg /L BAP ; 0,25, 0,5, 0,75 ve 1 mg/L NAA içeren MS besi ortamında kültüre alınmıştır.

Kotildon boğumundan elde edilen eksplantlarda kallus oluşum oranı bakımından en fazla kallus oluşum oranı, %96,33 olarak 0,05 mg/L BAP ve 0,25 mg/L NAA kullanılan MS besi ortamlarıyla kültüre alınmış eksplantlarda görülmektedir. En az kallus oluşum oranı ise, %81 ile 0,05 mg/L BAP ve 1 mg/L NAA MS ortamlarında saptanmıştır. En yüksek

sürgün sayısı 0,05 mg/L BAP ve 0,25 mg/L NAA içeren MS besi ortamında kültüre alınmış eksplantlarda saptanır iken; en düşük sürgün sayısı 0,05 mg/L BAP ve 1 mg/L NAA'de gözlemlenmiştir.



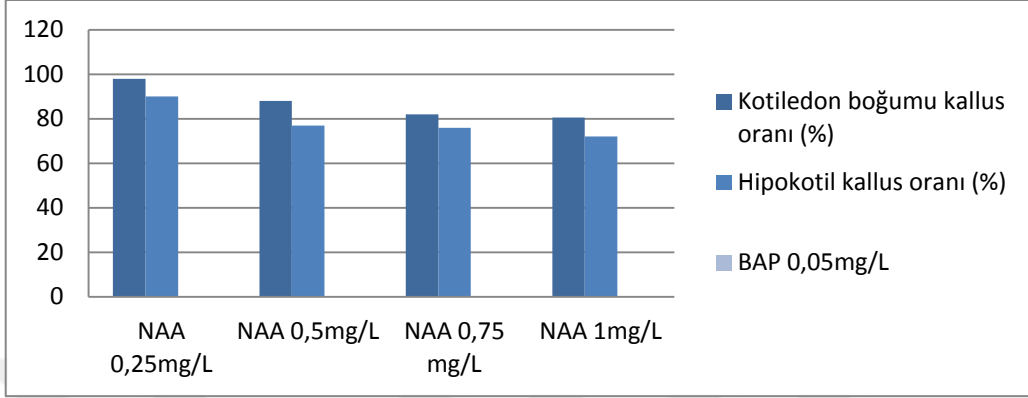
Şekil 5.13. Çörek otu kotiledon boğumu eksplantlarından 0,05 mg/L BAP ve 0,25 mg/L NAA içeren MS besi ortamında elde edilen sürgünler



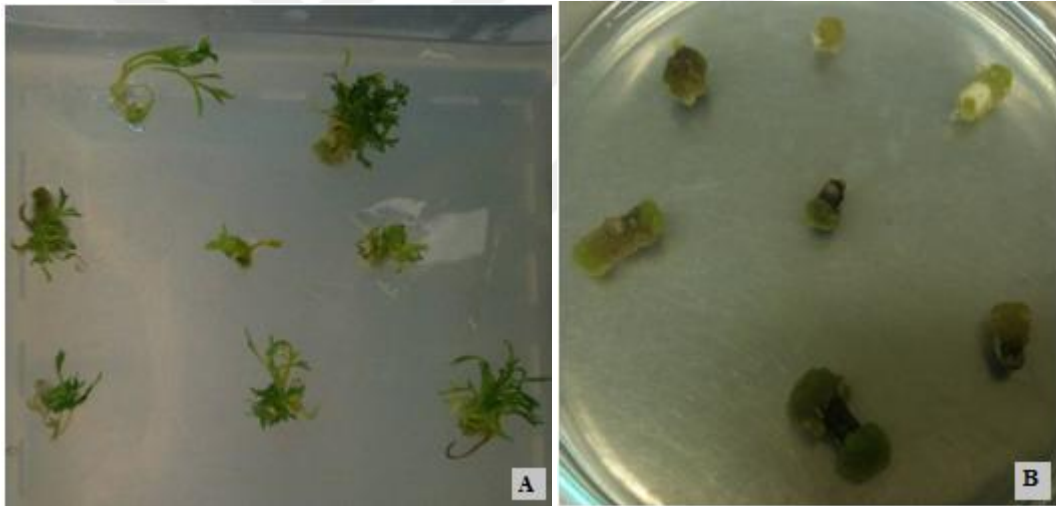
Şekil 5.14. Kotiledon boğumundan elde edilen sürgünlerin sayısı (adet)

Hipokotilden elde edilen eksplantlarda kallus oranı bakımından en fazla kallus oranı %89,33 olarak 0,05 mg/L BAP ve 0,25 mg/L NAA kullanılan MS besi ortamlarıyla kültüre alınmış eksplantlarda görülmektedir. En düşük kallus oranı ise, %72,33 ile 0,05 mg/L BAP ve 1 mg/L NAA MS ortamlarında saptanmıştır (Şekil 5.15.).. Sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu ortalamaları hipokotilden alınan eksplantlarda en yüksek sürgün sayısı 4 adet olarak 0,05 mg/L BAP ve 0,25 mg/L NAA içeren MS besi ortamında kültüre alınmış

eksplantlarda saptanırken, düşük sürgün sayısı 2,667 adet olarak 0,05 mg/L BAP ve 1 mg/L NAA'da gözlemlenmiştir (Şekil 5.15.). Sürgün uzunluğu bakımından ise en fazla sürgün uzunluğu 3,267 cm olarak 0,05 mg/L BAP ve 0,25 mg/L NAA içeren MS besisi ortamında kültüre alınmış eksplantlarda saptanmıştır (Şekil 5.17.).

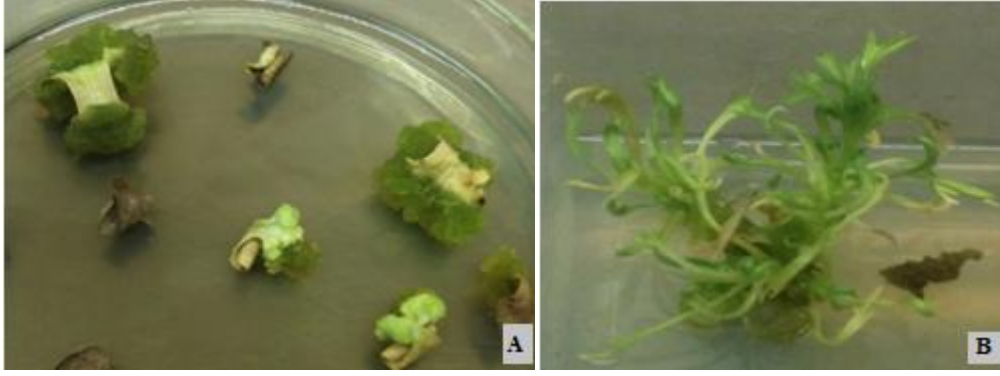


Şekil 5.15. Kotiledon boğumundan ve hipokotilden elde edilen kallus oranı(%)



Şekil 5.16. Çörek otu hipokotil eksplantlarından 0.05 mg/L BAP + 0,5 mg/L NAA içeren MS besisi ortamında elde edilen sürgünlerin (A) ve kallusların (B) görüntüsü

NAA ve BAP'ın kotildondan elde edilen eksplantlarda kallus oranı, sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu üzerine etkisi bakımından, araştırmada uygulamalar arasında farklılık saptanmamıştır.



Şekil 5.17. Çörek otu kotiledon eksplantlarından 0,05 mg/L BAP + 0, 25 mg/L NAA içeren MS besi ortamında elde edilen kallusların (A) ve sürgünlerin (B) görüntüsü

5.2.2. ÇÖREK OTU TOHUMLARINDAN KALLUS ELDESİ VE FARKLI DOZLARDA 2.4.D. VE KİNETİN'İN KALLUS ELDESİ ÜZERİNE ETKİLERİ

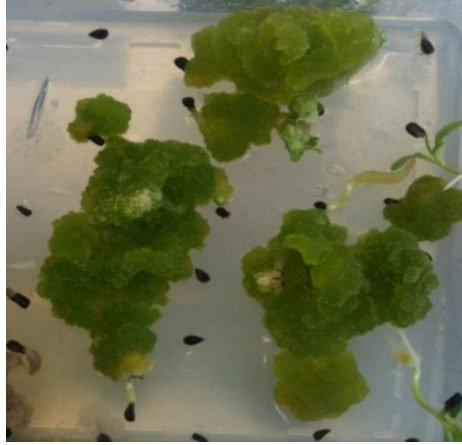
Yapılan denemelerin sonucunda 1mg/L 2.4 D , 0,05 mg/L Kinetin (KN) içeren MS besi ortamından daha hızlı ve daha iri kalluslar elde edilmiştir.



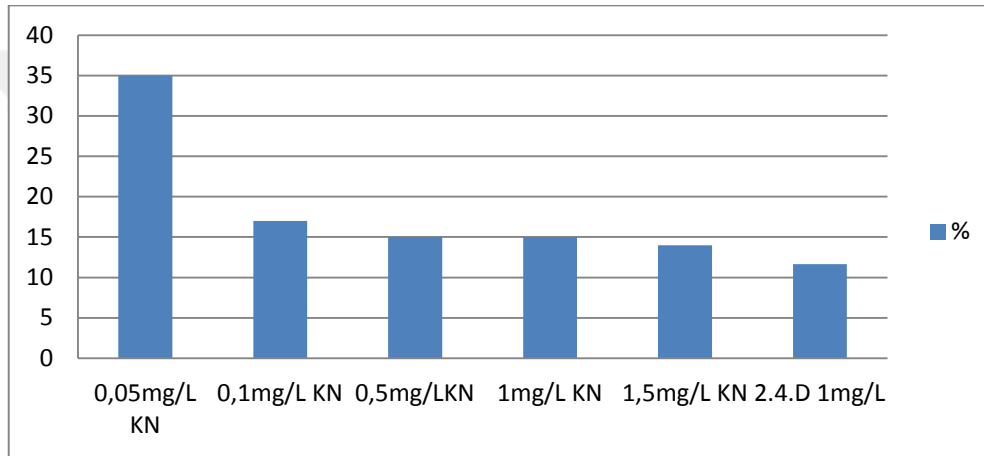
Şekil 5.18 Çörek otu tohumlarında 1 mg/L 2.4 D + 0,05 mg/L KN içeren MS besi ortamından elde edilen kallusların görüntüsü

Yapılan denemelerde 1 mg/L 2.4.D + 0,05, 0,1, 0,5, 1, 1,5, 2 mg/L Kinetin içeren MS ortamları sürgün rejenerasyonu için kullanılmıştır.

Yapılan çalışma sonucunda en fazla kallus oranı % 35 ile 1 mg/L 2.4.D + 0,05 mg/L KN içeren MS besi ortamında görülürken (Şekil 5.18), en düşük kallus oranı sadece 1mg/L 2.4.D 'nin kullanıldığı MS besi ortamlarında %11,67 olarak saptanmıştır.



Şekil 5.19. Çörek otu tohumlarında 1 mg/L 2.4.D + 0,05 mg/L KN içeren MS besi ortamından elde edilen kallusların görüntüsü



Şekil 5.20. 2.4.D ve Kinetin (KN) 'in farklı dozlarının kallus oranı üzerine etkileri (%)

5.3. YBSK İLE TİMOKİNON MİKTARI TAYİN ÇALIŞMALARININ SONUÇLARI

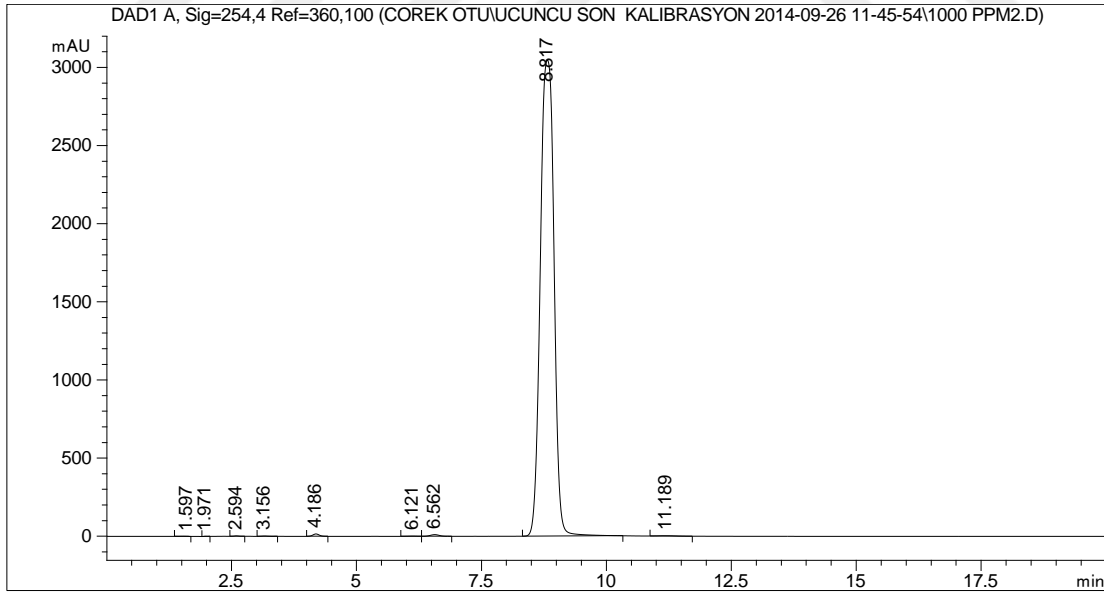
5.3.1. VALİDASYON ÇALIŞMASI

Çörek otu tohum ve yağının YBSK analizi sonucunda elde edilen verilerin hesaplanmasında kullanılmak üzere validasyon çalışması yapılmıştır. Bunun için 5, 15, 25, 50, 100, 250, 500, 750 ve 1000 ppm konsantrasyonlarında standartlar hazırlanmış ve elde edilen alanlar kullanılarak validasyon yapılmıştır.

5.3.2. TİMOKİNON STANDARDININ ALANI VE KROMATOGRAMI

Çizelge 5.12. Timokinon Standardının Kromatogram Alanları ve Ortalamaları

Konsantrasyon	Alan 1	Alan 2	Alan 3	Ortalama
5 ppm	422,4	421,4	422,2	422,000
15 ppm	1027,7	1031	1033,4	1030,700
25 ppm	1457,4	1436	1433,5	1442,300
50 ppm	3207,7	3177,3	3205,5	3196,833
100 ppm	5787	5758,7	5837,3	5794,333
250 ppm	14876,2	14669	14768,9	14771,367
500 ppm	28656,6	29178,7	29911,4	29248,900
750 ppm	43096,2	42467	42336,2	42633,133
1000 ppm	57602,9	58035,2	58310,3	57982,800



Şekil 5.21. 1000 ppm konsantrasyondaki Timokinon standardının YBSK kromatogramı

5.3.3. TİMOKİNON STANDARTININ KALİBRASYON DENKLEMİ , TESPİT LİMİTİ (LOD) VE ÖLÇÜM LİMİTİ (LOQ) DEĞERLERİ

Kalibrasyon sonucunda elde edilen denklem, denkleme göre hesaplanmış tespit limiti (LOD) ve ölçüm limiti (LOQ) değerleri aşağıdaki tabloda özetlenmiştir.

Çizelge 5.13. Kalibrasyon eğrisi formülü, tespit ve ölçüm limitleri

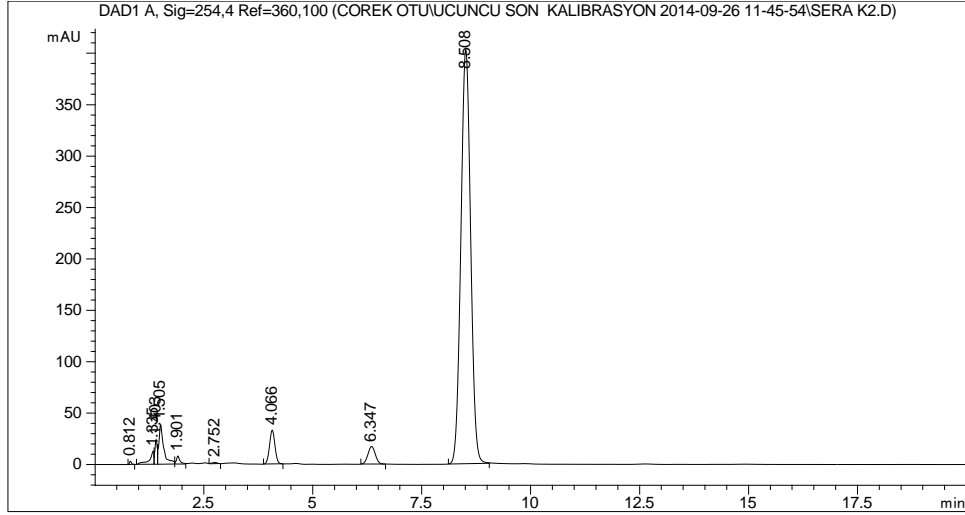
Bileşik	Kalibrasyon Eğrisi Formülü	r2	Tespit Limiti LOD (ppm)	Ölçüm Limiti LOQ (ppm)
Timokinon	$y = 57.518x +$	0.9998	0.0303	0.0919

5.3.4. SERA DENEMELERİNDEN ELDE EDİLEN TOHURLARIN ALANLARI VE KROMATOGRAMLARI

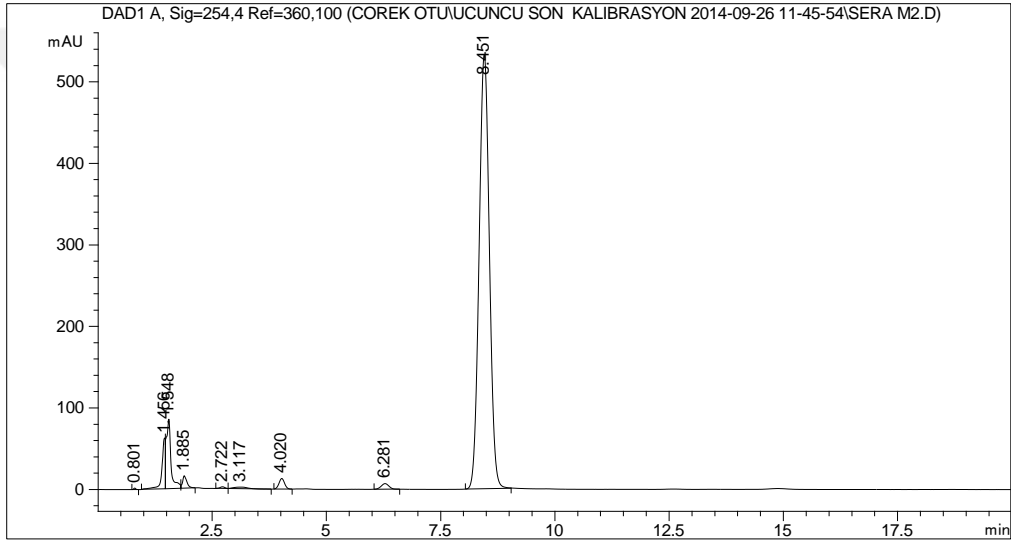
Sera denemelerinden elde edilen tohumların analizi sonucunda hiç bir ön uygulama yapılmamış tohumlarda (kontrol) timokinon miktarı %0,106 olarak belirlenmiş iken, %4 Mannitol ile ön uygulama yapılmış tohumlarda timokinon miktarı %0,141 olarak saptanmıştır.

Çizelge 5.14. Sera denemelerinde elde edilen tohumlarda Timokinon miktarı

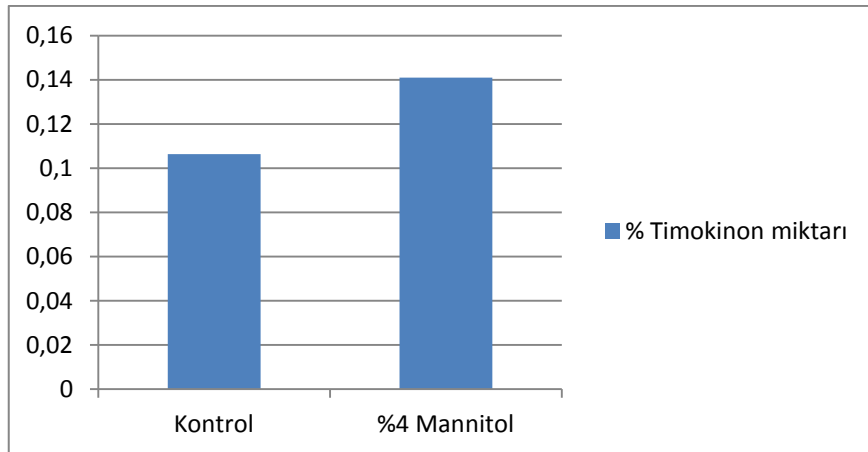
	1. Analiz	2. Analiz	3. Analiz	Ortalama ve Standart Sapma	Timokinon miktarı (%)
Kontrol	6273.2	6263.1	6271.3	6265.133±7.26	0,1063
Mannitol	8225.2	8348	8227.3	8266.833±7.3	0,1410



Şekil 5.22. Sera denemelerinden elde edilen kontrol tohumlarında YBSK kromatogramı



Şekil 5.23. Sera denemelerinden elde edilen %4 Mannitol ile priming yapılmış tohumlara ait YBSK kromatogramı



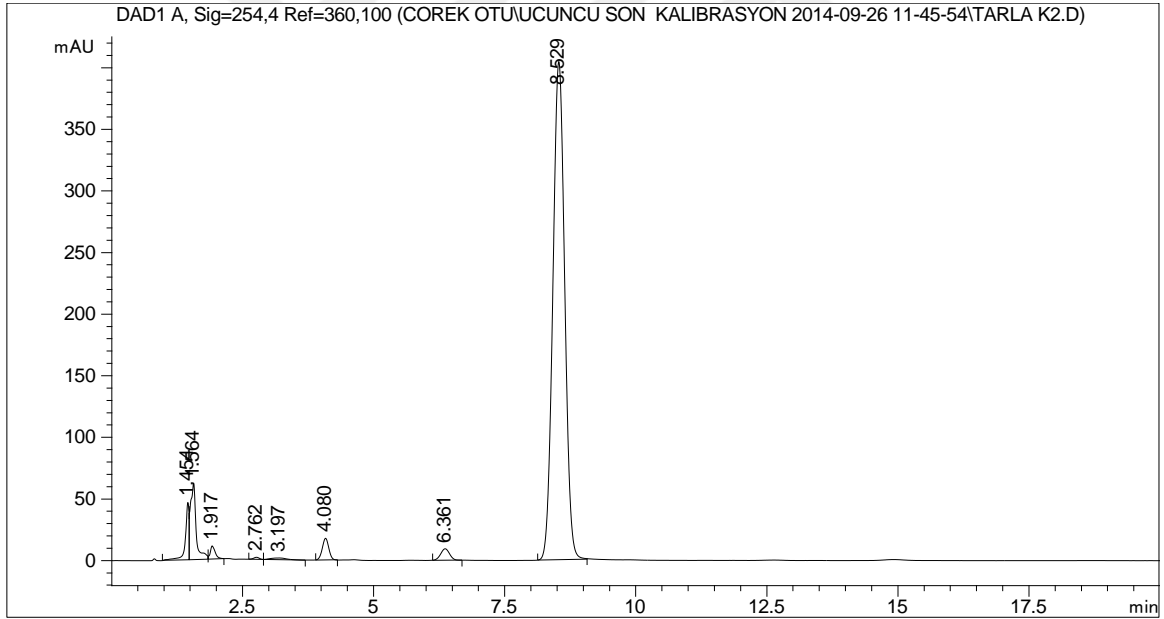
Şekil 5.24. Sera denemelerinden elde edilen kontrol ve %4 Mannitol ile priming yapılmış tohumlardaki Timokinin miktarı

5.3.5. TARLA DENEMELERİNDEN ELDE EDİLEN TOHUMLARIN ALANLARI VE KROMATOGRAMLARI

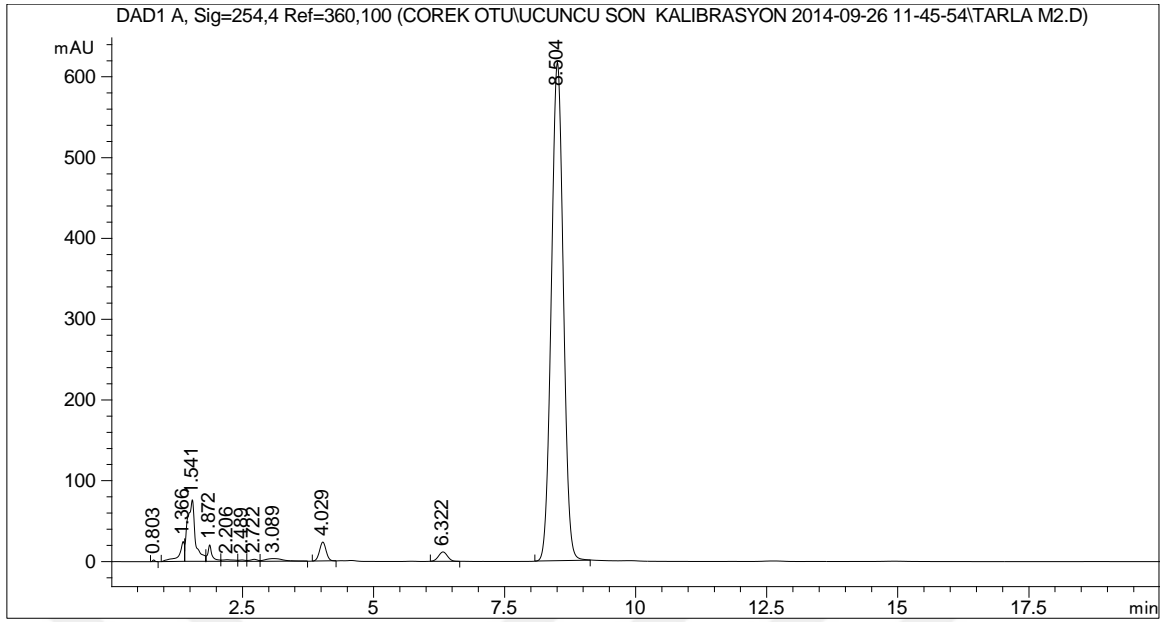
Tarla denemelerinden elde edilen tohumların analizi sonucunda hiç bir ön uygulama yapılmamış (kontrol) tohumlarda timokinon miktarı %0,1077 olarak belirlenmiş iken, %4 Mannitol ile ön uygulama yapılmış tohumlarda timokinon miktarı% 0,1670 olarak saptanmıştır.

Çizelge 5.15. Tarla denemelerinde elde edilen tohumlarda Timokinon miktarı

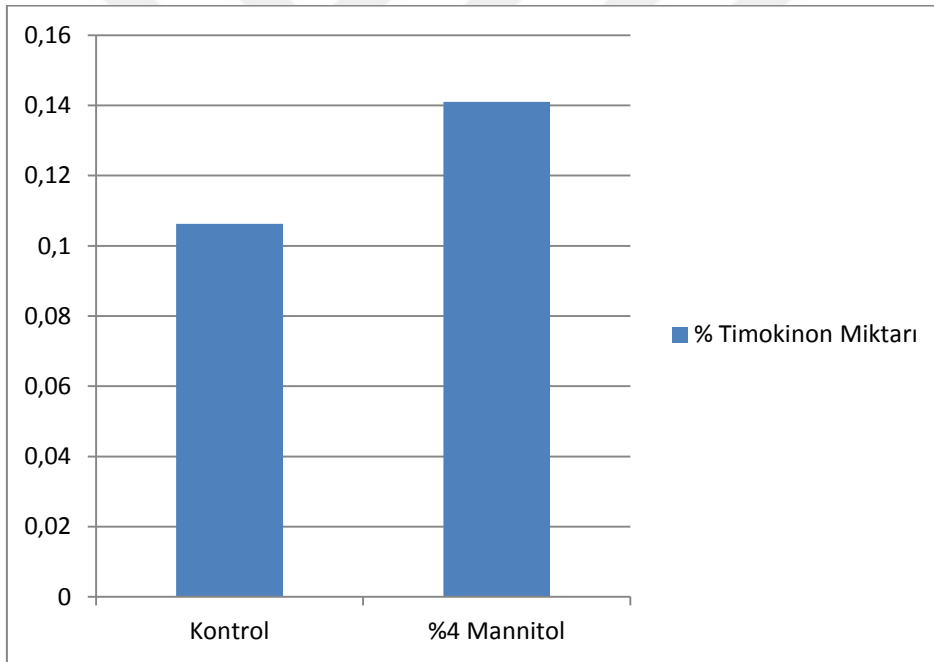
	1.Analiz	2.Analiz	3. Analiz	Ortalama ve Standart Sapma	PPM	Timokinon miktarı(%)
Kontrol	6436,8	6330,7	6271,3	6346,26±83,8	107,71	0,1077
Mannitol	9624,2	9804,1	9856,2	9761,5±121,7	167,06	0,1670



Şekil 5.25. Tarla denemelerinden elde edilen kontrol tohumlarında YBSK kromatogramı



Şekil 5.26. Tarla denemelerinden elde edilen %4 Mannitol ile priming yapılmış tohumlarında YBSK kromatogramı



Şekil 5.27. Tarla denemelerinden elde edilen kontrol ve Mannitol ile priming yapılmış tohumlarda timokinin miktarı

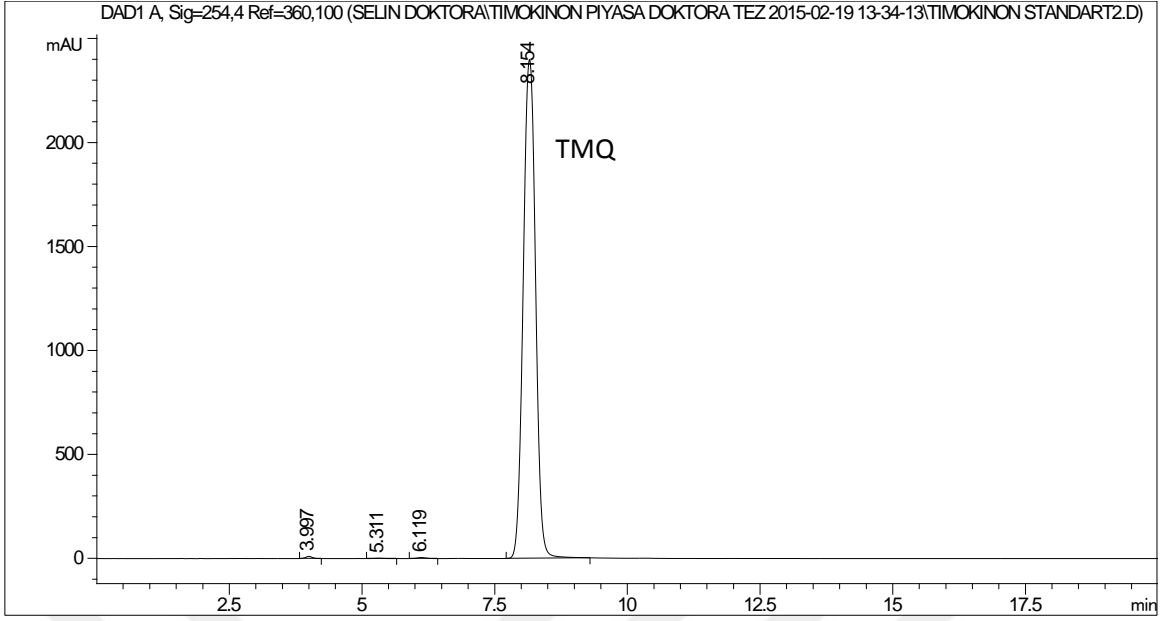
Timokinin analizlerinde 2 farklı denemeden (sera ve tarla denemeleri) çörek otu tohumlarının ekstraksiyonu yapılmış ve belirtilen yöntem dahilinde YBSK ile analiz edilmiştir. Yapılan analizler sonucunda en yüksek timokinin miktarına sahip örnekler tarla % 4 mannitol ile ön uygulama yapılmış çörek otu tohumların ekstresinden elde edilmiş iken , en düşük timokinin miktarı hiçbir ön uygulama yapılmamış tohum (kontrol)

ekstrelerinde bulunmuştur. Analizi yapılan çörek otu bitkisinin tohumlarından doku kültürü ile kallusu üretilmiş fakat kalluslarda tespit edilebilecek seviyede timokinon miktarına rastlanmamıştır.

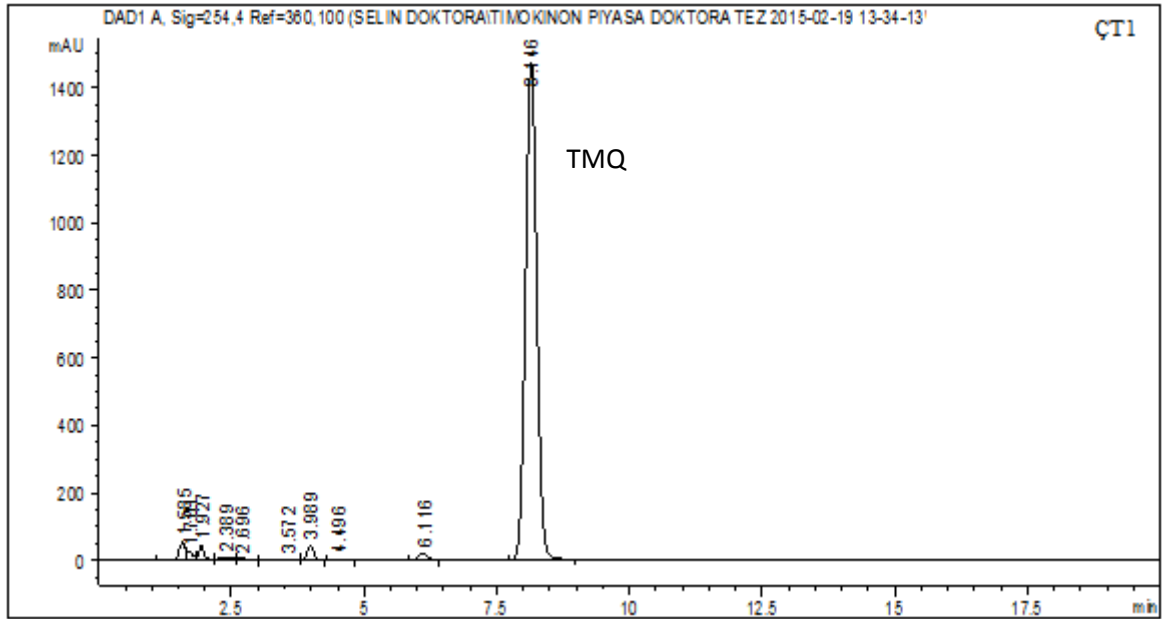
5.3.6. PİYASADAN TEMİN EDİLMİŞ ÇÖREK OTU TOHURLARININ ALANLARI VE KROMATOGRAMLARI

Çizelge 5.16. Piyasadan temin edilen çörek otu tohumlarının alanları ve içerisindeki % timokinon miktarları [marka isimleri ÇT (Çörek otu tohumu) olarak kısaltılmıştır]

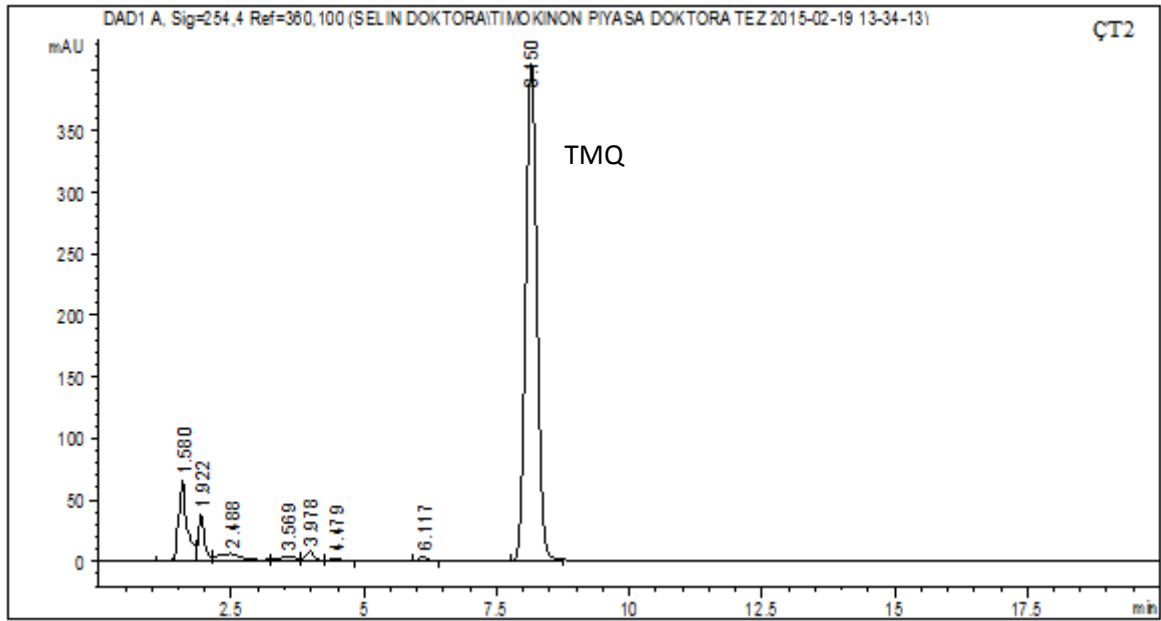
Örnek Kodu	Alan 1	Alan 2	Alan 3	Ortalama	Ppm	Timokinon
ÇT1	21773,7	21797,9	21817,3	21796,3	376,19	0,3762
ÇT2	5939,5	5931	5939,5	5936,667	100,59	0,1006
ÇT3	1017,2	1023,1	1025	1021,7667	15,19	0,0152
ÇT4	711,2	713,3	711,3	711,933	9,80	0,0098
ÇT5	1345,1	1359,9	1356,4	1353,8	20,95	0,0209
ÇT6	6250,9	6326,5	6348,8	6308,73	107,06	0,1070
ÇT7	5033	5031,6	5015,2	5026,6	84,78	0,0847
ÇT8	971,5	964,2	972,3	963,333	14,27	0,0142
ÇT9	6279,2	6281,8	6287,9	6282,967	106,61	0,1066
ÇT10	9624,2	9804,1	9856,2	9761,5	167,06	0,1671



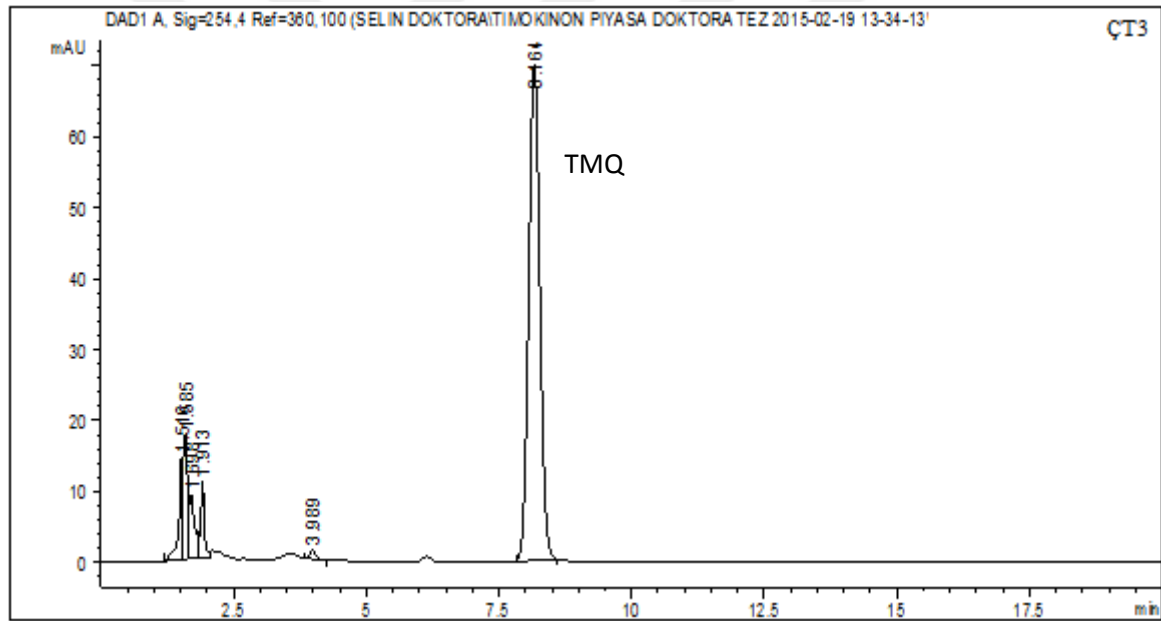
Şekil 5.28. Timokinin standardının metanollü ekstresine ait YBSK kromatogramı



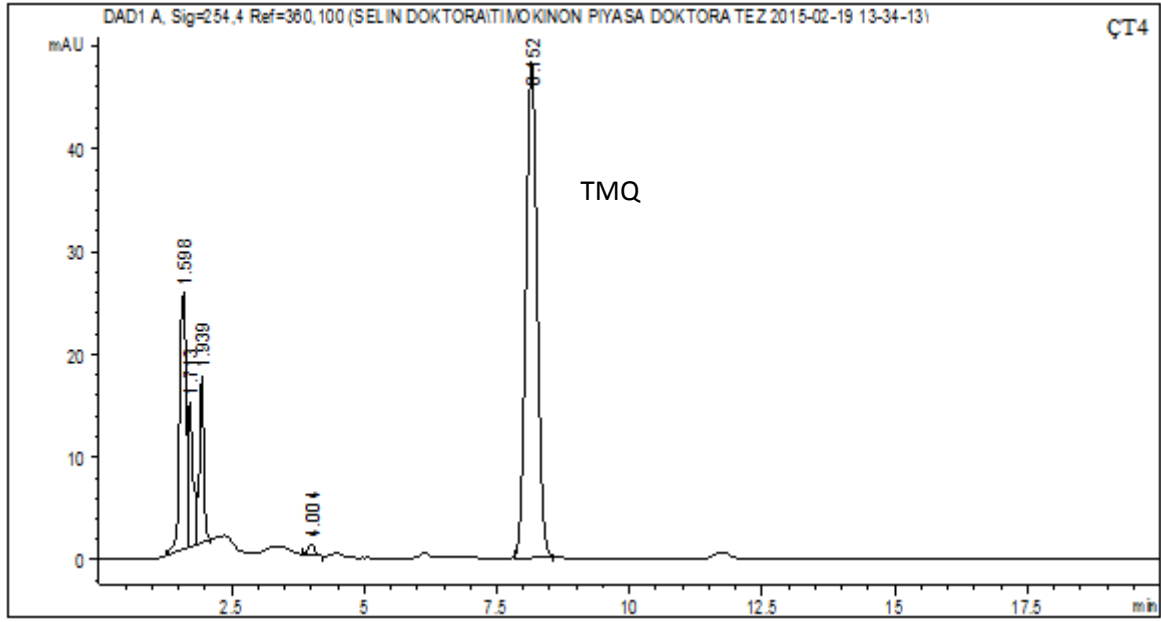
Şekil 5.29. ÇT1 kodlu çörek otu tohumunun metanollü ekstresine ait YBSK kromatogramı



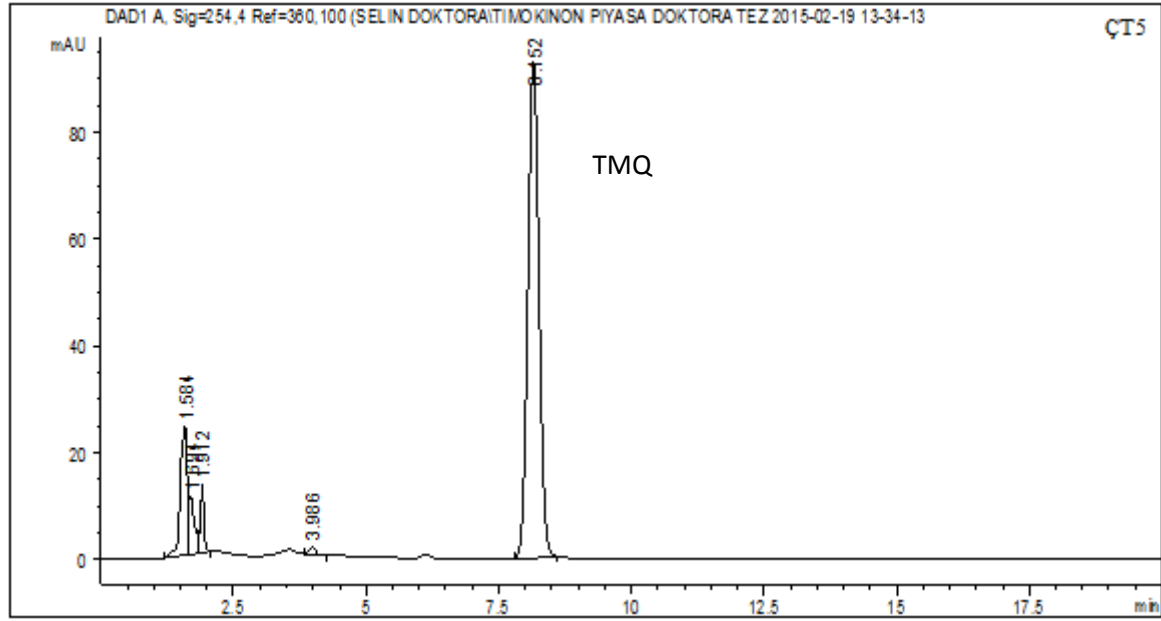
Şekil 5.30. ÇT2 kodlu çörek otu tohumunun metanollü ekstresine ait YBSK kromatogramı



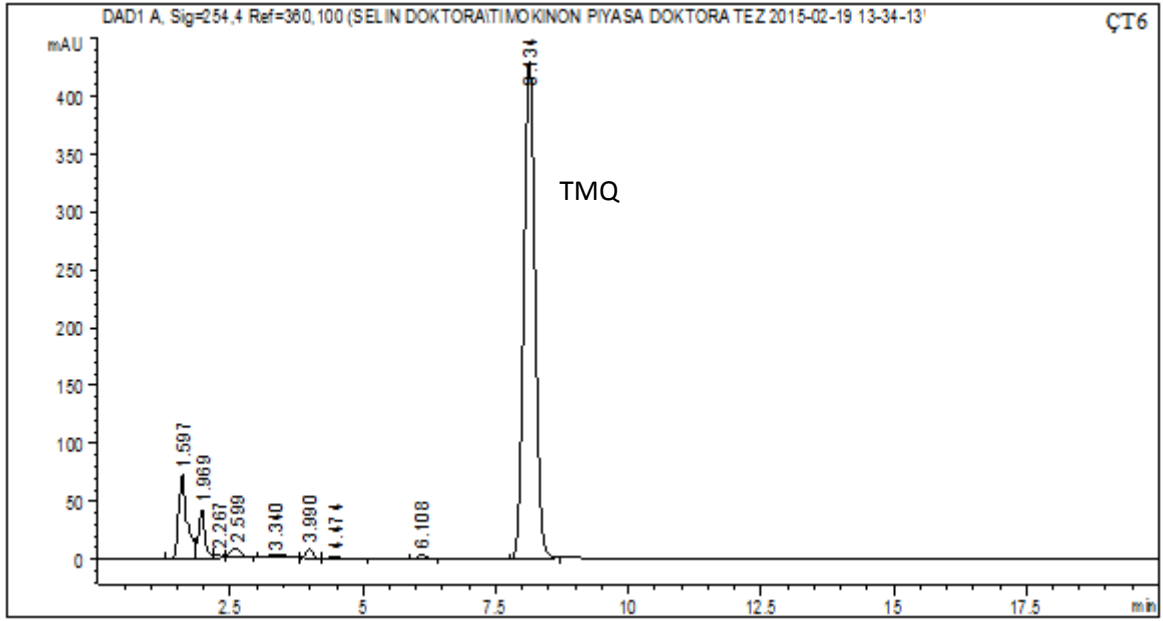
Şekil 5.31. ÇT3 kodlu çörek otu tohumunun metanollü ekstresine ait YBSK kromatogramı



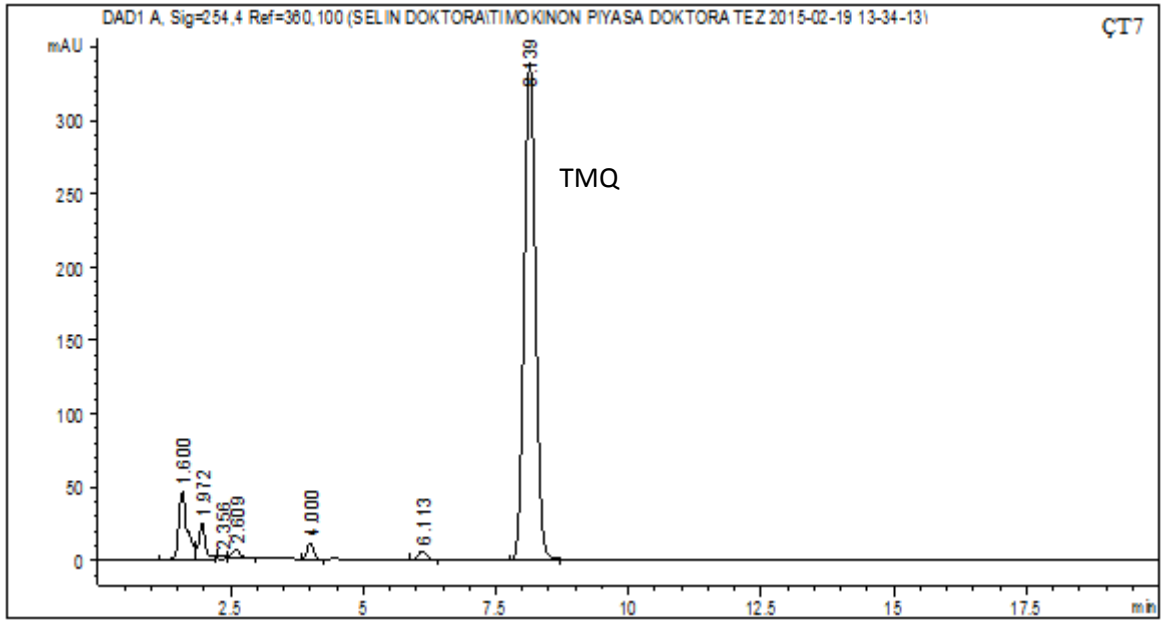
Şekil 5.32. ÇT4 kodlu çörek otu tohumunun metanollü ekstresine ait YBSK kromatogramı



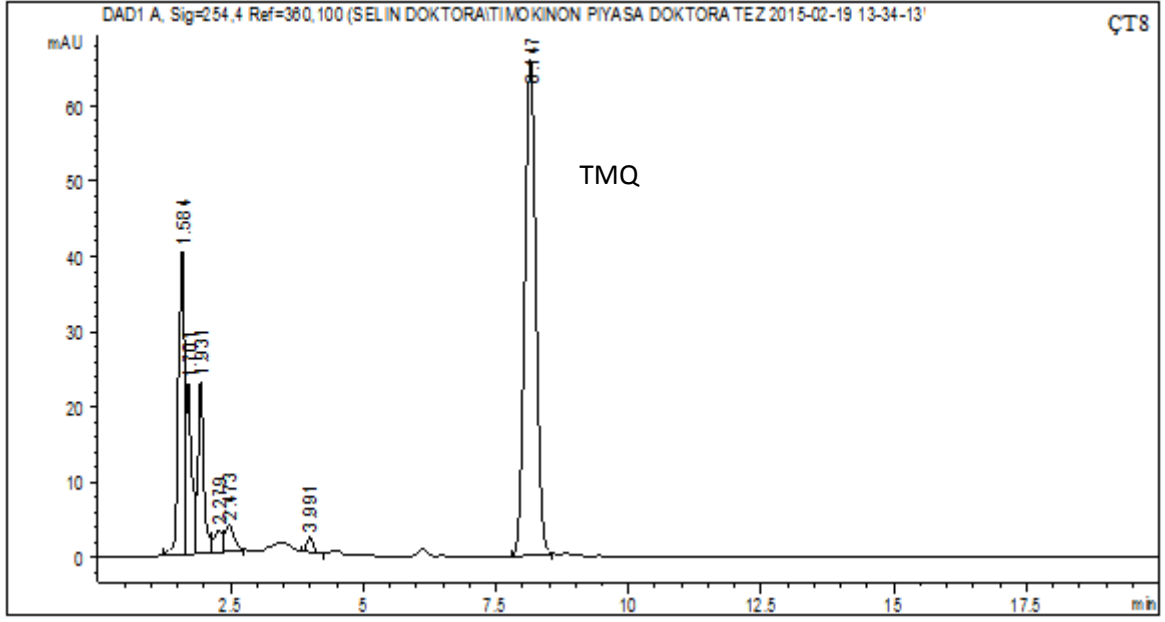
Şekil 5.33. ÇT5 kodlu çörek otu tohumunun metanollü ekstresine ait YBSK kromatogramı



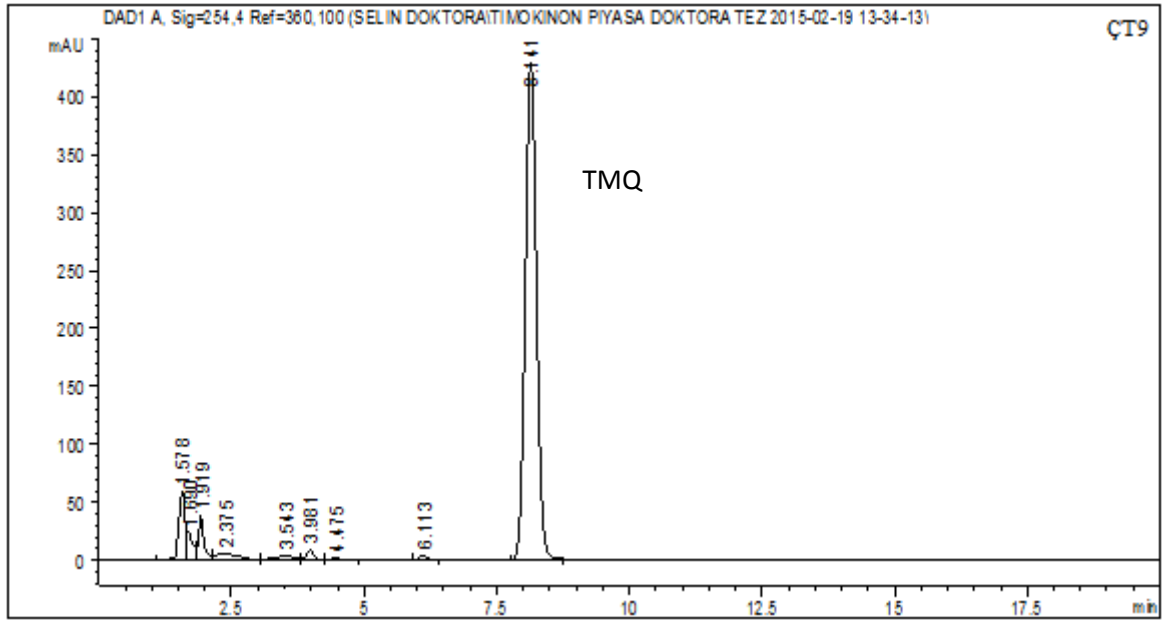
Şekil 5.34. ÇT6 kodlu çörek otu tohumunun metanollü ekstresine ait YBSK kromatogramı



Şekil 5.35. ÇT7 kodlu çörek otu tohumunun metanollü ekstresine ait YBSK kromatogramı



Şekil 5.36. ÇT8 kodlu çörek otu tohumunun metanollü ekstresine ait YBSK kromatogramı

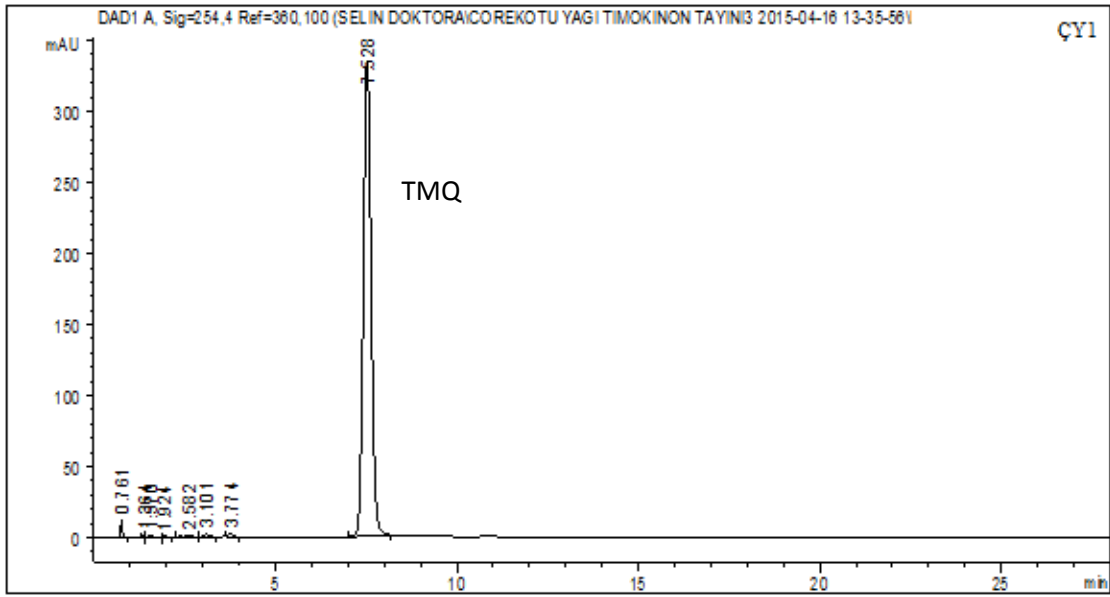


Şekil 5.37. ÇT9 kodlu çörek otu tohumunun metanollü ekstresine ait YBSK kromatogramı

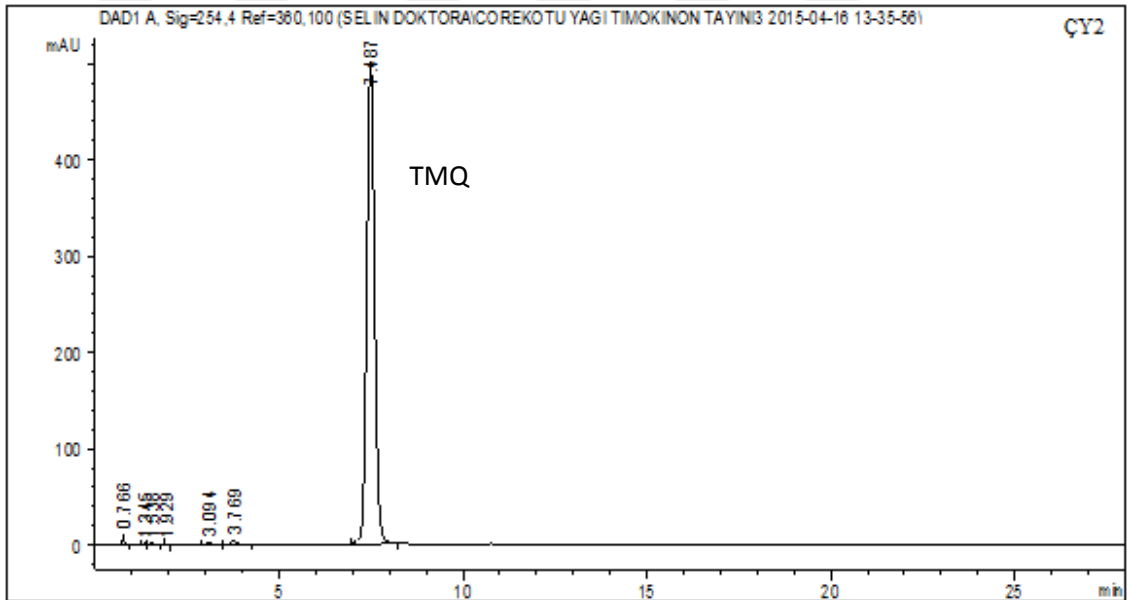
5.3.7. PİYASADAN TEMİN EDİLMİŞ ÇÖREK OTU YAĞLARININ ALANLARI VE KROMATOGRAMLARI

Çizelge 5.17. Piyasadan temin edilen çörek otu yağlarının alanları ve içerisindeki % timokinon miktarları [marka isimleri ÇY (Çörek otu yağı) olarak kısaltılmıştır]

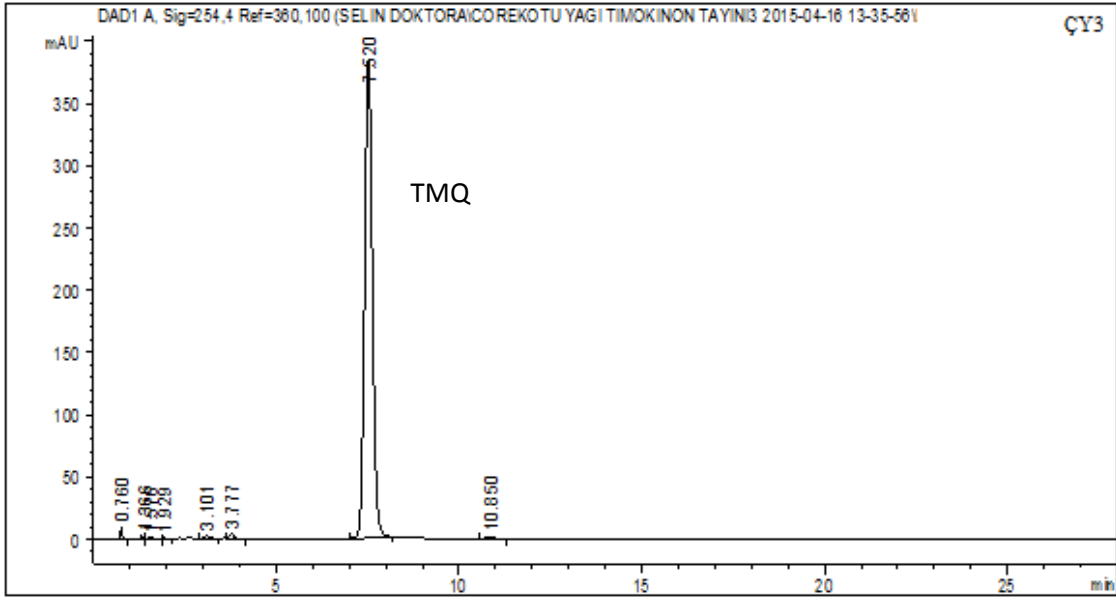
Örnek Kodu	Alan 1	Alan 2	Alan 3	Ortalama	PPM	% Timokinon
ÇY1	4991,6	4995,4	4995,2	4994,06	84,21	0,23019
ÇY2	7430,6	7432,2	7422,8	7428,53	126,52	0,34582
ÇY3	5711,4	5717,5	5668,2	5699,03	96,46	0,26367
ÇY4	1193	1189,5	1188,8	1190,43	18,12	0,04953
ÇY5	13177,3	13138	13192	13169,1	226,27	0,61848
ÇY6	10374,9	10384,9	10407	10388,93	177,96	0,48643
ÇY7	4174,2	4166,8	4174,9	4171,96	69,93	0,19114
ÇY8	3360,2	3366,4	3357,9	3361,5	55,84	0,15265
ÇY9	10249,7	10239,5	10244,2	10244,46	175,45	0,47957
ÇY10	3114,2	3150,6	3127,3	3130,7	51,83	0,14168



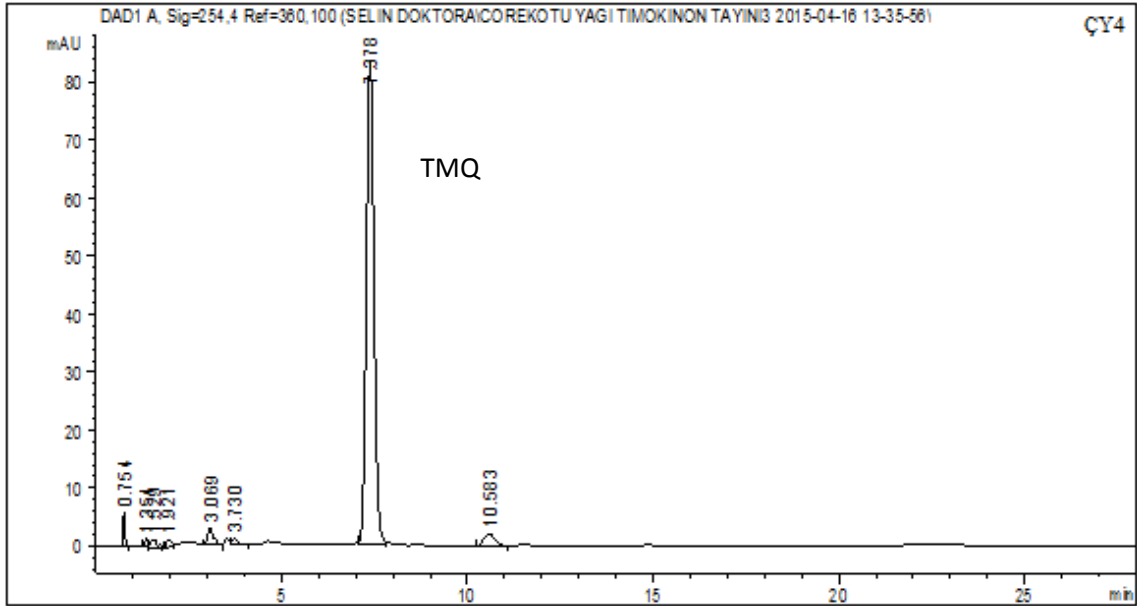
Şekil 5.38. ÇY1 kodlu çörek otu yağının metanollü ekstresine ait YBSK kromatogramı



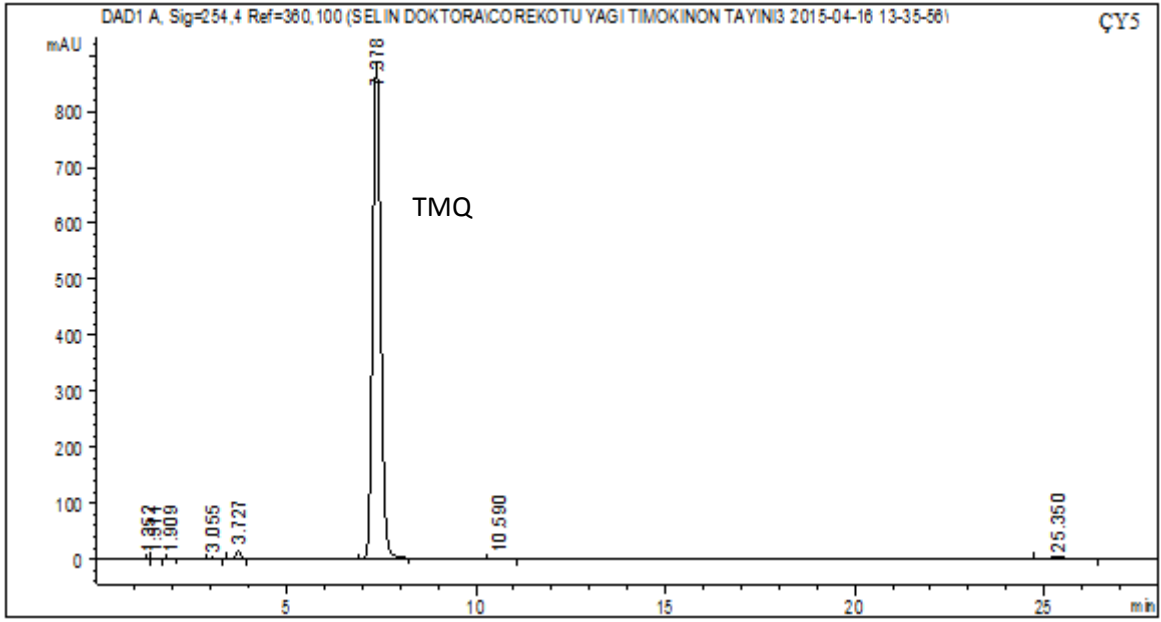
Şekil 5.39. ÇY2 kodlu çörek otu yağının metanollü ekstresine ait YBSK kromatogramı



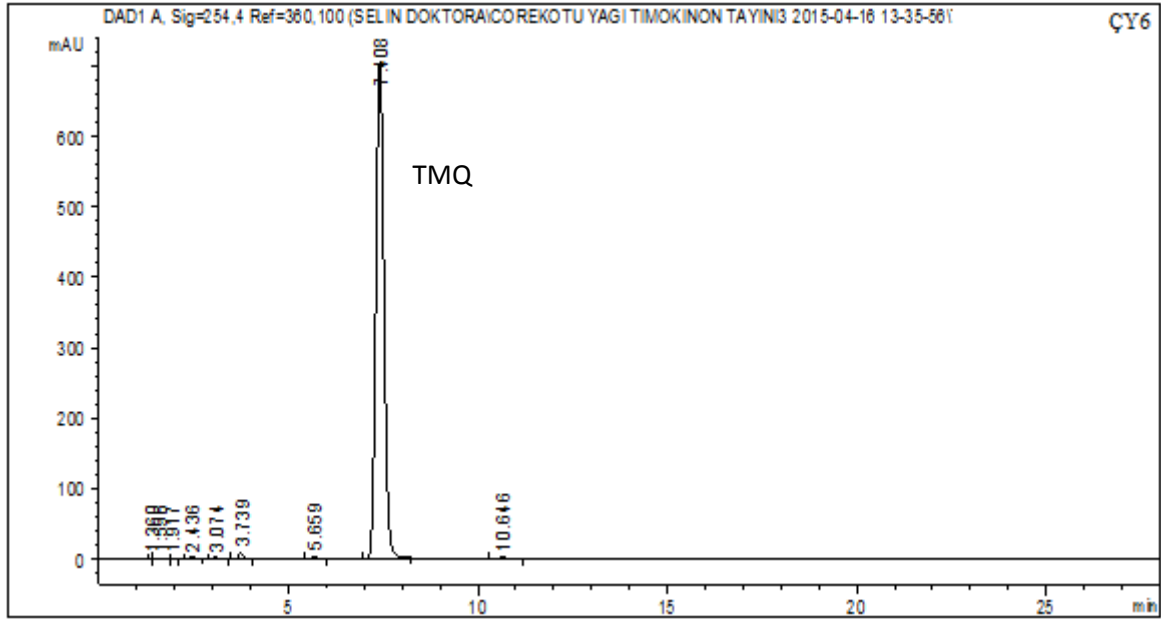
Şekil 5.40. ÇY3 kodlu çörek otu yağının metanollü ekstresine ait YBSK kromatogramı



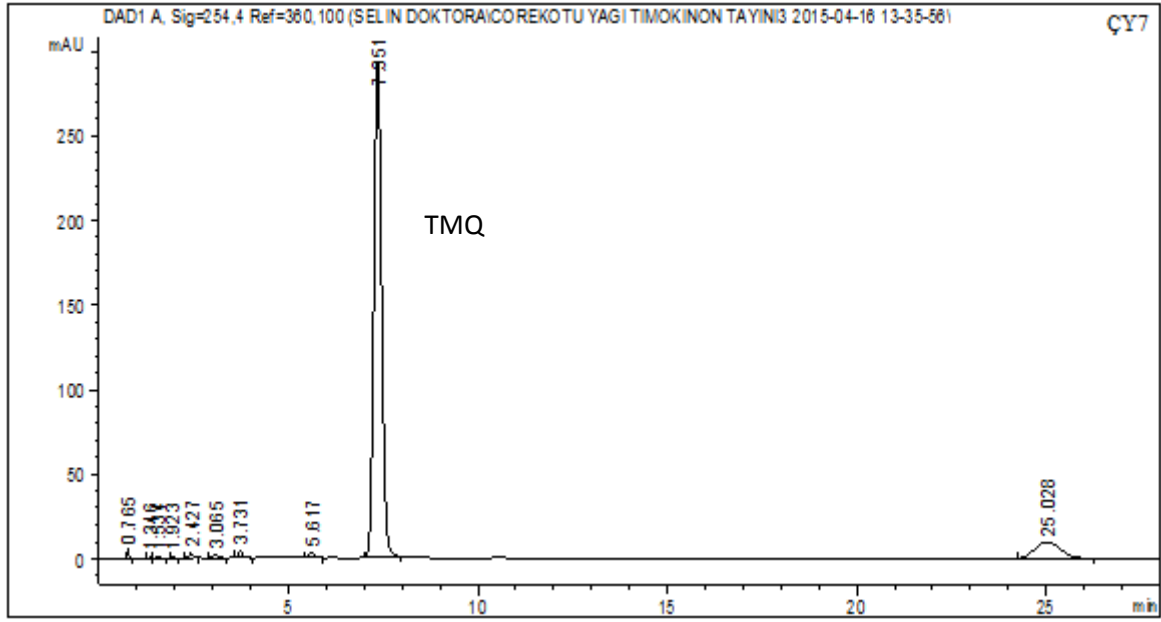
Şekil 5.41. ÇY4 kodlu çörek otu yağının metanollü ekstresine ait YBSK kromatogramı



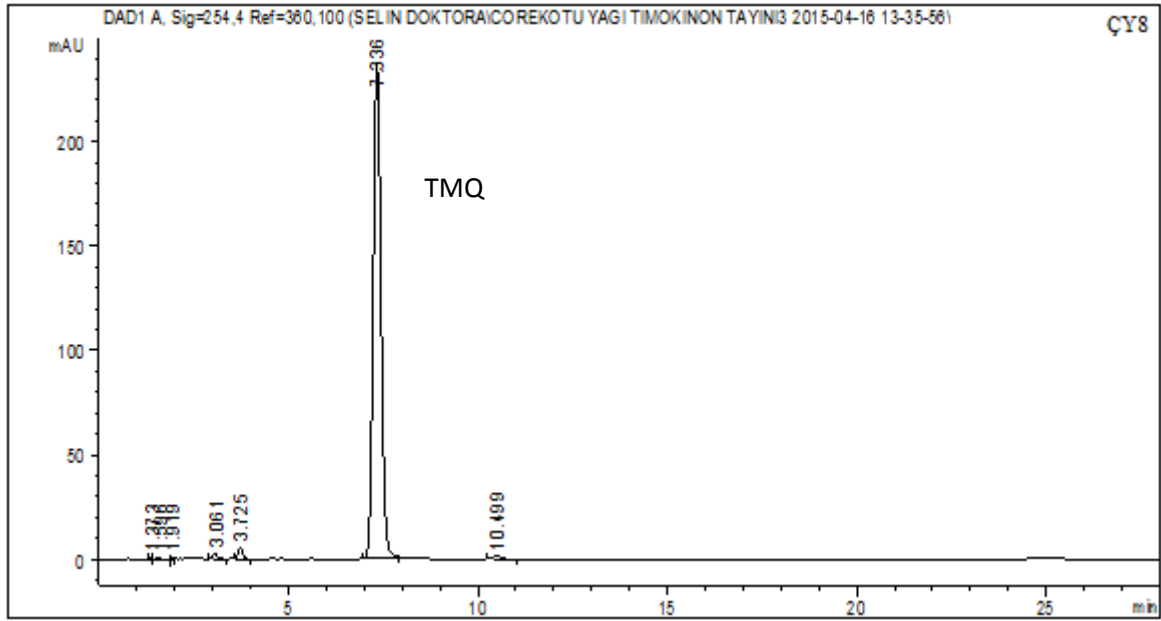
Şekil 5.42. ÇY5 kodlu çörek otu yağının metanollü ekstresine ait YBSK kromatogramı



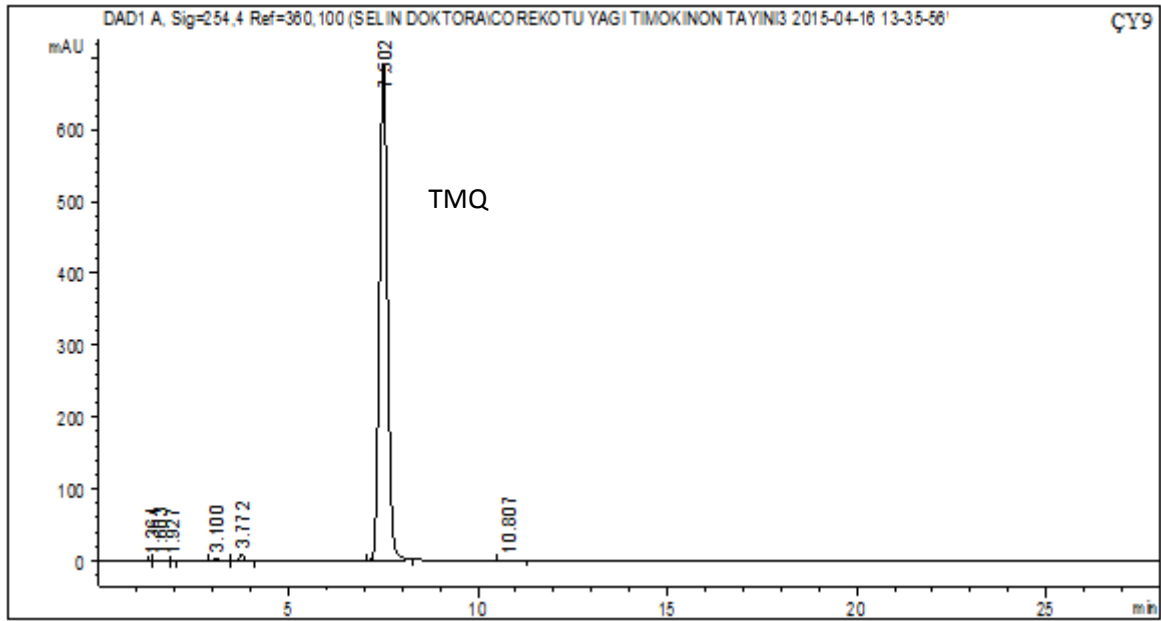
Şekil 5.43. ÇY6 kodlu çörek otu yağının metanollü ekstresine ait YBSK kromatogramı



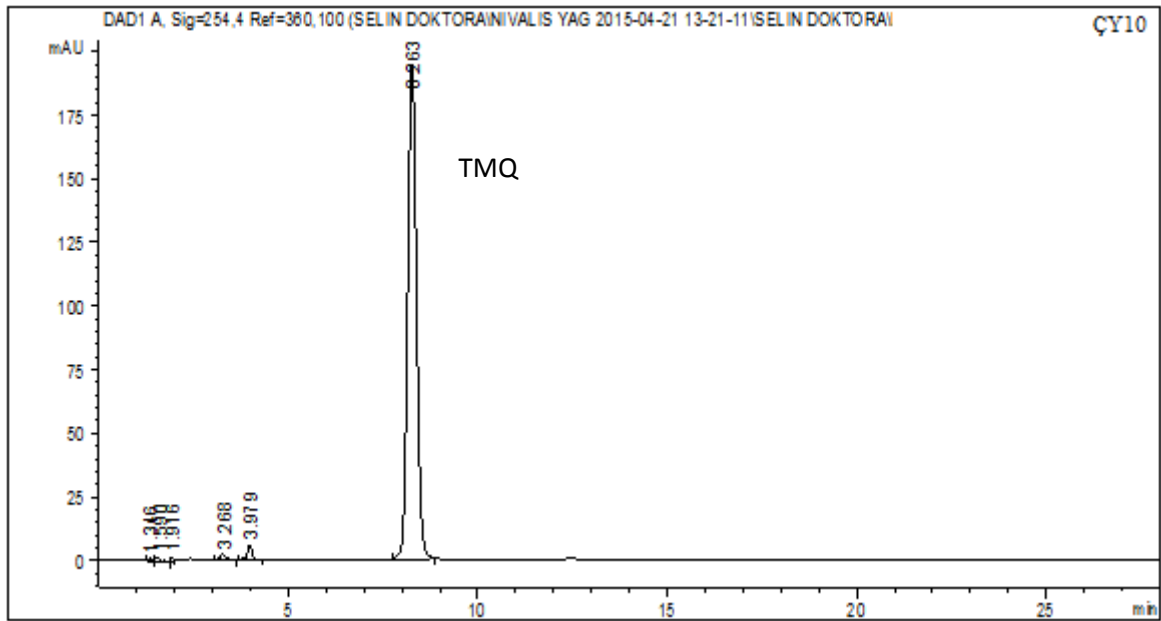
Şekil 5.44. ÇY7 kodlu çörek otu yağının metanollü ekstresine ait YBSK kromatogramı



Şekil 5.45. ÇY8 kodlu çörek otu yağının metanollü ekstresine ait YBSK kromatogramı



Şekil 5.46. ÇY9 çörek otu yağının metanollü ekstresine ait YBSK kromatogramı

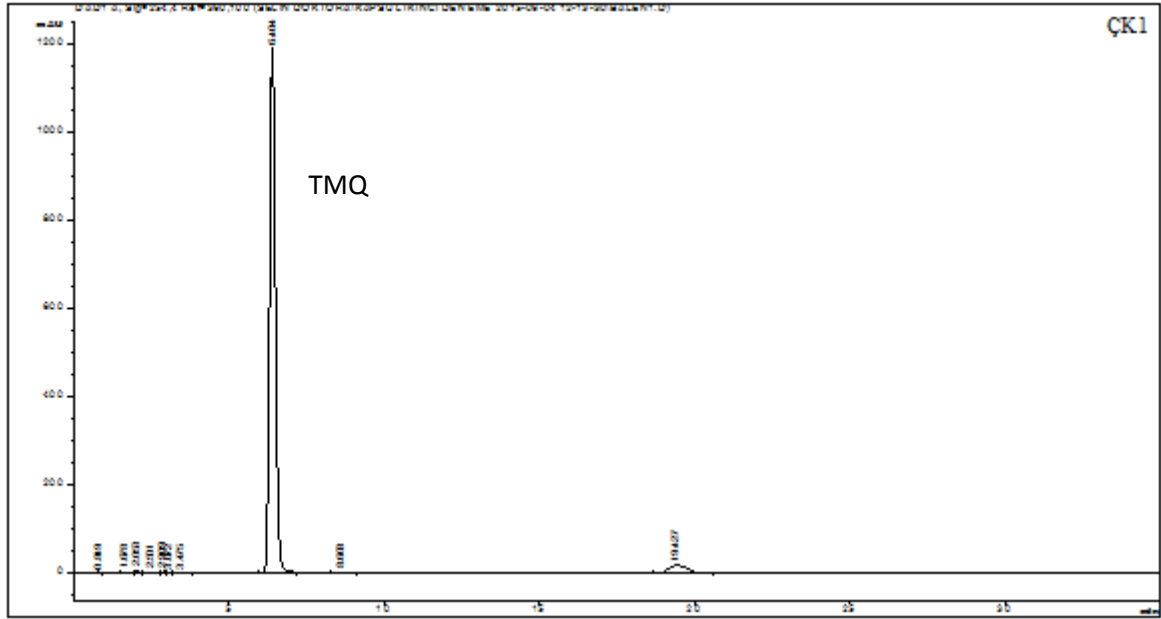


Şekil 5.47. ÇY10 çörek otu yağının metanollü ekstresine ait YBSK kromatogramı

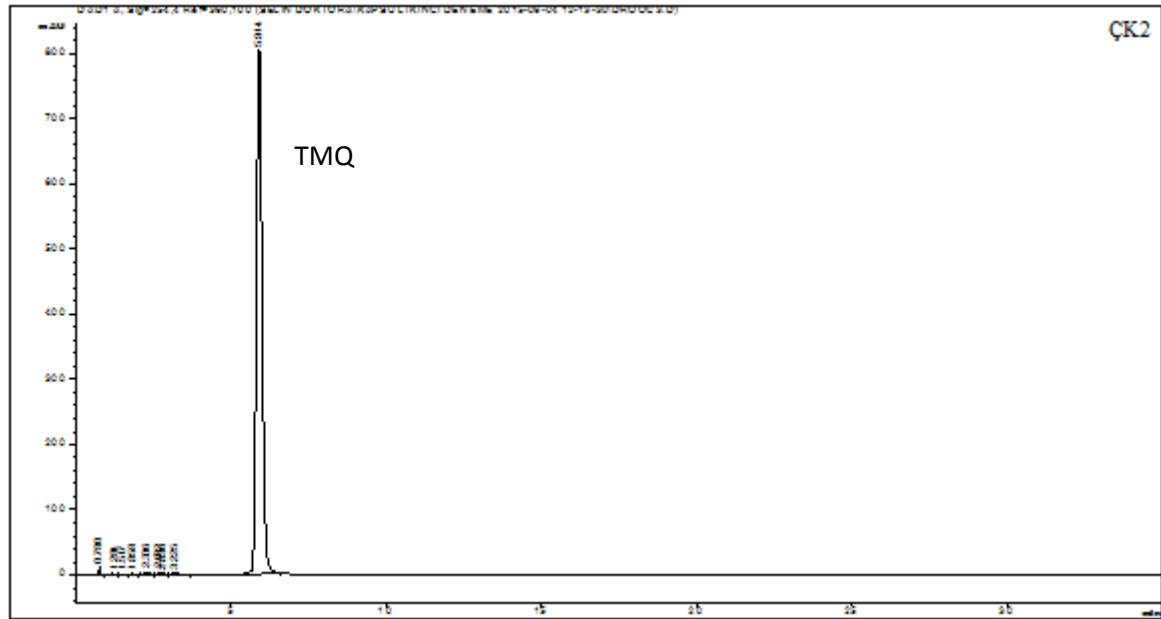
5.3.8. PİYASADAN TEMİN EDİLMİŞ ÇÖREK OTU YAĞI KAPSÜLLERİNİN ALANLARI VE KROMATOGRAMLARI

Çizelge 5.18. Piyasadan temin edilen çörek otu yağlarının alanları ve içerisindeki % timokinon miktarları (marka isimleri ÇY (Çörek otu yağı) olarak kısaltılmıştır)

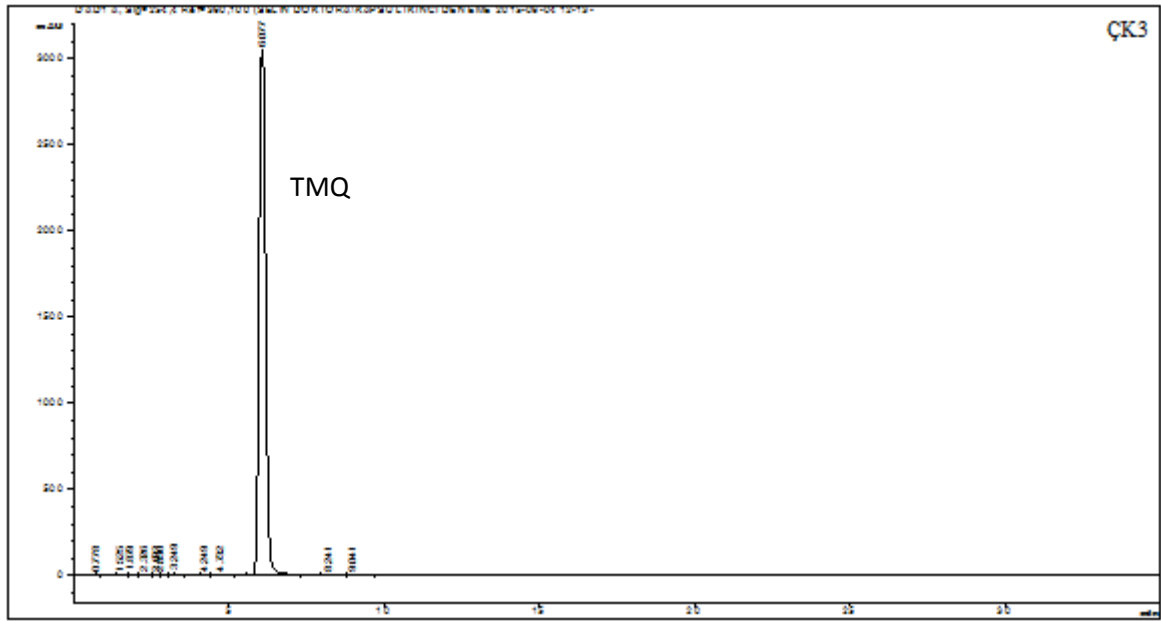
Örnek Kodu	Alan 1	Alan 2	Alan 3	Ortalama	PPM	% Timokinon
ÇK1	15560,7	15545,9	15549,2	15551,93	267,68	0,73166
ÇK2	10825,4	10817,5	10812	10818,3	185,42	0,50683
ÇK3	42742,1	43015,8	42455,8	42737,9	740,09	2,02293
ÇK4	914,3	925,3	926,9	922,16	13,45	0,03678
ÇK5	17221,9	17224	17227,4	17224,43	296,74	0,81110
ÇK6	2293	2291,3	2309	2297,76	37,36	0,10212
ÇK7	4568,3	4568,8	4561,1	4566,06	76,77	0,20986
ÇK8	1055	1047,4	1047,6	1050	15,68	0,04286
ÇK9	5585,7	5526,7	5597	5569,8	94,22	0,25754
ÇK10	6226,8	6223,6	6231,8	6227,4	105,64	0,28877



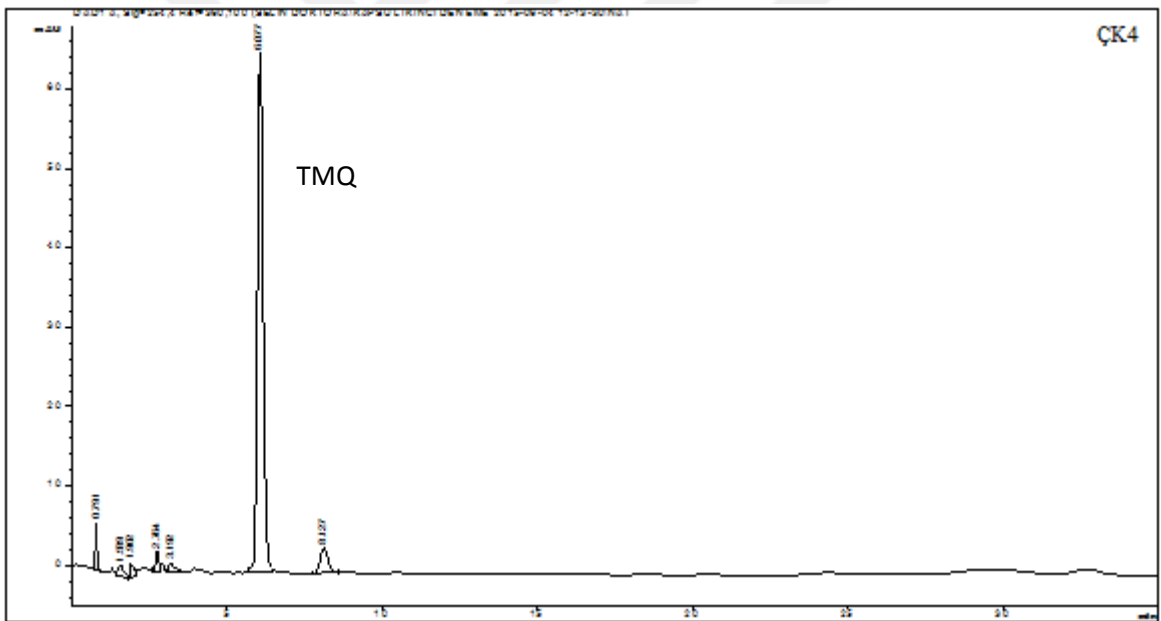
Şekil 5.48. ÇK1 kodlu çörek otu yağı kapsülünün metanollü ekstresine ait YBSK kromatogramı



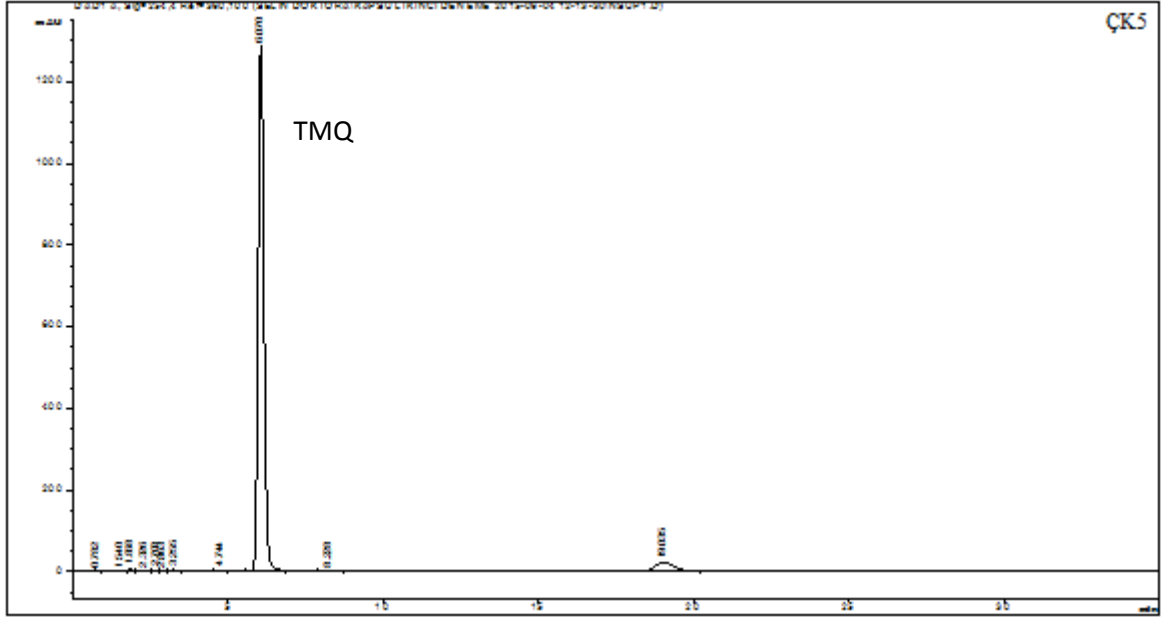
Şekil 5.49. ÇK2 kodlu çörek otu yağı kapsülünün metanollü ekstresine ait YBSK kromatogramı



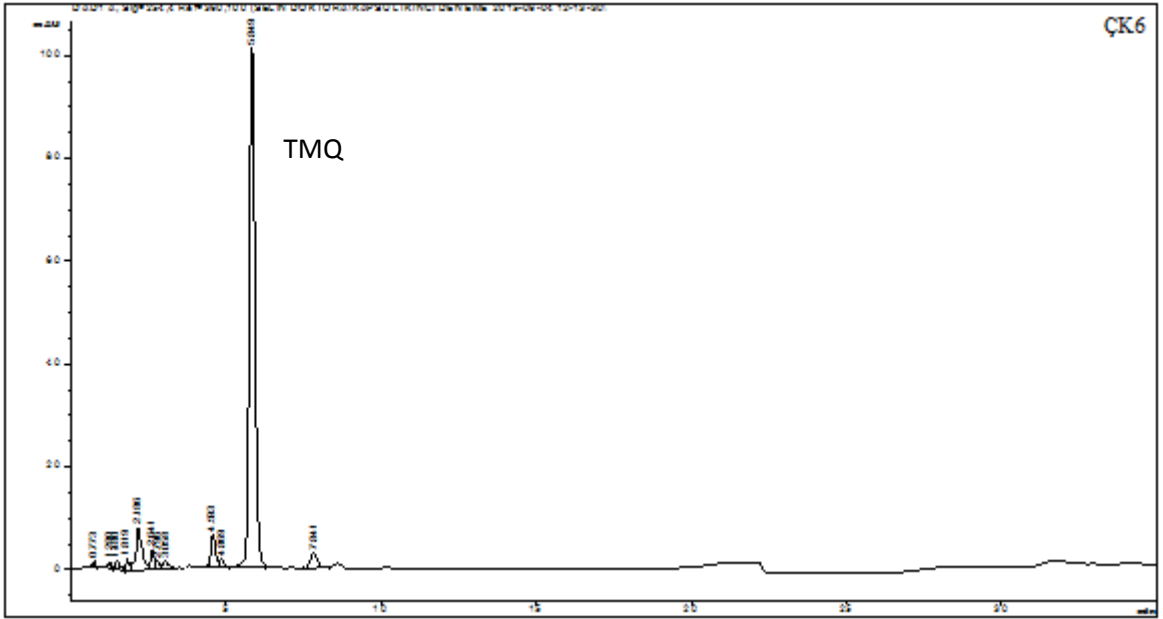
Şekil 5.50. ÇK3 kodlu çörek otu yağı kapsülünün metanollü ekstresine ait YBSK kromatogramı



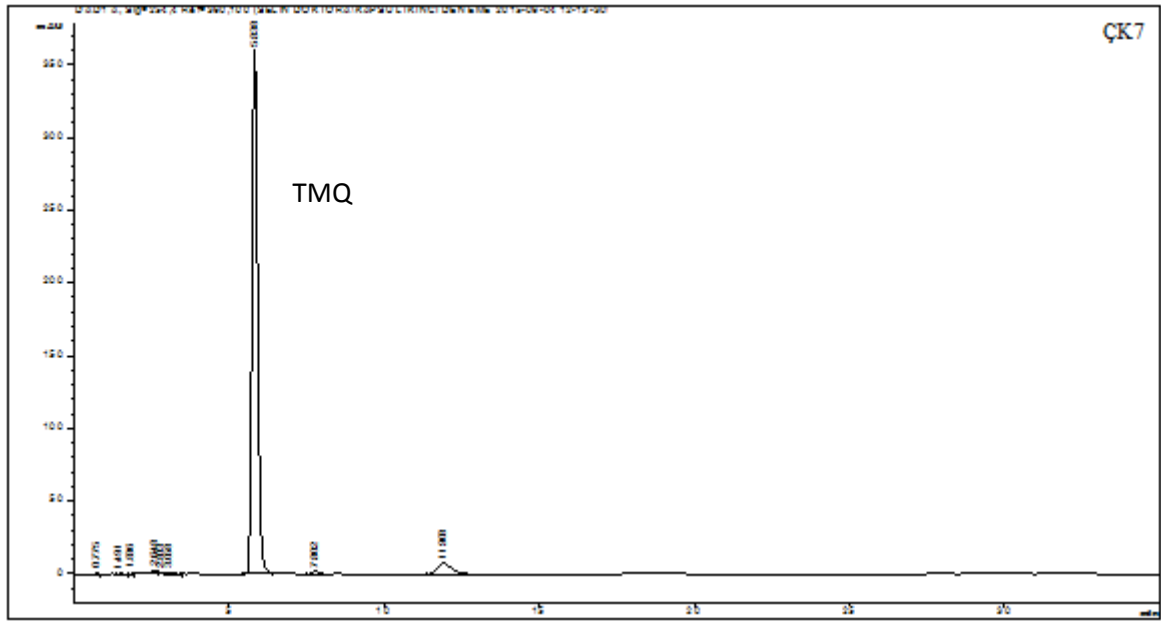
Şekil 5.51. ÇK4 kodlu çörek otu yağı kapsülünün metanollü ekstresine ait YBSK kromatogramı



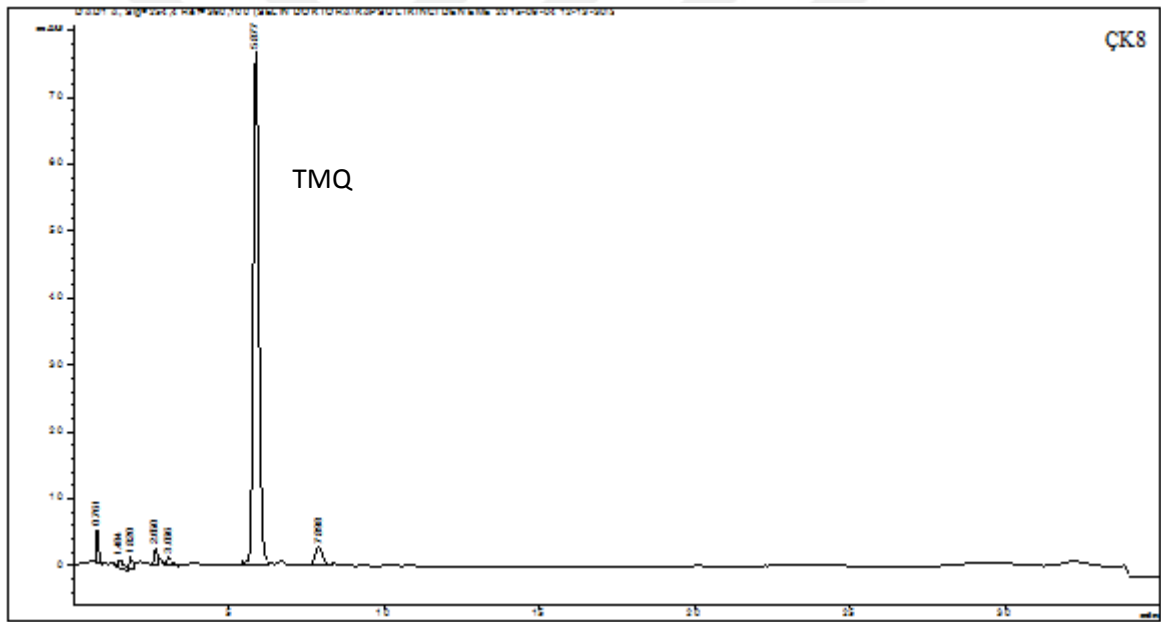
Şekil 5.52. 5K5 kodlu erek otu yağı kapsulünün metanollü ekstresine ait YBSK kromatogramı



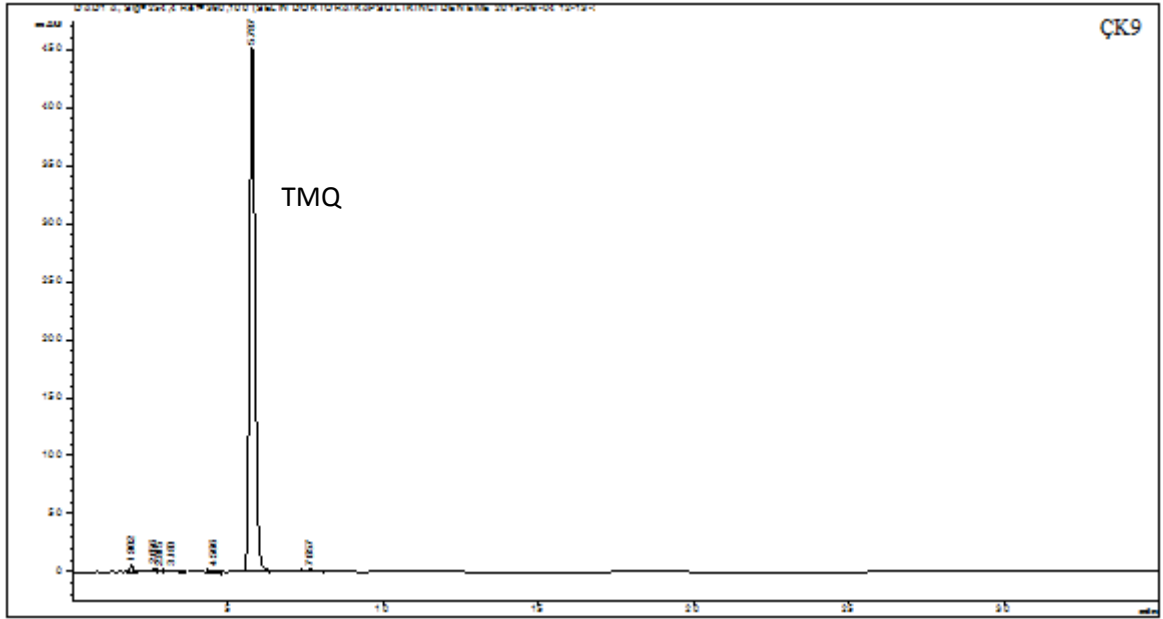
Şekil 5.53. 5K6 kodlu erek otu yağı kapsulünün metanollü ekstresine ait YBSK kromatogramı



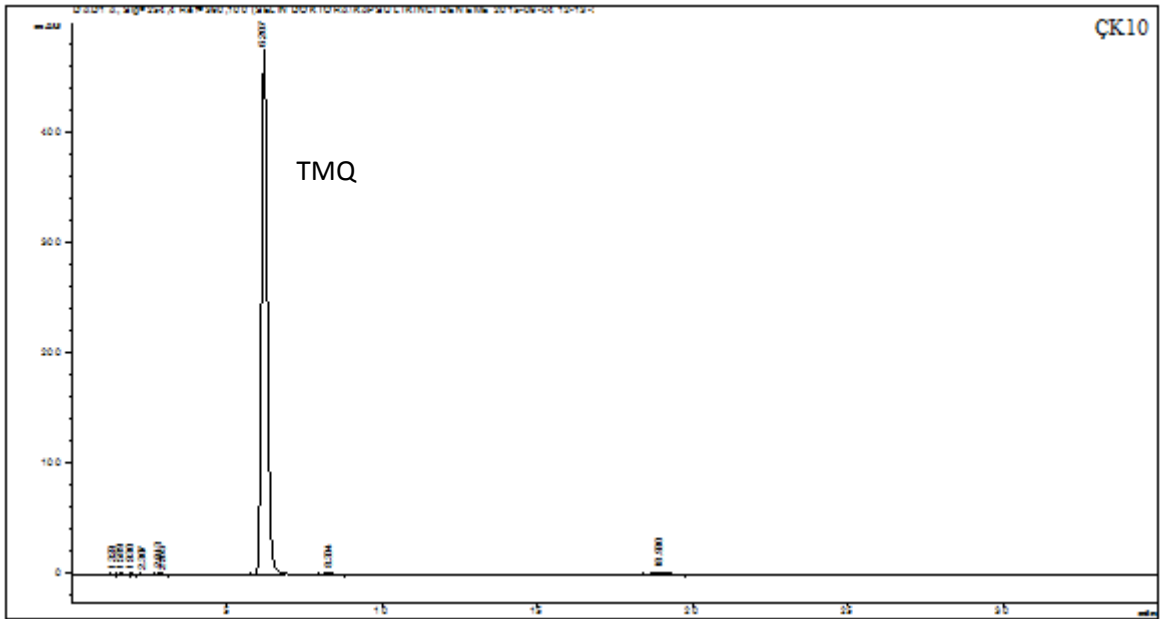
Şekil 5.54. ÇK7 kodlu çörek otu kapsülünün metanollü ekstresine ait YBSK kromatogramı



Şekil 5.55. ÇK8 kodlu çörek otu yağı kapsülünün metanollü ekstresine ait YBSK kromatogramı



Şekil 5.56. ÇK9 kodlu çörek otu yağı kapsülünün metanollü ekstresine ait YBSK kromatogramı

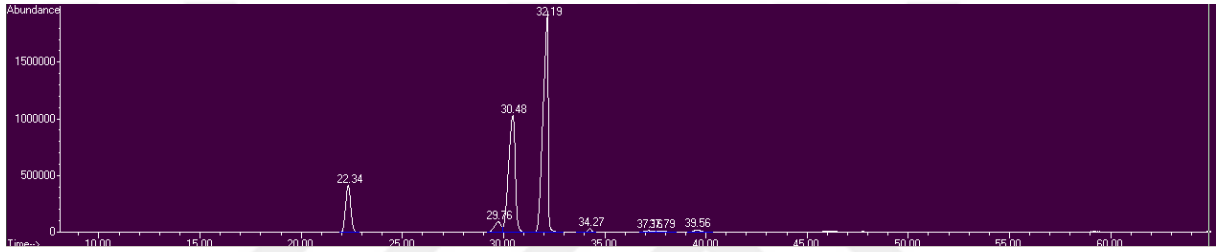


Şekil 5.57. ÇK10 kodlu çörek otu yağı kapsülünün metanollü ekstresine ait YBSK kromatogramı

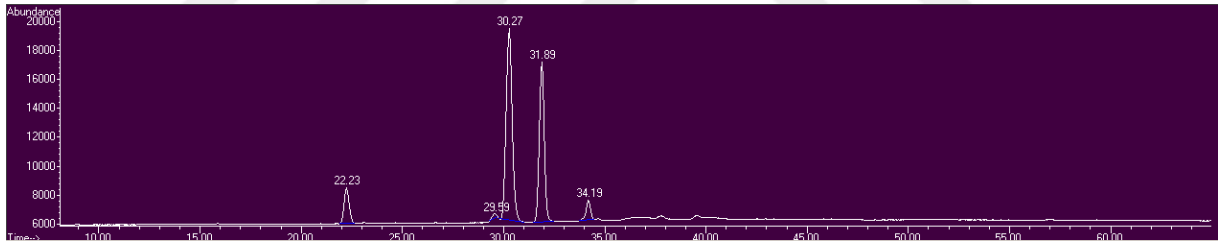
5.4. GK-KS İLE YAĞ ASİDİ PROFİLİ ELDESİ ÇALIŞMALARI

5.4.1. PİYASADAN TEMİN EDİLEN ÇÖREK OTU YAĞLARININ GK-KS KROMATOGRAMLARI VE YAĞ ASİDİ PROFİLİ

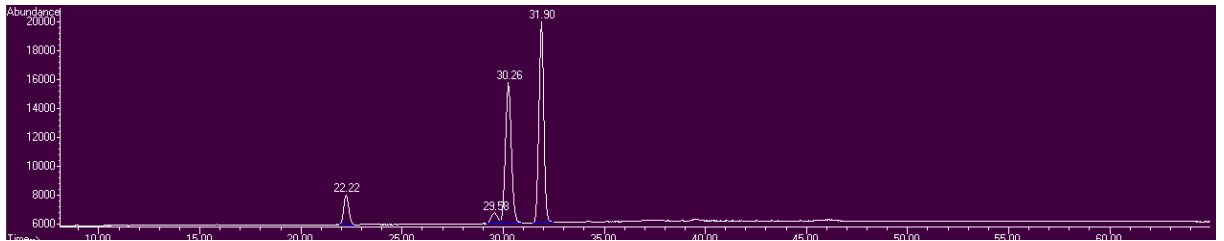
Piyasadan elde edilmiş 10 farklı markaya ait çörek otu yağlarının metilasyon işlemi yapılmış ve GK-KS kullanılarak yağ asidi profilleri çıkarılmıştır. ÇY6 ile ÇY10 kodlu numunelerin metilasyon işlemlerinin üç kez tekrarlanmasına rağmen GK’de kaydadeğer bir veri elde edilememiştir. Marka isimleri ÇY (Çörek otu yağı) olarak kısaltılmıştır. Sonuçlara ait çizelge, EK-1 bölümünde verilmiştir.



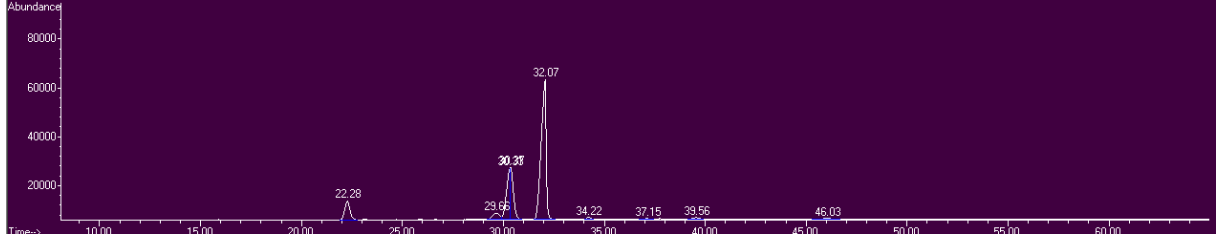
Şekil 5.58. ÇY1 kodlu metillenmiş çörek otu yağına ait GK-KS kromatogramı



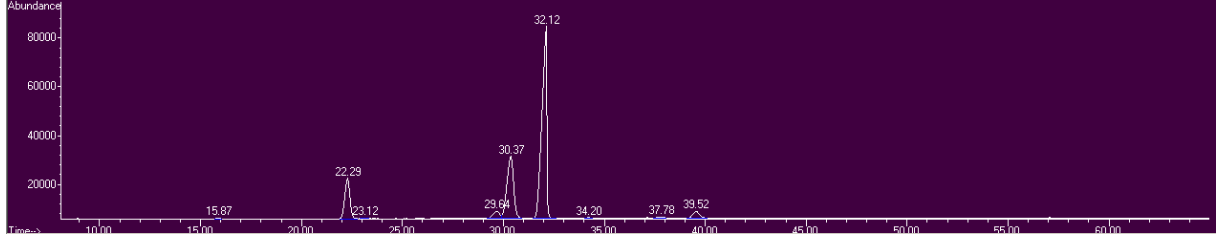
Şekil 5.59. ÇY2 kodlu metillenmiş çörek otu yağına ait GK-KS kromatogramı



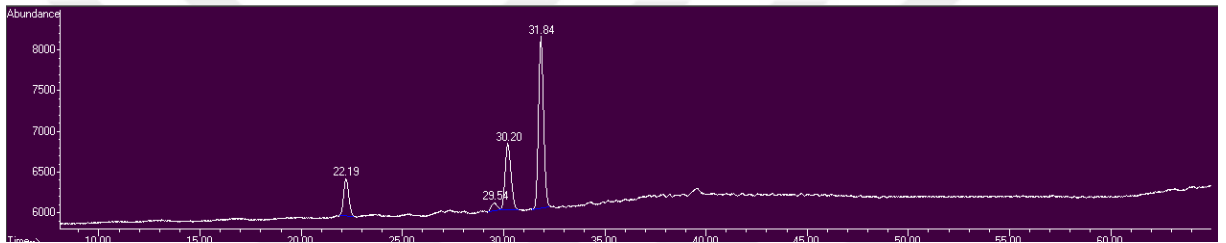
Şekil 5.60. ÇY3 kodlu metillenmiş çörek otu yağına ait GK-KS kromatogramı



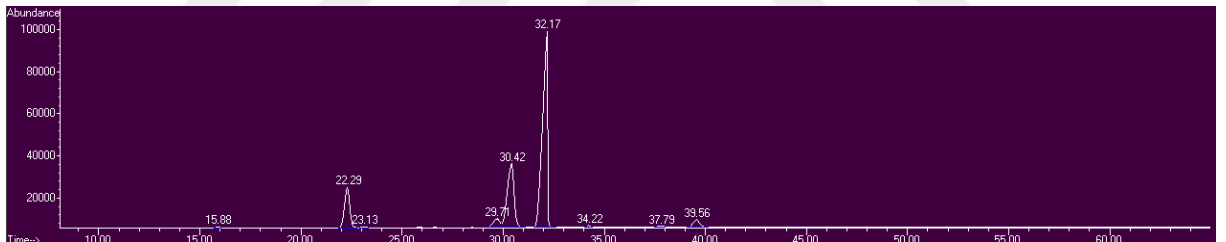
Şekil 5.61. ÇY4 kodlu metillemiş çörek otu yağına ait GK-KS kromatogramı



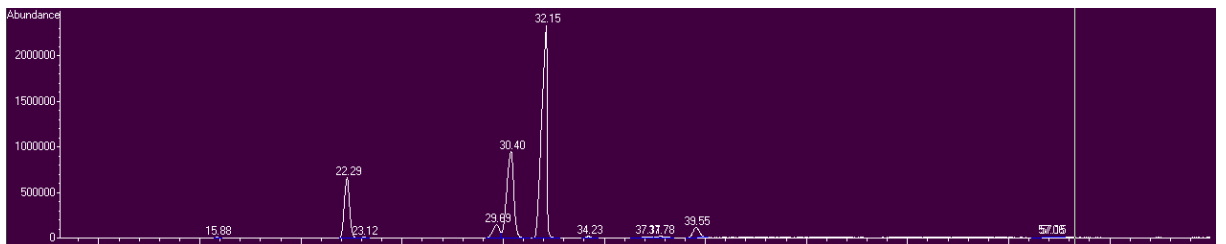
Şekil 5.62. ÇY5 kodlu metillemiş çörek otu yağına ait GK-KS kromatogramı



Şekil 5.63. ÇY7 kodlu metillemiş çörek otu yağına ait GK-KS kromatogramı



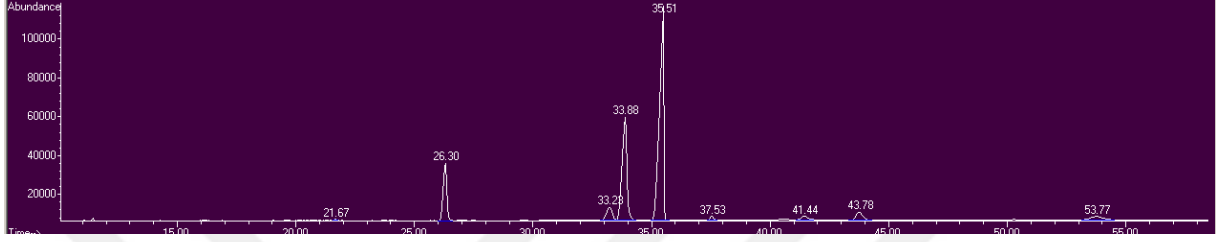
Şekil 5.64. ÇY8 kodlu metillemiş çörek otu yağına ait GK-KS kromatogramı



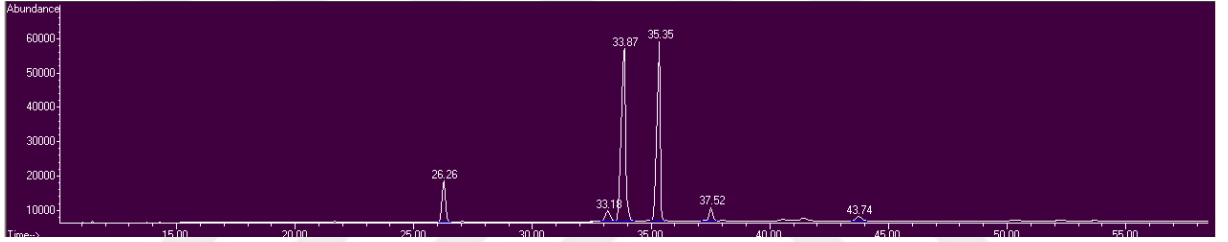
Şekil 5.65. ÇY9 kodlu metillemiş çörek otu yağına ait GK-KS kromatogramı

5.4.2. PİYASADAN TEMİN EDİLEN ÇÖREK OTU YAĞI KAPSÜLLERİNİN GK-KS KROMATOGRAMLARI VE YAĞ ASİDİ PROFİLİ

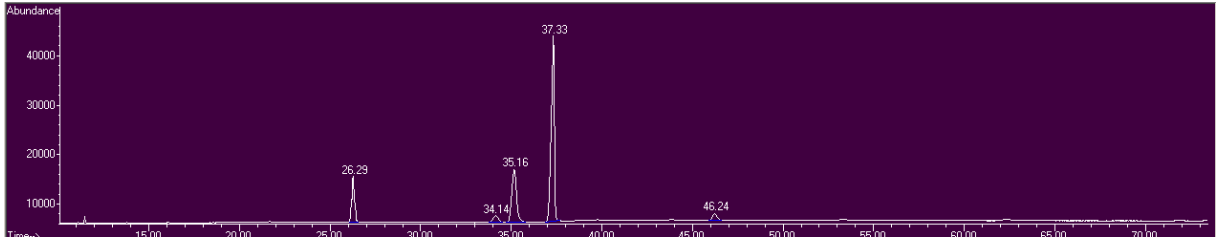
Piyasadan elde edilmiş 10 farklı markaya ait çörek otu yağı kapsüllerinin metilasyon işlemi yapılmış ve GK-KS kullanılarak yağ asidi profilleri çıkarılmıştır. Marka isimleri ÇK (Çörek otu yağı kapsülü) olarak kısaltılmıştır. Yağ asidi yüzde miktarlarını ve profilini içeren çizelge EK-2’de verilmiştir.



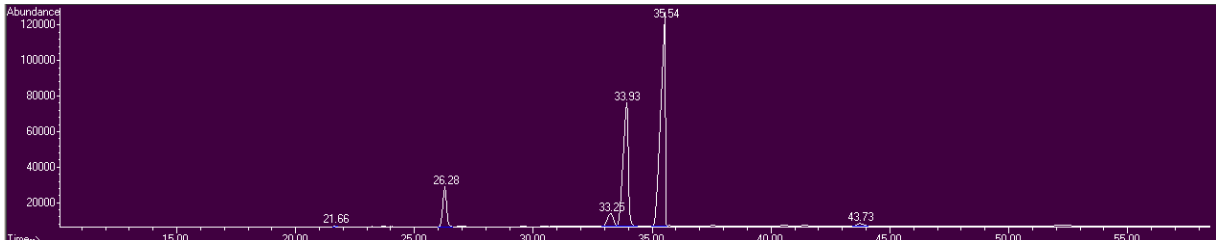
Şekil 5.66. ÇK1 kodlu metillenmiş çörek otu yağı kapsülüne ait GK-KS kromatogramı



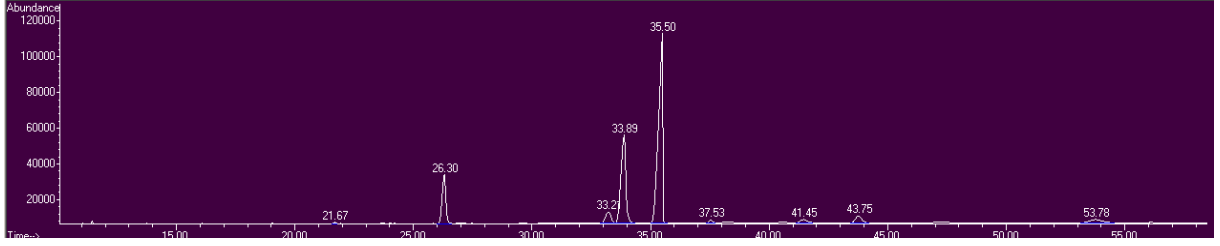
Şekil 5.67. ÇK2 kodlu metillenmiş çörek otu yağı kapsülüne ait GK-KS kromatogramı



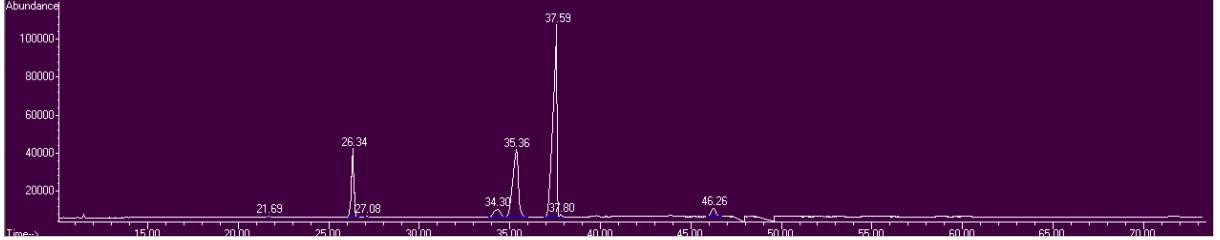
Şekil 5.68. ÇK3 kodlu metillenmiş çörek otu yağı kapsülüne ait GK-KS kromatogramı



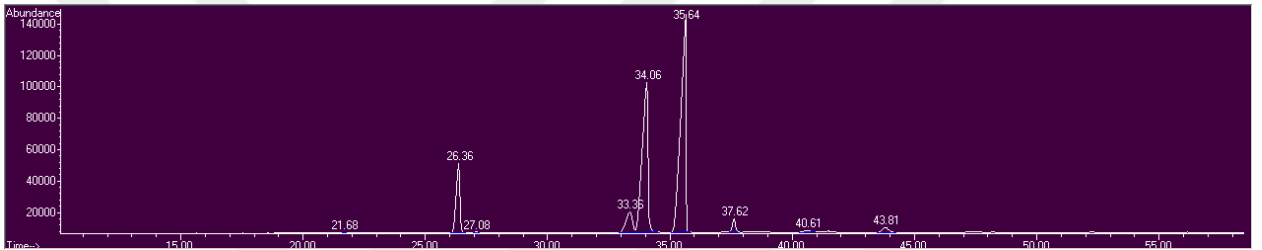
Şekil 5.69. ÇK4 kodlu metillenmiş çörek otu yağı kapsülüne ait GK-KS kromatogramı



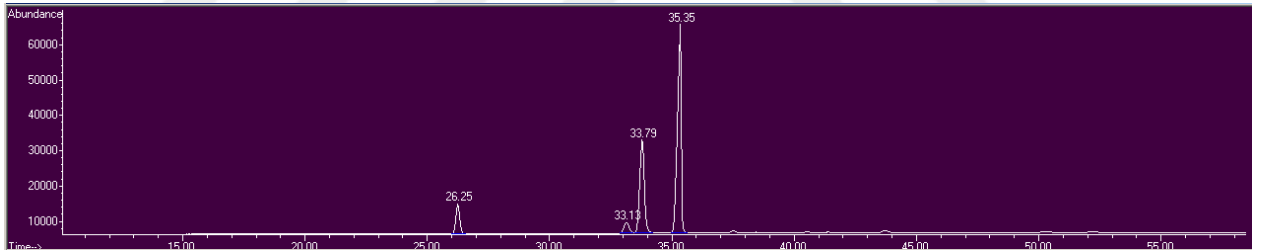
Şekil 5.70. ÇK5 kodlu metillenmiş çörek otu yağı kapsülüne ait GK-KS kromatogramı



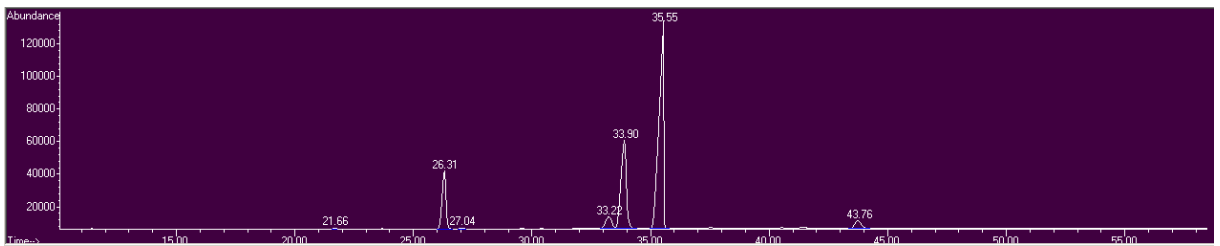
Şekil 5.71. ÇK6 kodlu metillenmiş çörek otu yağı kapsülüne ait GK-KS kromatogramı



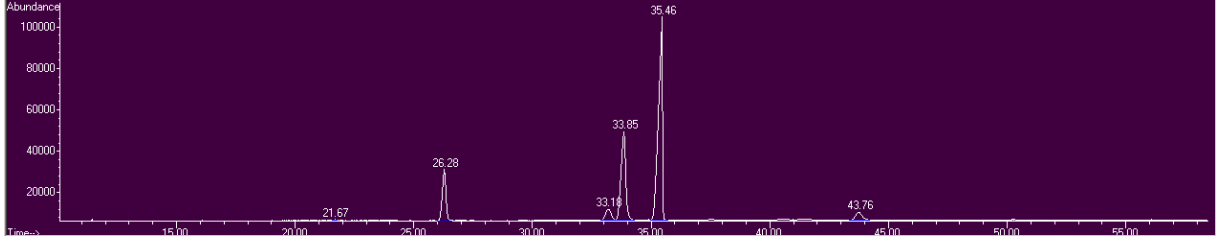
Şekil 5.72. ÇK7 kodlu metillenmiş çörek otu yağı kapsülüne ait GK-KS kromatogramı



Şekil 5.73. ÇK8 kodlu metillenmiş çörek otu yağı kapsülüne ait GK-KS kromatogramı



Şekil 5.74. ÇK9 kodlu metillenmiş çörek otu yağı kapsülüne ait GK-KS kromatogramı



Şekil 5.75. ÇK10 kodlu metillenmiş çörek otu yağı kapsülüne ait GK-KS kromatogramı



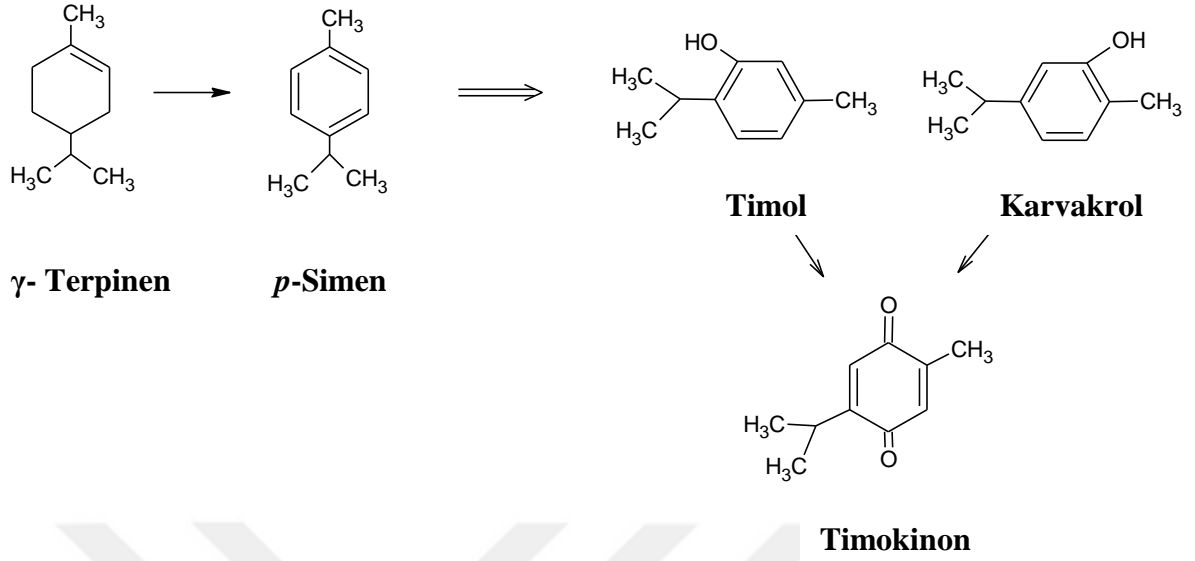
6. TARTIŞMA ve SONUÇ

6.1. ÖN UYGULAMA ÇALIŞMALARI

Yapılan tez çalışmasında, çörek otu tohumlarına %4 Mannitol, %6 Mannitol, %10 Poli Etilen Glikol (PEG), % 20 PEG, 18 saat saf su ile 20 saat saf su ortamları kullanılarak ön uygulama işlemi yapılmıştır. Ön uygulama işlemi sırasında en uygun ortamın hangisi olduğunun anlaşılması amacı ile denenen ortamlardaki çimlenme hızı, çimlenme gücü, sapçık ve kökçük uzunluğu, sapçık ve kökçük yaş ağırlıkları ile sapçık ve kökçük kuru ağırlıkları ortamlar arasında karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmeler sonucunda en uygun ortamın %4 Mannitol olduğu saptanarak, bu ortamda priming yapılmış olan tohumlar ile ön uygulamanın timokinon miktarı üzerine etkisinin anlaşılabilmesi için hiçbir uygulama yapılmamış kontrol tohumları, sera ve tarla ortamlarında yetiştirilmiştir. Yetiştirilen tohumların ekstraksiyonu yapılarak, tohumların içerisindeki timokinon miktarı, belirtilen yöntem dahilinde kantitatif olarak yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile tayin edilmiştir. Yapılan çalışma ile çörek otu tohumlarına %4 Mannitol ile ön uygulama yapılarak etkin maddesi olan timokinon miktarının arttırıldığı gözlenmiştir.

Daha önce *Nigella sativa* tohumlarına ön uygulama işlemi yapılan bir çalışma olup olmadığını araştırmak için literatür taraması yapılmış, fakat Seyyedi ve ark'nın (2015) fosfor ile uygulanan primingin *N. sativa* tohumları üzerine etkisinin araştırıldığı çalışma dışında, herhangi bir priming çalışmasına rastlanmamıştır. Bu sonuçlara göre çalışmamız literatürde ilk olma niteliğini taşımaktadır.

%4 Mannitol ile yapılan priming işleminin çörek otu tohumlarındaki timokinon miktarını arttırma mekanizması; Mannitol ve Poli Etilen Glikol gibi ozmolitlerin, hücrede ozmotik stres yaratarak hücreyi büzmesi ve hücrenin su kaybetmesine neden olması ile açıklanabilir. Çünkü yaratılan bu ozmotik stres sonucunda hücre kendisini tehlike altında hissederek etkili bileşimini arttırma yoluna gitmektedir. Yapılan çalışma ile %4 Mannitol'un timokinon miktarını arttırma mekanizması, hücrede yarattığı ozmotik stresle bağdaştırılabilir. Şekil 6.1.'de timokinon biyosentezinin olası yolağı verilmiştir (112).



Şekil 6. 1. Timokinon biyosentezinin olası yolağına ait görünüm

Bu çalışma ile %4 Mannitol ile çalışmada belirtilen süre ve koşullarda yapılan priming işleminin, *N. sativa* tohumlarındaki timokinonu arttırdığı kanıtlanmış ve ilaç sanayisi için oldukça önemli bir olgu olan standardize bitkisel hammadde üretimine, hatırı sayılır bir katkı sağlanmıştır. Bu katkının ilaç sanayisine etkisi açısından, çalışmamız biyoteknolojik olarak da oldukça büyük bir öneme sahiptir.

6.2. DOKU KÜLTÜRÜ İLE ÇÖREK OTU TOHURLARINDAN KALLUS ELDESİ

Doku kültürü çalışmaları için %4 Mannitol ile ön uygulama yapılmış çörek otu tohumları kullanılmıştır. Bu tohumlardan, TDZ (0,25 mg/L, 0,5 mg/L ve 0,75 mg/L), 0,05 mg/L BAP + NAA (0,25 mg/L, 0,5 mg/L, 0,75 mg/L ve 1 mg/L), Kinetin (0,5 mg/L, 0,75 mg/L ve 1 mg/L) ve 1 mg/L 2,4-D + Kinetin (0,05 mg/L, 0,5 mg/L, 1 mg/L, 1,5 mg/L ve 2 mg/L) hormonlarını içeren MS besi ortamları kullanılarak in vitro fideler izole edilmiş ve kotiledon, kotiledon boğumu ve hipokotil eksplantları üzerinde bu hormonların etkisi araştırılmıştır.

Farklı dozlardaki TDZ'nin kallus oluşumu üzerine etkisinin araştırılması amacı ile yapılan çalışmada kallus oluşum oranı ortalaması yönünden kotiledon boğumundan ve kotiledon yapraklarından alınan eksplantlarda en yüksek kallus oluşum oranı 0,25 mg/L TDZ ile kültüre alınmış eksplantlarda saptanmıştır.

Sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu açısından karşılaştırıldığında; bitkinin kotiledon boğumundan ve kotiledon yapraklarından alınan eksplantlarda en yüksek sürgün sayısı 0,25 mg/L TDZ içeren MS besi ortamında kültüre alınmış eksplantlardan olduğu gözlenmiştir.

Farklı dozlardaki Kinetin'in, eksplantlardan elde edilen kallus oluşumu üzerine yapılan çalışmada kallus oluşum oranı ortalaması yönünden kotiledon boğumundan alınan eksplantlarda en yüksek kallus oluşum oranı 0,5 mg/L Kinetin içeren MS besi ortamında, hipokotilden alınan eksplantlarında ise en yüksek kallus oluşum oranı 1 mg/ L Kinetin içeren MS besi ortamında ile kültüre alınmış eksplantlarda saptanmıştır.

Sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu ortalamaları yönünden de kotiledon boğumundan ve hipokotilden alınan eksplantlarda en yüksek sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu yine 0,5 mg/L Kinetin içeren MS besi ortamında ile kültüre alınmış eksplantlarda gözlenmiştir.

Farklı dozlardaki NAA ve BAP karışımının kullanıldığı ortamlarının kallus üretimine etkisi açısından yapılan çalışmalar sonucunda; kotiledon boğumu ve hipokotilden elde edilen eksplantlarda en fazla kallus oranı, en yüksek sürgün sayısı ve en yüksek sürgün uzunlukları; 0,05 mg/L BAP + 0,25 mg/L NAA kullanılan MS besi ortamlarıyla kültüre alınmış eksplantlarda görünmüştür.

Farklı dozlardaki Kinetin'in 2.4 D ile karıştırılarak oluşturulan ortamları ile yapılan denemelerin sonucunda en fazla kallus 1 mg/L 2.4.D + 0,05 mg/L KN içeren MS besi ortamında görülmüştür. Deneme amacı ile sadece 1mg/L 2.4.D 'in kullanıldığı MS besi ortamları da hazırlanmış ve bu ortamlarda en düşük kallus oranı saptanmıştır.

Nigella sativa tohumlarının ve kalluslarının alkollü ekstraktlarının değişen timokinon içeriklerine bağlı olarak karışık glial hücreleri üzerindeki antiinflamatuvar etkisinin araştırıldığı çalışmanın bir kısmında; bitkinin yapracık, sap, yaprak sapı ve kökten alınan

eksplantlarının 2,4 D (1 mg/L)+ Kinetin (2,15 mg/L) içeren MS besi ortamında kallusları üretilmiş ve üretilen kalluslar 2,4 D (0,22 mg/L) + Kinetin (2,15 mg/L) ortamında çoğaltılmıştır. Çoğaltılan kalluslar etanolle ekstre edilmiş ve YBSK kullanarak miktarına bakılmıştır. Analizler sonucunda en yüksek timokinon miktarı 8,78 mg/ml ile yaprak kalluslarında bulunmuştur. Kalluslar eskidikçe timokinon miktarının azaldığı gözlenmiş ve bu azalmanın sebebinin zaman geçtikçe kallusların içerisindeki fenolik bileşiklerin miktarının ve antioksidan özelliğinin artması olabileceği düşünülmüştür (113).

Çörek otu tohumlarına uygulanan priming işlemleri ile ilgili makaleler incelendiğinde bitkinin hipkotilinden, kotiledon boğumundan ve kotiledonundan eksplantlar alınarak çalışmamızda kullanılan ortamların konsantrasyonları dahilinde timokinon miktarının ölçülmesi ile ilgili herhangi bir çalışma yapılmadığı gözlenmiştir. Ayrıca doku kültürü işlemi için kullanılan tohumların %4 Mannitol ile priming yapılmış tohumlar olması da, doku kültürü çalışmamıza literatürde bir ilk olma özelliği vermektedir.

Tohumlar üzerinde yapılan doku kültürü çalışmaları sonunda elde edilen kallusların ekstraksiyonu yapılmış ve içerdiği timokinon miktarı YBSK'da analiz edilmiştir. Analiz sonucunda kalluslarda tespit edilebilecek seviyede timokinon miktarı gözlenmemiştir. İleri dönemlerde yapılacak olan çalışmalarda kalluslar üzerinde uyguladığımız ekstraksiyon yönteminin geliştirilmesi ve kallus üretimi için daha farklı ortamların denenmesi öngörülmektedir.

6.3. PİYASADAN TEMİN EDİLEN ÇÖREK OTU TOHUMU, TOHUM YAĞI VE TOHUM YAĞI KAPSÜLLERİ İÇERİSİNDEKİ TİMOKİNON MİKTARININ ARAŞTIRILMASI

Bir yağın çörek otu yağı olup olmadığının anlaşılması için gereken en önemli marker timokinon içeriğidir. Timokinonun varlığı, o yağın çörek otu yağı olduğu ile ilgili kuvvetli delil sayılabilecek bir parametredir.

Piyasada ticari olarak satılan çeşitli çörek otu preparatlarının timokinon içeriklerinin profilini çıkarmak amacı ile çeşitli markalara sahip çörek otu tohumları, çörek otu tohum yağları ve çörek otu yağ kapsüllerine belirtilen ekstraksiyon yöntemleri uygulanmış ve içerdikleri timokinon miktarları YBSK kullanılarak analiz edilmiştir. Çörek otu tohumları

ÇT olarak, çörek otu yağları ÇY olarak ve çörek otu yağ kapsülleri de ÇK olarak kodlanmıştır. Her biri farklı markalara sahiptir. Analiz sonucunda elde edilen veriler doğrultusunda tohumlarda en yüksek timokinon miktarına sahip ürün ÇT1 koduna (% 0,38) , en düşük miktara sahip ürün ise ÇT4 koduna (% 0,01) sahiptir. Çörek otu yağlarında yapılan analizin neticesinde ÇY5 kodlu ürünün (% 0,62) en yüksek timokinon oranına, ÇY4 kodlu ürünün ise en düşük timokinon oranına (% 0,005) sahip olduğu gözlenmiştir. Yağ kapsüllerine ait olan numunelerde ise; ÇK3'te en yüksek (% 2,02), ÇK4'te ise en düşük oranlarda timokinon (% 0,04) tespit edilmiştir.

Daha önce yapılmış çalışmalara bakıldığında; Omar ve arkadaşlarının (1992)'de yaptıkları çalışma sonucunda çörek otu yağında timokinon oranı % 0,052 olarak belirtilmiştir. El-Alfy ve arkadaşları (1975)'de Gaz kromatografisini kullanarak yaptıkları araştırmada, tohum yağında timokinon oranının % 0,13-0,17 olduğunu belirlemişlerdir.

Çörek otu tohum yağında timokinon oranını belirlemek amacı ile yapılan bir diğer çalışmada, Aboul-Enein ve arkadaşları (1995), timokinon oranını 0,008 ve 0,01 aralığında göstermişlerdir. Tauseef Sultan ve arkadaşlarının (2009) da yaptığı çalışmada ise timokinon miktarını tohum yağında 201,31mg/kg-yağ olarak bulunmuştur.

Houghton ve arkadaşları (1995) bir çalışmada, tohum yağında buldukları timokinon oranının % 0,2 kütle/hacim olduğunu belirtmişlerdir.

Lutterodt ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada 6 soğuk press yapılmış çörek otu yağında elde edilen timokinon oranları 3,48 ile 8,73 mg/g yağda değişmektedir. Yehualashet ve Ermias (2014) HPTLC ile çörek otu tohumlarının yağında ve tohumlarında timokinon miktarını karşılaştırmak amacıyla yaptıkları çalışmada; tohumda %1,0 ve yağda ise % 1,3 miktarlarında timokinon elde etmişlerdir.

Crina Toma ve arkadaşlarının (2010) da yaptıkları bir çalışmada GK/KS ile çörek otu bileşiklerinin tayininde, çörek otu yağında timokinon miktarını %1,65 olarak belirlemişlerdir.

Çörek otu yağındaki timokinon miktarı açısından yukarıdaki çalışmaların genel yorumu olarak, çörek otu tohum yağında yaklaşık % 0,008 ile %2 arasında timokinon bulunduğu sonucu çıkartılabilir. Yaptığımız çalışma neticesinde bizim bulduğumuz timokinon

değerleri de %0,04 ile % 2 arasında değişkenlik göstermektedir ki bu değerler yapılan diğer çalışmalar ile uyum içerisindedir.

Çörek otu yağının içerisindeki timokinon miktarı; tohumdan yağın elde edilme yöntemine bağlı olarak etkilenebilmektedir. Aktarlarda genellikle kullanılan ve Şekil 6.2’de görünümü verilen soğuk pres makinelerinin çok ısınması durumunda, üretilen yağ yüksek ısıya maruz kalarak yanmakta ve timokinon miktarında azalmaya sebep olmakla birlikte yağın kimyasal içeriğini de değiştirmektedir.



Şekil 6. 2. Çörek otu tohumundan yağ elde etmek için kullanılan soğuk pres makinesinin genel görünümü (A) ve makinenin dikkat edilmediğinde fazla ısınıp, yağın yüksek ısıya maruz kalarak yanmasına sebep olan parçasının (B) görünümü (Fotoğraf Prof. Dr. Maksut Coşkun tarafından çekilmiş olup izinleri alınarak kullanılmıştır)

Çörek otu tohumlarında olması gereken timokinon miktarı ile ilgili literatür taraması yapılmış fakat çörek otu tohumunda bulunan timokinon miktarının rapor edildiği bir adet yayın dışında başka hiçbir çalışmaya rastlanmamıştır. Yehualashet ve Ermias’in 2014 yılında yaptıkları çalışmalarında; HPTLC ile çörek otu tohumlarının yağında ve tohumlarında bulunan timokinon miktarını karşılaştırmışlar ve tohumda %1,0 oranında timokinon bulduklarını rapor etmişlerdir. Timokinon miktarı ile ilgili olan çalışmalarda genellikle çörek otu tohum yağındaki timokinon miktarı üzerine yoğunlaşıldığı görülmektedir. Farklı orijinli çörek otu tohumları içerisindeki timokinon miktarının YBSK kullanılarak kantitatif olarak belirlenmesi ve çörek otu tohumlarında olması gereken timokinon miktarına yol gösterici olması açısından da çalışmamız literatürde bir ilk olma özelliği taşımaktadır. Yaptığımız çalışma sonucunda çörek otu tohumlarında bulduğumuz timokinon miktarları %0,01 ile % 0,4 arasında değişiklik göstermektedir. Dolayısı ile

standardize çörek otu tohumundan bahsedebilmek için tohumun içerisindeki timokinon miktarının bu aralıklar dahilinde olması beklenmektedir.

Bu verilerin değerlendirilmesi sonucunda ön uygulama işleminin hammadde standardizasyonu açısından önemi bir kez daha ortaya çıkmıştır. Çörek otu tohumlarına %4 Mannitol ile priming yapıldığında tohumlarda ve yağda timokinon miktarının arttığı tarafımızca kanıtlanmış olduğundan dolayı, tohum ekiminden önce % 4 Mannitol ile ön uygulama yapılması tavsiye edilmektedir.

6.4. PİYASADAN TEMİN EDİLEN ÇÖREK OTU TOHUM YAĞI VE TOHUM YAĞI KAPSÜLLERİNİN YAĞ ASİDİ PROFİLLERİNİN ÇIKARILMASI

Bu çalışma için piyasadan çeşitli markalara sahip ticari olarak satışı gerçekleşen çörek otu yağlarının ve çörek otu yağı kapsüllerinin yağ asidi metil esterleri oluşturulmuş ve GK/KS ile yağ asidi profilleri çıkartılmıştır. Çörek otu yağları ÇY, çörek otu yağı kapsülleri ise ÇK olarak kodlanmıştır.

Kaskoos (2011); çörek otu yağındaki majör yağ asitlerinin linoleik asit (%42,76), oleik asit (%16,59) ve palmitik asit (%8,51) olduğunu bildirmiştir.

Lutterodt ve arkadaşlarının (2010) yaptığı bir çalışmada çörek otu tohum yağının yağ asidi profili çıkartılmış ve majör yağ asitlerinin linoleik asit (%58,8-61,2), oleik asit (%22,6-24,5) ve palmitik asit (%13-13,3) olduğu rapor edilmiştir.

Babayan ve ark. (1978) yaptığı çalışmada çörek otu yağının majör yağ asitlerinin linoleik asit (%56), oleik asit (%24,6) ve palmitik asit (%12) olduğu rapor edilmiştir.

Ramadan ve Mörsel (2002) de yaptıkları çalışmanın sonucunda, diğer çalışmalarda olduğu gibi majör yağ asitlerini linoleik asit (%57,3), oleik asit (%24,1) ve palmitik asit (%13) olarak bulmuşlardır.

Tulukcu'nun (2011) ; 8 farklı bölgeden temin ettiği çörek otu tohumu yağlarının yağ asidi profilini çıkarması üzerine yaptığı çalışmasının sonucunda çörek otu tohumunun majör yağ asitlerinin linoleik asit (%54-70), oleik asit (%15-24) ve palmitik asit (%8,2-13,3) olduğunu bildirmiştir.

Atta'nın 2003 yılında yaptığı çalışma sonucu incelendiğinde; çörek otu tohumunun majör yağ asitlerinin linoleik asit (%47,5-49), oleik asit (%18,9-20,1) ve palmitik asit (%9,9-12,1) olduğu görülmektedir.

Yaptığımız çalışma neticesinde ortaya çıkan yağ asidi profiline bakıldığı zaman, analizini yaptığımız çörek otu tohumu yağlarının da majör yağ asitlerinin linoleik asit (%36-56), oleik asit (%25-46) ve palmitik asit (%7-13) olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar, daha önce yapılmış çalışmaların neticeleri ile uyum içerisindedir.

Çörek otu tohum yağının yağ asidi profili ile ilgili yaptığımız çalışma sonuçları ile literatür araştırması sonucunda elde edilen yayınlara ait sonuçlar derlendiğinde, yaklaşık olarak Çizelge 6.1.'de belirtilen tablo ortaya çıkmaktadır. Standardize bir çörek otu tohumu yağının yağ asidi profilinin bu aralıklar dahilinde olması beklenir.

Çizelge 6. 1. Daha önce yapılan çalışmalar derlenerek oluşturulan çörek otu tohum yağına ait yağ asidi miktarlarının tahmini aralıklarını içeren yağ asidi profili

Yağ Asidi Profili	% Değer
Miristik Asit (C14:0)	% 0,2'ye kadar
Palmitik Asit (C16:0)	% 7-13
Palmitoleik Asit (C16:1)	% 0,2'ye kadar
Stearik Asit (C18:0)	%2-4
Oleik Asit (C18:1)	%20-30
Linoleik Asit (C18:2)	%42-60
Linolenik Asit (C18:3)	%1'e kadar
Araşidik Asit (C20:0)	%0,5'e kadar
Eikosenoik Asit (C20:1)	%1,2'ye kadar
Eikosadienoik Asit (C20:2)	%3'e kadar
Erusik Asit (C22:1)	%2-3
Dokosadienoik Asit (C22:2)	%1'e kadar

ÇY6 ve ÇY10 kodlu numunelere ait yağ asidi profili, görüldüğü üzere EK-1’de yer almamaktadır. Yağ asidi profilini çıkarmak üzere yapılan metil esterifikasyon işlemi sonucunda bütün yağların metilasyonu başarı ile gerçekleştirilirken sadece ÇY6 ve ÇY10 kodlu numunelerin metilasyonu defalarca denenmesine rağmen gerçekleştirilememiştir.



KAYNAKLAR

1. Kartal M. *Avrupa Birliği Ülkelerinde Tıbbi Bitkisel Ürünlerin Ruhsatlandırılması.*; 2004.
2. Salem M, Hossain MS. Protective effect of black seed oil from *Nigella sativa* against murine cytomegalovirus infection. *Int J Immunopharmacol.* 2000. doi:10.1016/S0192-0561(00)00036-9
3. Özel, A., Demirel, U., Güler, İ., Erden K. Farklı Sıra Aralığı ve Tohumluk Miktarlarının Çörek Otunda (*Nigella sativa* L.) Verim ve Bazı Tarımsal Karakterlere Etkisi. *Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Derg.* 2009;13(1):17-25.
4. Ceylan A. Tıbbi Bitkiler II (Uçucu Yağ İçerenler), Ege Ü. *Ziraat Fak Yayınları.* 1987;(481).
5. Baytop.T. Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi (geçmişte ve bugün). *İstanbul Üniversitesi Yayınları.* 1984. doi:10.1021/jf803915v
6. Baytop T. *Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi.* 2nd ed. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 1999.
7. Atta-ur-Rahman, S. M, S. A, I. C, Hman HUR. Nigellimine n oxide a new isoquinoline alkaloid from the seeds of *nigella sativa*. *Heterocycles (Tokyo).* 1985;23(4):953-956.
<https://eurekamag.com/research/005/984/005984164.php#.WhXYAIK6Mtc.mendel ey>. Accessed November 22, 2017.
8. Grondel JL, Nouws JFM, van Muiswinkel WB. The influence of antibiotics on the immune system; immuno-pharmacokinetic response in carp (*Cyprinus carpio* L) after oxytetracycline injection. *J Fish Dis.* 1987;10:35-43.
9. Randhawa, M.A. and Al-Ghamdi MS. A review of the pharmaco-therapeutic effects of *Nigella sativa*. *Pakistan J Med Res.* 2002;41(2).
10. Salem M. Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. seed. *Int Immunopharmacol.* 2005. doi:10.1016/j.intimp.2005.06.008
11. Zaoui A, Cherrah Y, Lacaille-Dubois MA, Settaf A, Amarouch H, Hassar M. Diuretic and hypotensive effects of *Nigella sativa* in the spontaneously hypertensive rat. *Therapie.* 2000.
12. Türker L BA. Çörek otu (*Nigella sativa* L)’nun sabit ve uçucu yağ kompozisyonunun araştırılması. *Standard.* 1967;430:128-137.
13. Ilisulu K. *İlaç ve Baharat Bitkileri.* Ankara: Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Baskı Ofset Ünitesi; 1992.

14. Demirhan A. Mısır Çarşısı Drogları. 1974.
15. Zeybek N. *Farmasotik Botanik*. 1st ed. İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi; 1985.
16. Worthen DR, Ghosheh OA, Crooks PA. The in vitro anti-tumor activity of some crude and purified components of blackseed, *Nigella sativa* L. *Anticancer Res*. 1998.
17. Morsi NM. Antimicrobial effect of crude extracts of *Nigella sativa* on multiple antibiotics-resistant bacteria. *Acta Microbiol Pol*. 2000.
18. Burits M, Bucar F. Antioxidant activity of *Nigella Sativa* essential oil. *Phytother Res*. 2000. doi:10.1002/1099-1573(200008)14:5<323::AID-PTR621>3.0.CO;2-Q [pii]
19. Nergiz C, Ötles S. Chemical composition of *Nigella sativa* L. seeds. *Food Chem*. 1993. doi:10.1016/0308-8146(93)90137-5
20. Akgül A. *Baharat Bilimi ve Teknolojisi*. No:15. (Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, ed.). Ankara: Damla Matbaacılık; 1993.
21. Zohary D, Hopf M. Domestication of Plants in the Old World. *third ed Univ Press Oxford*. 2000. doi:10.1517/17425247.2013.856877.Intranasal
22. Takruri HRH, Dameh M a F. Study of the nutritional value of black cumin seeds (*Nigella sativa* L). *J Sci Food Agric*. 1998. doi:10.1002/(SICI)1097-0010(199803)76:3<404::AID-JSFA964>3.0.CO;2-L
23. Kantar, F., Elkoca E. Kültür bitkilerinde tuza dayanıklılık. *Atatürk Üniv Ziraat Fak Derg*. 1998;29 (1):163-174.
24. Turk, M.A., Rahman, A., Tawaha, M., Lee KD. Seed germination and seedling growth of three lentil cultivars under moisture stress. *Asian J Plant Sci*. 2004;3(3):394-397.
25. Ali A, Machado VS, Hamill AS. Osmoconditioning of tomato and onion seeds. *Sci Hortic (Amsterdam)*. 1990. doi:10.1016/0304-4238(90)90093-T
26. Heydecker W, Gibbins BM. The 'priming' of seeds.[Conference paper]. *Acta Hortic (Netherlands) no 83*. 1978.
27. Demir I, Oztokat C. Effect of salt priming on germination and seedling growth at low temperatures in watermelon seeds during development. *Seed Sci Technol*. 2003;31(3):765-770.
28. Sağsöz S. *Tohumluk Bilimi*. Yayın No:3. Erzurum: Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları; 2000.
29. Heydecker W. *Germination of an Idea: The Priming of Seeds.*; 1973.
30. Al-Karaki GN. Response of wheat and barley during germination to seed osmopriming at different water potential. *J Agron Crop Sci*. 1998. doi:10.1111/j.1439-037X.1998.tb00422.x

31. Elkoca, E., Haliloğlu, K., Eşitken A and E. Hydro and osmopriming improve chickpea germination. *Acta Agric Scand Sect B Soil Plant Sci.* 2006;57:193-200.
32. Pereira MD, Dias DCF dos S, Dias LA dos S, Araújo EF. Primed carrot seeds performance under water and temperature stress. *Sci Agric.* 2009;66(2):174-179.
33. Pill WG, Frett JJ, Morneau DC. Germination and seedling emergence of primed tomato and asparagus seeds under adverse conditions. *HortScience.* 1991.
34. Sivritepe N, Sivritepe HÖ, Türkan I, Bor M, Özdemir F. NaCl pre-treatments mediate salt adaptation in melon plants through antioxidative system. *Seed Sci Technol.* 2008;36(2):360-370.
35. Korkmaz A. Ameliorative effects of ethylene precursor and polyamines on the high temperature inhibition of seed germination in lettuce (*Lactuca sativa* L.) before and after seed storage. *Seed Sci Technol.* 2006. doi:10.15258/sst.2006.34.2.21
36. Kartal M., Orhan I. Fitoterapiye Güncel Bakış. *Antiaging ve Estetik Tıp Dergisi.* <http://www.antiaging.org.tr/eski2/pg006.html>.
37. Sekeroglu N, Caliskan UK. Türkiye’de Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Konusundaki Çalışmalar ve Yasal Düzenlemeler. *Türkiye Tohumcular Birliği.* 15:34-39. <http://www.turktob.org.tr/dergi/makaleler/dergi15/34-39.pdf>.
38. Tanker N, Koyuncu M, Coskun M. *Farmasötik Botanik Ders Kitabı, Ankara Üniv. Ecz Fak Yayınları.* 2007;324.
39. Atta MB. Some characteristics of nigella (*Nigella sativa* L.) seed cultivated in Egypt and its lipid profile. *Food Chem.* 2003. doi:10.1016/S0308-8146(03)00038-4
40. Ramadan MF, Mörsel JT. Analysis of glycolipids from black cumin (*Nigella sativa* L.), coriander (*Coriandrum sativum* L.) and niger (*Guizotia abyssinica* Cass.) oilseeds. *Food Chem.* 2003. doi:10.1016/S0308-8146(02)00254-6
41. Şahin, A., Yener, Z., Dagoğlu, G., Dede, S. , OTO, G., Alkan M. No TitleKarbontetraklorid (CCl4) ile Deneysel Olarak Karaciğer Nekrozu Oluşturulan Ratlarda Vitamin E + Selenyum ve *Nigella sativa* (çörekotu)’nın Karaciğer Yıkımını Engelleyici Etkileri. *Turk J Vet Anim Sci .* 2003;27:141-152.
42. Ghosheh OA, Houdi AA, Crooks PA. High performance liquid chromatographic analysis of the pharmacologically active quinones and related compounds in the oil of the black seed (*Nigella sativa* L.). *J Pharm Biomed Anal.* 1999;19(5):757-762.
43. Al-Ghamdi MS. The anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activity of *Nigella sativa*. *J Ethnopharmacol.* 2001;76(1):45-48.
44. Hosseinzadeh H, Parvardeh S. Anticonvulsant effects of thymoquinone, the major constituent of *Nigella sativa* seeds, in mice. *Phytomedicine.* 2004;11(1):56-64.
45. Ali BH, Blunden G. Pharmacological and toxicological properties of *Nigella sativa*. *Phyther Res.* 2003. doi:10.1002/ptr.1309

46. Haq A, Lobo PI, Al-Tufail M, Rama NR, Al-Sedairy ST. Immunomodulatory effect of *Nigella sativa* proteins fractionated by ion exchange chromatography. *Int J Immunopharmacol*. 1999;21(4):283-295.
47. BABAYAN VK, KOOTTUNGAL D, HALABY GA. PROXIMATE ANALYSIS, FATTY ACID AND AMINO ACID COMPOSITION OF NIGELLA SATIVA L. SEEDS. *J Food Sci*. 1978. doi:10.1111/j.1365-2621.1978.tb15297.x
48. Morikawa T, Xu F, Ninomiya K, Matsuda H, Yoshikawa M. Nigellamines A3, A4, A5, and C, new dolabellane-type diterpene alkaloids, with lipid metabolism-promoting activities from the Egyptian medicinal food black cumin. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2004. doi:10.1248/cpb.52.494
49. Al-Hader, A., Aqel, M., Hasan Z. Hypoglycemic Effects of the Volatile Oil of *Nigella sativa* Seeds. *Int J Pharmacogn* . 2008;31(2):96-100.
50. Hosseinzadeh H, Parvardeh S, Asl MN, Sadeghnia HR, Ziaee T. Effect of thymoquinone and *Nigella sativa* seeds oil on lipid peroxidation level during global cerebral ischemia-reperfusion injury in rat hippocampus. *Phytomedicine*. 2007;14(9):621-627.
51. Bin Sayeed MS, Shams T, Fahim Hossain S, et al. *Nigella sativa* L. seeds modulate mood, anxiety and cognition in healthy adolescent males. *J Ethnopharmacol*. 2014. doi:10.1016/j.jep.2013.12.050
52. Raj Kapoor B, Anandan R, Jayakar B. Anti-ulcer effect of *Nigella sativa* Linn. Against gastric ulcers in rats. *Curr Sci*. 2002. doi:10.2307/24106109
53. Boskabady MH, Mohsenpoor N, Takaloo L. Antiasthmatic effect of *Nigella sativa* in airways of asthmatic patients. *Phytomedicine*. 2010. doi:10.1016/j.phymed.2010.01.002
54. Majdalawieh AF, Hmaidan R, Carr RI. *Nigella sativa* modulates splenocyte proliferation, Th1/Th2 cytokine profile, macrophage function and NK anti-tumor activity. *J Ethnopharmacol*. 2010. doi:10.1016/j.jep.2010.06.030
55. Shafi, G., Munshi, A., Hasan, T.N., Alshatwi, A.A., Jyothy, A., David K. Anti cancer activity of *Nigella sativa*. *Cancer Cell Int* . 2009;9(29).
56. Bukhari MH, Khalil J, Qamar S, et al. Comparative gastroprotective effects of natural honey, *Nigella sativa* and cimetidine against acetylsalicylic acid induced gastric ulcer in albino rats. *J Coll Physicians Surg Pakistan*. 2011. doi:03.2011/JCPSP.151156
57. Salim EI. Cancer chemopreventive potential of volatile oil from black cumin seeds, *Nigella sativa* L., in a rat multi-organ carcinogenesis bioassay. *Oncol Lett*. 2010. doi:10.3892/ol_00000162
58. Kolahdooz M, Nasri S, Modarres SZ, Kianbakht S, Huseini HF. Effects of *Nigella sativa* L. seed oil on abnormal semen quality in infertile men: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Phytomedicine*. 2014;21(6):901-905.

59. Sultan MT, Butt MS, Anjum FM, Jamil A. Influence of black cumin fixed and essential oil supplementation on markers of myocardial necrosis in normal and diabetic rats. *Pak J Nutr.* 2009;8:1450-1455.
60. Hosseini M, Mohammadpour T, Karami R, Rajaei Z, Sadeghnia HR, Soukhtanloo M. Effects of the hydro-alcoholic extract of *Nigella Sativa* on scopolamine-induced spatial memory impairment in rats and its possible mechanism. *Chin J Integr Med.* 2015;21(6):438-444.
61. Hosseinzadeh H, Tafaghodi M, Mosavi MJ, Taghiabadi E. Effect of Aqueous and Ethanolic Extracts of *Nigella sativa* Seeds on Milk Production in Rats. *JAMS J Acupunct Meridian Stud.* 2013. doi:10.1016/j.jams.2012.07.019
62. Hosseinzadeh H, Bazzaz BSF, Haghi MM. Antibacterial activity of total extracts and essential oil of *Nigella Sativa* L. seeds in mice. *Pharmacolgyonline.* 2007.
63. Bakathir HA, Abbas NA. Detection of the antibacterial effect of *Nigella sativa* ground seeds with water. *Afr J Tradit Complement Altern Med.* 2011. doi:10.4314/ajtcam.v8i2.63203
64. Hanafy MSM, Hatem ME. Studies on the antimicrobial activity of *Nigella sativa* seed (black cumin). *J Ethnopharmacol.* 1991;34(2-3):275-278.
65. Evirgen O, Gökçe A, Ozturk OH, Nacar E, Onlen Y, Ozer B. Effect of Thymoquinone on Oxidative Stress in *Escherichia coli*-Induced Pyelonephritis in Rats. *Curr Ther Res.* 2011;72(5):204-215.
66. Meziti A, Meziti H, Boudiaf K, Mustapha B, Bouriche. H. Polyphenolic profile and antioxidant activities of *Nigella sativa* seed extracts in vitro and in vivo. *World Acad Sci.* 2012.
67. Harzallah H, Grayaa R, Kharoubi W, Maaloul A, Hammami M, Mahjoub T. Thymoquinone, the *Nigella sativa* bioactive compound, prevents circulatory oxidative stress caused by 1, 2-dimethylhydrazine in erythrocyte during colon postinitiation carcinogenesis. *Oxid Med Cell Longev.* 2012;2012.
68. Nagi MN, Mansour M a. Protective effect of thymoquinone against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats: a possible mechanism of protection. *Pharmacol Res.* 2000. doi:10.1006/phrs.1999.0585
69. Abdel Wahab WM. Protective effect of thymoquinone on sodium fluoride-induced hepatotoxicity and oxidative stress in rats. *J Basic Appl Zool.* 2013. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jobaz.2013.04.002
70. Singh G, Marimuthu P, De Heluani CS, Catalan C. Chemical constituents and antimicrobial and antioxidant potentials of essential oil and acetone extract of *Nigella sativa* seeds. *J Sci Food Agric.* 2005. doi:10.1002/jsfa.2255
71. Thippeswamy NB, Naidu KA. Antioxidant potency of cumin varieties-cumin, black cumin and bitter cumin-on antioxidant systems. *Eur Food Res Technol.* 2005. doi:10.1007/s00217-004-1087-y

72. Bourgou S, Pichette A, Marzouk B, Legault J. Antioxidant, anti-inflammatory, anticancer and antibacterial activities of extracts from *Nigella sativa* (black cumin) plant parts. *J Food Biochem.* 2012;36(5):539-546.
73. Bashir MU, Qureshi HJ. Analgesic effect of *Nigella sativa* seeds extract on experimentally induced pain in albino mice. *J Coll Physicians Surg Pakistan.* 2010;20(7):464-467. doi:04.2010/JCPSP.464467
74. Mert, N., Ağaoğlu, Z.T., Gündüz, H., Ertekin, A., Dede S. *Nigella sativa* (çörek otu), vitamin C, E ve selenyum, nitrosoguanidin uygulanan tavşanların tüylerindeki iz element seviyelerine etkileri. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Derg.* 2000;26(3):87-90.
75. Bamosa AO, Ali BA SS. Effect of oral ingestion of *Nigella sativa* seed on some blood parameters. *J Saudi Pharm.* 1997;5:126-129.
76. Kanter M. Protective effects of thymoquinone on β -cell damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Tıp Araştırmaları Derg.* 2009;7(2):64-70.
77. Meddah B, Ducroc R, El Abbès Faouzi M, et al. *Nigella sativa* inhibits intestinal glucose absorption and improves glucose tolerance in rats. *J Ethnopharmacol.* 2009. doi:10.1016/j.jep.2008.10.040
78. Al-Logmani A, Zari T. Long-term effects of *Nigella sativa* L. oil on some physiological parameters in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *J Diabetes Mellit.* 2011;1(3):46-53. doi:10.4236/jdm.2011.13007
79. Rchid H, Chevassus H, Nmila R, et al. *Nigella sativa* seed extracts enhance glucose-induced insulin release from rat-isolated Langerhans islets. *Fundam Clin Pharmacol.* 2004. doi:10.1111/j.1472-8206.2004.00275.x
80. El Tahir KEH, Ashour MMS, Al-Harbi MM. The cardiovascular actions of the volatile oil of the black seed (*Nigella sativa*) in rats: elucidation of the mechanism of action. *Gen Pharmacol Vasc Syst.* 1993;24(5):1123-1131.
81. Dehkordi FR, Kamkhah AF. Antihypertensive effect of *Nigella sativa* seed extract in patients with mild hypertension. *Fundam Clin Pharmacol.* 2008;22(4):447-452.
82. Leong XF, Rais Mustafa M, Jaarin K. *Nigella sativa* and Its Protective Role in Oxidative Stress and Hypertension. *Evid Based Complement Altern Med.* 2013. doi:10.1155/2013/120732
83. Ammar ESM, Gameil NM, Shawky NM, Nader MA. Comparative evaluation of anti-inflammatory properties of thymoquinone and curcumin using an asthmatic murine model. *Int Immunopharmacol.* 2011. doi:10.1016/j.intimp.2011.10.013
84. El Gazzar M, El Mezayen R, Marecki JC, Nicolls MR, Canastar A, Dreskin SC. Anti-inflammatory effect of thymoquinone in a mouse model of allergic lung inflammation. *Int Immunopharmacol.* 2006;6(7):1135-1142.
85. Talib WH, Abukhader MM. Combinatorial effects of thymoquinone on the anticancer activity and hepatotoxicity of the prodrug CB 1954. *Sci Pharm.* 2013.

doi:10.3797/scipharm.1211-15

86. Woo CC, Loo SY, Gee V, et al. Anticancer activity of thymoquinone in breast cancer cells: possible involvement of PPAR-gamma pathway. *Biochem Pharmacol.* 2011. doi:10.1016/j.bcp.2011.05.030
87. Attoub S, Sperandio O, Raza H, et al. Thymoquinone as an anticancer agent: Evidence from inhibition of cancer cells viability and invasion in vitro and tumor growth in vivo. *Fundam Clin Pharmacol.* 2013. doi:10.1111/j.1472-8206.2012.01056.x
88. Al-Sheddi, Ebtessam Saad., Nida Nayyar Farshori¹, * MMA-O, Musarrat² J, Abdulaziz Ali Al-Khedhairi², Maqsood Ahmed Siddiqui². Cytotoxicity of Nigella Sativa Seed Oil and Extract Against Human Lung Cancer Cell Line. *Asian Pacific J Cancer Prev J Cancer Prev.* 2014. doi:10.7314/APJCP.2014.15.2.983
89. Peng L, Liu A, Shen Y, et al. Antitumor and anti-angiogenesis effects of thymoquinone on osteosarcoma through the NF-κB pathway. *Oncol Rep.* 2013. doi:10.3892/or.2012.2165
90. Javanbakht J, Hobbenaghi R, Hosseini E, et al. Histopathological investigation of neuroprotective effects of Nigella sativa on motor neurons anterior horn spinal cord after sciatic nerve crush in rats. *Pathol Biol.* 2013;61(6):250-253.
91. Hobbenaghi R, Javanbakht J, Sadeghzadeh S, et al. Neuroprotective effects of Nigella sativa extract on cell death in hippocampal neurons following experimental global cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. *J Neurol Sci.* 2014;337(1):74-79.
92. Akhtar A, A.K. N, R. H, et al. Neuroprotective effects of chloroform and petroleum ether extracts of nigella sativa in stroke model of rats. *Neuroepidemiology.* 2012.
93. Ullah I, Ullah N, Naseer MI, Lee HY, Kim MO. Neuroprotection with metformin and thymoquinone against ethanol-induced apoptotic neurodegeneration in prenatal rat cortical neurons. *BMC Neurosci.* 2012. doi:10.1186/1471-2202-13-11
94. Mousavi SH, Tayarani-Najaran Z, Asghari M, Sadeghnia HR. Protective effect of Nigella sativa extract and thymoquinone on serum/glucose deprivation-induced PC12 cells death. *Cell Mol Neurobiol.* 2010. doi:10.1007/s10571-009-9484-1
95. Sedaghat R, Roghani M, Khalili M. Neuroprotective effect of thymoquinone, the Nigella sativa bioactive compound, in 6-hydroxydopamine-induced hemi-parkinsonian rat model. *Iran J Pharm Res.* 2014.
96. Al-Majed AA, Al-Omar FA, Nagi MN. Neuroprotective effects of thymoquinone against transient forebrain ischemia in the rat hippocampus. *Eur J Pharmacol.* 2006. doi:S0014-2999(06)00573-5 [pii]n10.1016/j.ejphar.2006.05.046
97. Khazaei M, Salehi H. Protective effect of Falcaria vulgaris extract on ethanol induced gastric ulcer in rat. *Iran J Pharmacol Ther.* 2006.
98. Tsuji S, Kawano S, Sato N KT. Mucosal blood flow stasis and hypoxemia as the pathogenesis of acute gastric mucosal injury: role of endogenous leukotrienes and

- prostaglandins. *J Clin Gastroenterol*. 1990;12(Suppl 1):85-91.
99. Arslan SO, Gelir E, Armutcu F, et al. The protective effect of thymoquinone on ethanol-induced acute gastric damage in the rat. *Nutr Res*. 2005. doi:10.1016/j.nutres.2005.06.004
 100. El-Dakhakhny M, Barakat M, El-Halim MA, Aly SM. Effects of Nigella sativa oil on gastric secretion and ethanol induced ulcer in rats. *J Ethnopharmacol*. 2000;72(1):299-304.
 101. Zaidi SF, Yamada K, Kadowaki M, Usmanghani K, Sugiyama T. Bactericidal activity of medicinal plants, employed for the treatment of gastrointestinal ailments, against Helicobacter pylori. *J Ethnopharmacol*. 2009. doi:10.1016/j.jep.2008.11.001
 102. Abdel-Sater KA. Gastroprotective effects of Nigella Sativa oil on the formation of stress gastritis in hypothyroidal rats. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*. 2009.
 103. Zaman R, Akhtar MS KM. Gastroprotective and anti-secretory effect of Nigella sativa seed and its extracts in indomethacin-treated rats. *Pak J Biol Sci* . 2004;7:995-1000.
 104. Nickavar B, Mojab F, Javidnia K, Roodgar Amoli MA. Chemical Composition of the Fixed and Volatile Oils of Nigella sativa L. from Iran. *Zeitschrift fur Naturforsch - Sect C J Biosci*. 2003. doi:10.1515/znc-2003-9-1004
 105. Cheikh-Rouhou S, Besbes S, Hentati B, Blecker C, Deroanne C, Attia H. Nigella sativa L.: Chemical composition and physicochemical characteristics of lipid fraction. *Food Chem*. 2007;101(2):673-681.
 106. Ashraf M, Ali Q, Iqbal Z. Effect of nitrogen application rate on the content and composition of oil, essential oil and minerals in black cumin (Nigella sativa L.) seeds. *J Sci Food Agric*. 2006. doi:10.1002/jsfa.2426
 107. Michelitsch A, Rittmannsberger A, H??fner A, R??ckert U, Likussar W. Determination of isopropylmethylphenols in black seed oil by differential pulse voltammetry. *Phytochem Anal*. 2004. doi:10.1002/pca.785
 108. Ramadan MF, Mörssel J-T. Characterization of phospholipid composition of black cumin (Nigella sativa L.) seed oil. *Nahrung - Food*. 2002. doi:10.1002/1521-3803(20020701)46:4<240::AID-FOOD240>3.0.CO;2-1
 109. Machmudah S, Shiramizu Y, Goto M, Sasaki M, Hirose T. Extraction of Nigella sativa L. using supercritical CO₂: A study of antioxidant activity of the extract. *Sep Sci Technol*. 2005. doi:10.1081/SS-200053005
 110. Ramadan MF, Mörssel JT. Oxidative stability of black cumin (Nigella sativa L.), coriander (Coriandrum sativum L.) and niger (Guizotia abyssinica Cass.) crude seed oils upon stripping. *Eur J Lipid Sci Technol*. 2004. doi:10.1002/ejlt.200300895
 111. Akgören G. Bazı Çörekotu (Nigella sativa L.) Popilasyonlarının Tarımsal Özellikleri. 2011.

112. Crocoll C. Biosynthesis of the phenolic monoterpenes, thymol and carvacrol, by terpene synthases and cytochrome P450s in oregano and thyme. 2011.
113. Alemi M, Sabouni F, Sanjarian F, Haghbeen K, Ansari S. Anti-inflammatory effect of seeds and callus of *Nigella sativa* L. extracts on mix glial cells with regard to their thymoquinone content. *AAPS PharmSciTech*. 2013;14(1):160-167.



EKLER

EK-1

Çörek Otu Yağlarının Yağ Asidi Profili Sonuçları

Piyasadan temin edilen ve metillenmiş çörek otu yağlarının yağ asidi % miktarları ile oluşturulmuş yağ asidi profili

Yağ Asidi	Karbon Sayısı	ÇY1	ÇY2	ÇY3	ÇY4	ÇY 5	ÇY 6	ÇY 7	ÇY 8	ÇY 9	ÇY 10
Miristik Asit	(C14:0)	-	-	-	-	0,153	-	-	0,144	0,160	-
Palmitik Asit	(C16:0)	10,556	8,068	7,292	8,185	12,413	-	12,888	12,129	12,626	-
Palmitoleik Asit	(C16:1)	-	-	-	-	0,168	-	-	0,172	0,174	-
Stearik Asit	(C18:0)	3,022	0,892	3,273	3,644	3,075	-	2,977	3,40	3,346	-
Oleik Asit	(C18:1)	33,080	51,831	41,066	28,947	25,310	-	25,982	25,315	25,067	-
Linoleik Asit	(C18:2)	52,120	35,276	48,368	56,979	55,734	-	58,154	55,478	55,614	-
Linolenik Asit	(C18:3)	0,569	3,934	-	0,567	0,206	-	-	0,342	0,218	-
Araşidik Asit	(C20:0)	-	-	-	0,210	0,254	-	-	0,216	-	-
Eikosadienoik Asit	(C20:2)	0,654	-	-	0,751	2,687	-	-	2,804	2,795	-
Dokosadienoik Asit	(C22:2)	-	-	-	0,717	-	-	-	-	-	-

EK-2**Çörek Otu Yağı Kapsüllerinin Yağ Asidi Profili Sonuçları**

Piyasadan temin edilen ve metillenmiş çörek otu yağı kapsüllerinin % miktarları ile oluşturulmuş yağ asidi profili

Yağ Asidi	Karbon Sayısı	ÇK1	ÇK2	ÇK3	ÇK 4	ÇK 5	ÇK 6	ÇK 7	ÇK 8	ÇK 9	ÇK 10
Miristik Asit	(C14:0)	0,130	-	-	0,08	0,137	0,164	0,073	-	0,128	0,130
Palmitik Asit	(C16:0)	11,349	8,893	12,04	7,90	11,285	12,716	10,665	8,345	12,345	11,996
Palmitoleik Asit	(C16:1)	-	-	-	-	-	0,159	0,136	-	0,174	-
Stearik Asit	(C18:0)	3,901	3,144	3,53	3,98	3,893	3,660	5,425	3,906	3,878	3,934
Oleik Asit	(C18:1)	27,384	46,712	24,93	34,35	27,349	26,396	35,082	31,132	26,346	27,198
Linoleik Asit	(C18:2)	50,610	36,677	56,45	52,84	50,310	53,845	45,154	56,616	54,389	53,632
Linolenik Asit	(C18:3)	0,594	2,945	-	-	0,625	-	1,685	-	-	-
Araşidik Asit	(C20:0)	-	-	-	-	-	-	0,521	-	-	-
Eikosenoik Asit	(C20:1)	1,141	-	-	-	1,234	-	-	-	-	-
Eikosadienoik Asit	(C20:2)	2,737	1,629	3,05	0,85	2,691	2,760	1,258	-	2,740	3,109
Erusik Asit	(C22:1)	2,154	-	-	-	2,475	-	-	-	-	-

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Selin IŞIK

Doğum Yeri: Lefkoşa/ K.K.T.C.

Doğum Tarihi: 17.10.1984

Medeni Hali: Evli

Yabancı Dili: İngilizce, Almanca (başlangıç seviyesinde)

Eğitim Durumu

Lise: Türk Maarif Koleji (1998-2001)

Lisans: Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya (2001-2006)

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü- Temel Biyoteknoloji

İletişim Bilgileri

Email: selin_isikk@hotmail.com

Telefon: 0533 825 31 39

10. TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR

Isik,S., Kartal, M., Erdem, S.A. Quantitative Analysis Of Thymoquinone In *Nigella sativa* L. (Black Cumin) Seeds And Commercial Seed Oils And Seed Oil Capsules From Turkey. J. Fac. Pharm. Ankara/ Ankara Ecz. Fak. Derg., 41(1): 34-41, 2017. Doi: 10.1501/Eczfak_0000000593

Tez Dışındaki Doktora Yayını

Mustabasic, N., Isik, S. Determination of sildenafil into herbal honey mixture by ultra-performance liquid chromatography – quadrupole time of flight mass spectroscopy. Croat. J. Food Sci. Technol. (2017), 9, (2) 168-172. Doi: 10.17508/CJFST.2017.9.2.13.

KONGRE- TOPLANTI BİLDİRİLER

Uluslararası Kongrelerde Sunulan Posterler Ve Bildiriler

S.ISIK, S. ASLAN ERDEM, M. KARTAL, Quantitative Analysis of Thymoquinone in *Nigella sativa* L. (Black Cumin) Seeds and Seed Oils From Local Markets of Turkey. International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS 11), 09-12 June 2015, Ankara, TURKEY.



QUANTITATIVE ANALYSIS OF THYMOQUINONE IN *NIGELLA SATIVA* L. (BLACK CUMIN) SEEDS AND COMMERCIAL SEED OILS AND SEED OIL CAPSULES FROM TURKEY

TÜRKİYE'DE YETİŞEN *NIGELLA SATIVA* L. (ÇÖREK OTU) TOHUMLARI, TİCARİ TOHUM YAĞLARI VE TOHUM YAĞI KAPSÜLLERİNDEKİ TİMOKİNONUN KANTİTATİF ANALİZİ

Selin ISIK^{1*}, Murat KARTAL², Sinem ASLAN ERDEM²

¹Ankara University, Institute of Biotechnology, 06100, Tandogan, Ankara

²Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacognosy, 06100, Tandogan, Ankara

SUMMARY

Medicinally and economically important plant Nigella sativa L., popularly known as çörek otu in Turkey, is cultivated in many parts of Turkey. The most important component of its oil is thymoquinone. Nigella sativa is used in alternative medicine to treat cancer, rheumatism, headaches, and many diseases for thousands of years. In this study, 10 different seed and seed oil samples that have been supplied from local markets in Ankara, were investigated for their thymoquinone contents by HPLC.

Keywords: black cumin; HPLC; Nigella sativa; thymoquinone

ÖZET

Tıbbi ve ekonomik olarak oldukça büyük bir öneme sahip olan ve Türkiye'de çörek otu olarak bilinen Nigella sativa, Türkiye'nin çeşitli bölgelerinde yetiştirilmektedir. Yağının en önemli bileşiği timokinon'dur. Nigella sativa alternatif tıpta kanser, romatizma, baş ağrısı ve daha birçok hastalığa karşı binlerce yıldır kullanılmaktadır. Bu çalışmada; Ankara'da bulunan aktarlardan temin edilmiş 10 farklı çörekotu tohumu ve yağı, içerdikleri timokinon miktarlarına göre yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile incelenmiştir.

Anahtar kelimeler: çörek otu; HPLC; Nigella sativa, timokinon

* Corresponding Author / Sorumlu Yazar: Selin ISIK

e-mail: akbas@ankara.edu.tr

Submitted/Gönderilme: 27.08.2017

Accepted/Kabul: 11.10.2017

INTRODUCTION

Medicinal plants have been an extensive source of therapeutic agents since ancient times for healing human diseases. *Nigella sativa* L., belonging to Ranunculaceae, is used as a natural remedy against a number of illnesses and conditions such as asthma, hypertension, diabetes, inflammation, cough, bronchitis, headache, eczema, fever, dizziness and influenza, for over 2000 years. It is a spicy plant and refined in various parts of the world. The seeds are known as "black cumin" or "black caraway", likewise "çörek otu" in Turkey and traditionally been used in the Indian sub-continent, Arabian countries, Middle Eastern, and Far Eastern Countries both as spice and natural remedy. In Turkey, it is cultivated in Afyon, Burdur and Isparta regions. It is an annual plant and grows up to 15–30 cm, branched, more or less furry with finely divided, linear (but not thread-like) leaves. The flowers are delicate, and usually white coloured, with five petals; the seeds are three-sided and black [1-3]. The seeds and the oil are believed to be carminative, diuretic, lactagogue and vermifuge [4]. Pharmacologically, active constituents of seed oils are thymoquinone, dithymoquinone, thymohydroquinone and thymol [5].

The seeds and/or oils of *Nigella* are also used in foods as spice and seasoning. According to the Islamic belief; the 'black seed', is accepted as a panacea (universal cure) i.e. a remedy for all ailments, but cannot prevent ageing or death in Arabic countries as well [6].

The chemical composition of *N. sativa* seeds was reported for the first time in 1880, and it is found to be composed of oils, proteins, carbohydrates, fibers, ashes, moisturizers, etc. The fixed oil component of *N. sativa* (36–38%) mostly consisted of linoleic (50–60%), oleic (20–23.4%), palmitic (12.5%), dihomolinoleic (10%), and eicosadienoic (3%) acids as well as arachidonic, stearic, and myristic acids; betasitosterol; cycloeucaleol; cycloartenol; sterolesters; and sterol glucosides with some other minor lipid constituents such as methylnonadeca-15,17-dienoate, pentylhexadec-12-enoate, and pentylpentadec-11-enoate. Their multifunctional preventive and relieving effects have been associated to significant constituents such as nigellicine, nigellidine, thymoquinone (TQ), dithymoquinone, thymol, and carvacrol [7].

Screening of vitamin content of the seeds indicated that *N. sativa* seeds contain significant amounts of vitamins B1, B6 and niacin, additionally vitamin B2 and folic acid relatively in smaller amounts. The results are summarized at Table 1 [8].

Table 1. Vitamin composition of *N. sativa* L. seeds [8]

Vitamin	Found (μg per 100 g)	RDA*(%)
B1 (Thiamin)	831 + 11.36	55.3
B2 (Riboflavin)	63 + 3.32	3-5
B6 (Pyridoxine)	789 + 8.89	35.9
PP (Niacin)	6311 + 16.52	33.2
Folic acid	42 + 4.58	10

*Recommended Dietary Allowances (Anon., 1980).

N. sativa seeds contain fixed oil, saponins, alkaloids, proteins and essential oil. Thymoquinone is the most prominent constituent in *N. sativa* and there has been, 406 posted research reports about TQ on the "PubMed" database since 1960. Beside the popularity of the Thymoquinone, it is also the main responsible constituent of the hepatoprotective, the anti-inflammatory and the anti-cancer and antitumor effects of *Nigella's* seed essential oil [9].

The results of a study which investigate the hepatoprotective effects of TQ against acetaminophen-induced hepatotoxicity on Wistar albino rats shows that, the levels of aspartat aminotransferase (AST), oxidized glutathione (GSSG), serum alanine aminotransferase (ALT) and superoxide dismutase (SOD) activity were found to be lower compared to that of rats treated without thymoquinone [10].

According to Al Wafai [11], *N. sativa* and TQ treatment is responsible of the suppression of COX-2 enzyme's expression in the pancreatic tissue of streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats.

It was shown that essential oil and methanolic extract of *N. sativa* and its active principle, thymoquinone, displays potent antileishmanial effects against *L. tropica* and *L. infantum* (genus of trypanosomes) species in the *in vitro* model [12].

In a recent study, immunohistochemical analysis confirmed that thymoquinone significantly decreased Cd-induced over expression of nuclear factor- κ B in renal tissue. Moreover, thymoquinone treatment resulted decrease of the in apoptotic cell numbers. Thymoquinone considerably suppressed lipid peroxidation, atoned deficits in the antioxidant defenses (reduced superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase activities) in renal tissue induced by Cd administration. These results suggest that thymoquinone's antioxidant and anti-apoptotic properties would be more advantageous for achieving maximum effects in nephrotoxicity induced by Cd [13].

In this study, all samples (seeds, seed oils and seed oil capsules) have different trademarks that supplied from local markets in Ankara and they were investigated for their thymoquinone contents by HPLC.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and Materials: HPLC grade methanol and 2-propanol (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) were used. Millipore filtered water was obtained by passing distilled water through a Milli-Q system (Millipore Corp., Milford, MA). Thymoquinone (Sigma, St. Louis, MO) was purchased and dissolved in HPLC grade methanol for the analysis.

Samples: Samples were supplied from local markets in Ankara. Each seeds, seed oils and seed oil capsules have a different brand. The seeds were coded as NS 1 to 10, the seed oils were coded as NO 1 to 10 and the seed oil capsules were coded as NOC 1 to 10.

Seed extraction: 5 g seeds were powdered and stirred with 200 ml methanol for 2 hours than filtered and evaporated by using rotavapor. The residue was solved gradually with methanol and completed to 50 ml with methanol.

Oil extraction: 20 μ L black cummin oils of both oil products and capsules were filtered from Agilent ZORBAX SPE C18 (EC) cartridges (Agilent corporation, USA.) with 2x400 μ L methanol.

HPLC Quantification: For the quantitative analysis; standart thymoquinone solutions were prepared at 0.5, 1, 5, 15, 25, 50, 100, 250, 500 and 750 ppm concentrations. Areas of these concentrations were used for the calibration.

HPLC Conditions: Samples were analysed with Agilent Technologies 1200 series high pressure liquid chromatography (HPLC), including a binary pump, a vacuum degasser, an autosampler and a diode array dedector. Chromatographic separations were performed on Eclipse XDB-C18 column (150 mm x 4.6 mm, 5 μ m). Isocratic mobile phase was chosed for as mobile phase; water:methanol:2-propanol (50:45:5) solution was used for separation at a flow rate of 0.9 mL min⁻¹. Analysis time was 28 min and the detection wavelength was set at 254 nm for thymoquinone. Identification on thymoquinone was made by comparing the retention times and UV spectras of the peaks of pure standards. The injection volume was 10 μ L for each sample and standard solutions. All the calculations concerning the quantitative analysis were performed with external standardization by measurement of peak areas. Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were established at a standard deviation over slope of 3.3 and 10, respectively.

RESULTS AND DISCUSSION

The HPLC chromatogram obtained from the analysis of the seeds and seed oils, described above showed well resolved peaks with no interference. Chromatograms of the standard and a sample examined are given in Figures 1 and 2 respectively; other chromatograms were not given since they are similar with the sample mentioned below. Thymoquinone was observed in all samples and the quantity

of the thymoquinone found in the seeds, seed oils and seed oil capsules are given in Table 2, Table 3 and Table 4 with both concentrations and percentages, respectively. Calibration equation, IOD and LOQ values are given in Table 5.

Interestingly, all the samples examined were found to contain only thymoquinone in significant amounts, and not the other derivatives such as dithymoquinone and thymohydroquinone. Although the percentages of thymoquinone vary for each sample, oils were found to contain higher amounts of thymoquinone compared to the seeds in general. According to the tables given below, sample NS1 has the highest and sample NS4 has the lowest amounts of thymoquinone. For oil samples; sample NO9 has the highest and sample NO4 has the lowest amounts of thymoquinone. Among the thymoquinone contents of oil capsules, while NOC3 sample has the highest amount of thymoquinone, NOC4 sample has the lowest. When we compare the results of oil samples with Ghoseh's study [4], it clearly shows that we have similar results related to thymoquinone content.

The source of thymoquinone is not only black cumin. According to Taborsky's research [14], there are many other plants which have high amount of thymoquinone, dithymoquinone and thymohydroquinone. For the identification of other sources of thymoquinone, dithymoquinone and thymohydroquinone; 7 plant families were investigated and it was revealed that 11 out of 47 plant species also have these components. Results of the study shows that *Monarda didyma* L. (chemotype 1), *Monarda didyma* L. (chemotype 2), *Monarda media* Willd., *Monarda menthifolia* Graham and *Satureja montana* L. also contain thymoquinone, dithymoquinone and thymohydroquinone. Thymoquinone contents in that study found to be similar to to the findings of our study.

Table 2. Concentrations and amounts of thymoquinone in seeds (in mg)

Sample Name	Concentration (ppm)	% Amount of Thymoquinone
NS1	376.192	0.376
NS2	100.579	0.101
NS3	15.190	0.015
NS4	9.806	0.010
NS5	20.959	0.021
NS6	107.062	0.107
NS7	84.782	0.085
NS8	14.278	0.014
NS9	106.614	0.107
NS10	167.061	0.167

Table 3. Concentrations and amounts of thymoquinone in seed oils (in mg)

Sample Name	Concentration (ppm)	% Amount of Thymoquinone
NO1	84.217	0.230
NO2	126.521	0.346
NO3	96.467	0.264
NO4	18.121	0.050
NO5	226.276	0.619
NO6	177.964	0.486
NO7	69.931	0.191
NO8	55.848	0.153
NO9	175.454	0.480
NO10	51.837	0.142

Table 4. Concentrations and amounts of thymoquinone in seed oil capsules (in mg)

Sample Name	Concentration (ppm)	% Amount of Thymoquinone
NOC1	267.707	0.732
NOC2	185.426	0.507
NOC3	740.098	2.023
NOC4	13.459	0.037
NOC5	296.747	0.811
NOC6	37.363	0.102
NOC7	76.780	0.210
NOC8	15.681	0.043
NOC9	94.222	0.258
NOC10	105.649	0.289

Table 5. Calibration equation, limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) values

Compound	Standard curve	r ²	LOD (ppm)	LOQ (ppm)
Thymoquinone	$y = 57.518x + 168$	0.9998	0.0303	0.0919

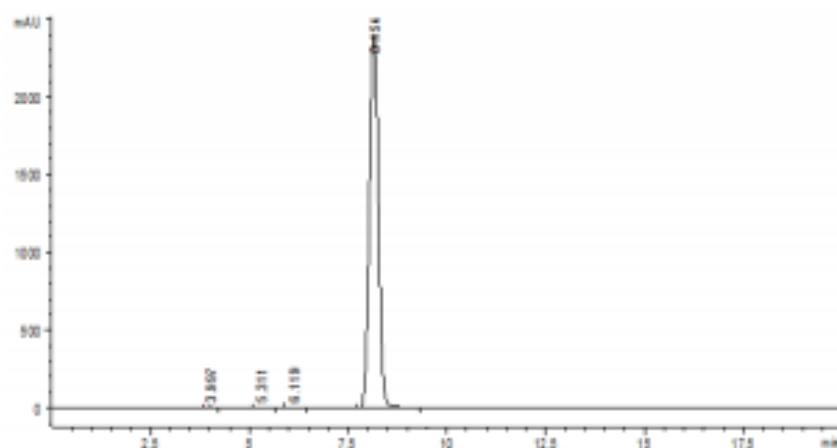


Figure 1. Chromatogram of Thymoquinone Standard

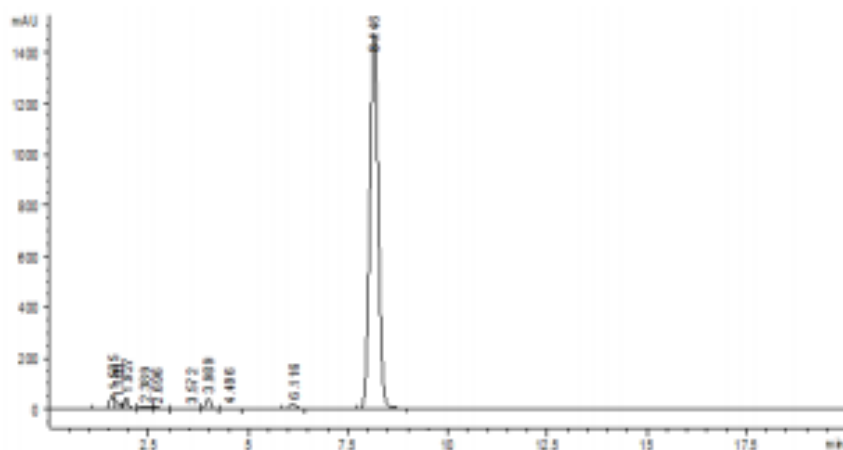


Figure 2. Chromatogram of *Nigella sativa* seed 1 (NS1)

CONCLUSION

In this study, the amount of thymoquinone is determined in black cumin seeds, seed oils and seed oil capsules quantitatively by HPLC. Thymoquinone determination in these three sample types containing *Nigella* (seeds, seed oils and oil capsules) is the main goal of this investigation. As far as we were concerned, this is the first study examining and comparing thymoquinone contents of seeds of *Nigella sativa*, commercial seed oils and seed oil capsules in Turkey quantitatively. It can be concluded that commercial products sold in Turkey contain adequate thymoquinone.

REFERENCES

1. Gencler-Ozkan, A.M. (2011). *Nigella sativa* L. in FFD Monografileri, Tedavide kullanim Bitkiler. Demirezer, L.Ö. (Ed.) 2nd edition, MN Medikal & Nobel, pp. 423-431, Ankara.
2. Davis, P.H. (1965-1985). Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Edinburg University Pres, 1-9, Edinburg.
3. Houghton, P.J., Zarka, R., Heras, B., Hoult, R.S. (1995). Fixed oil of *N. sativa* and derived thymoquinone inhibit eicosanoid generation in leucocytes and membrane lipid peroxidation. *Planta Med.*, 61, 33-36.
4. Ghosheh, O.A., Houdi, A.A., Crooks, P.A. (1999). High performance liquid chromatography analysis of the pharmacologically active quinines and related compounds in the oil of the black seed (*Nigella sativa*). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 19, 757-762.
5. Bourgo S., Ksouri R., Bellia A., Skandrani I., Falleh H., Marzouk B. (2008). Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa* L. shoots and roots. *C. R. Biologies*, 331(1), 48-55.
6. Ali B.H., Blunden, G. (2003). Pharmacological and toxicological properties of *Nigella sativa*. *Phytother Res.*, 17, 299-305.
7. Gholamzhad, Z., Havakhah, S., Boskabady, H.M. (2016). Preclinical and clinical effects of *Nigella sativa* and its constituent, thymoquinone: A review. *Journal of Ethnopharmacology*, 190, 372-386.
8. Nergiz C. (1993). Otles S. Chemical composition of *Nigella sativa* L. seeds. *Food Chemistry*, 48, 259-261.
9. Khandar, M., Eckl, P.M. (2014). Thymoquinone: an emerging natural drug with a wide range of medical applications. *Iran J Basic Med Sci*, 17, 950-957.
10. Aycan, I.O., Tufek, A., Tokgoz, O., Evliyaoglu, O., Firat, U., Kavak, G.O., Turgut, H., Yuksel, M.U. (2014). Thymoquinone treatment against acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *Int J Surg*, 12, 213-218.
11. Al Wafai R.J. (2013). *Nigella sativa* and thymoquinone suppress cyclooxygenase-2 and oxidative stress in pancreatic tissue of streptozotocin-induced diabetic rats. *Pancreas*, 42, 841-849.
12. Mahmoodvand, H., Tavakoli, R., Sharififar, F., Minaie, K., Ezatpour, B., Jahanbakhsh, S., Sharifi, I. (2014). Leishmanicidal and cytotoxic activities of *Nigella sativa* and its active principle, thymoquinone. *Pharmaceutical Biology*, 53(7), 1052-1057.
13. Erboğa, M., Kanter, M., Aktas, C., Sener, U., Fidanol Erboğa, Z., Bozdemir Donmez, Y., Gurel, A. (2016). Thymoquinone Ameliorates Cadmium-Induced Nephrotoxicity, Apoptosis, and Oxidative Stress in Rats is Based on its Anti-Apoptotic and Anti-Oxidant Properties. *Biological Trace Element Research*, 170(1), 165-172.
14. Taborsky, J., Kunt, M., Kloucek, P., Lachman, J., Zeleny, V., Kokoska, L. (2012). Identification of potential sources of thymoquinone and related compounds in Asteraceae, Cupressaceae, Lamiaceae and Ranunculaceae families. *Central European Journal of Chemistry*, 10(6), 1899-1906.

Determination of sildenafil mixed into herbal honey mixture by ultra-performance liquid chromatography-quadrupole time of flight mass spectrometry

Neira Mustabasic^{1*} and Selin Isik²

¹Ankara University, Institute of Forensic Science, Department of Forensic Chemistry and Forensic Toxicology, Cebeci Research and Application Hospital, 06590 Dikimevi, Ankara, Turkey

²Near East University, Faculty of Pharmacy, Department of Analytical Chemistry, 99138 Nicosia, Turkish Republic of Northern Cyprus

original scientific paper
DOI: 10.17508/CJFST.2017.9.2.13

Summary

There has been a number of reports of natural products contaminated with illegal adulterants that threaten consumer health because of their adverse pharmacological effects worldwide. In this study, a multi-residual ultra-performance liquid chromatography method with quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-QTOF-MS) was applied for the identification of sildenafil added into a herbal honey mixture used as an immune system booster. Electrospray ionization (ESI) source was applied and operated in the positive ion mode. The mobile phase consisted of 0.1% formic acid aqueous solution/acetonitrile (70:30, v/v) using the isocratic gradient elution system at a detection wavelength of 290 nm. The compound of sildenafil added into traditional herbal mixed honey was identified according to the spectrum, chromatographic behavior, and mass spectral data were identified by comparison with the reference substance. The method is selective, sensitive and can be used to detect the sildenafil illegally added into traditional herbal medicinal preparations.

Keywords: ultra-performance liquid chromatography, quadrupole time-of-flight mass spectrometry, honey, sildenafil, herbal products

Introduction

Sildenafil, 1-[4-ethoxy-3-(6,7-dihydro-1-methyl-7-oxo-3-propyl-1H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-yl) phenyl-sulfonyl]-4-methyl piperazine (Fig. 1), is a potent and selective inhibitor of a phosphodiesterase type 5 enzyme (Alkharfy, 2009). In 1998, sildenafil (*Viagra*[®]) was approved by the United States Food and Drug Administration (FDA) for the treatment of erectile dysfunction (Ren et al., 2012).

Unlike other approved medicines for erectile dysfunction, sildenafil does not directly cause penile erection, but induces reaction to sexual incitement. The medication acts by influencing enzymes in the nitric oxide pathway, causing a cascade of enzymatic reactions that enhance nitric oxide, causing more blood flow and better erections. When sexual stimulation causes local release of nitric oxide, sildenafil enhances the effect of nitric oxide on the corpus cavernosum by increasing the levels of cGMP in this tissue (Umrani et al., 1999; Rendell et al., 1999).

Sildenafil is rapidly absorbed following oral administration, has an onset of action within 25 to 60 minutes after dosing and has a short plasma half-life of approximately 4 hours (Rendell et al., 1999). The absolute average bioavailability after oral administration is about 40%. Sildenafil is subject to a

predominantly hepatic metabolism and converted to an active metabolite in reaction mediated by the low-affinity, high-capacity P450 (CYP) 3A4 isoenzyme (major route) and the high-affinity, low-capacity CYP2C9 isoenzyme (minor route). After either oral (PO) or intravenous (IV) dosing, sildenafil is rapidly cleared from the body as metabolites mostly in the feces and a minor amount in the urine (Umrani et al., 1999). Redness in the face and neck, indigestion, photophobia, blurred vision, and in rare conditions, ventricular arrhythmias, myocardial infarction and sudden hearing loss are side effects of constant sildenafil use (Maryam, 2016).

Male erectile dysfunction, the persistent inability to achieve or maintain an erection for satisfactory sexual performance, is a common medical problem. According to a random study, over half of all men between 40 and 70 years of age have experienced erectile dysfunction. It is also estimated that the number of men who have erectile dysfunction will double in the next 25 years, ultimately affecting more than 330 million men worldwide (Al-Tahami, 2014).

The use of herbal remedies and dietary supplements has greatly increased. There are reports that some herbal products advertised as "all natural" had been found to be adulterated with synthetic PDE-5 inhibitors such as sildenafil (Damiano et al., 2014).

*Corresponding author: mustabasic@ankara.edu.tr

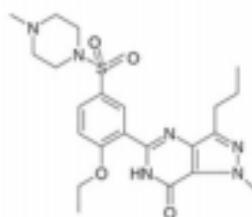


Fig. 1. Chemical structure of sildenafil

Illegitimate manufacturers produce hand-made counterfeit herbal supplements without any quality and purity standards under the authority of regulatory systems. There is a great common concern that herbal drugs are safe without any side effects. As a result of this belief, many patients trust herbal supplement manufactures and rely on what they say about their products (Maryam, 2016).

Recently, world's largest pharmaceutical companies have agreed with Interpol to provide the funding and other support to Interpol's battle against counterfeit drugs. The major pharmaceutical companies are involved in the problem with large investment plans (Damiano et al., 2014).

In this study, herbal mixed honey used as an immune system booster found in Ankara, Turkey was analyzed for the presence of sildenafil, the approved synthetic PDE-5 inhibitor. The UPLC/Q-ToF method was adopted for this study to investigate sildenafil presence simultaneously. In the present study we investigated the effect of different extraction media on the sildenafil detection by ultra performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry illegally mixed into herbal honey mixture in Turkey. It is an automated detection and data filtering was performed using the Waters UNIFI software.

Materials and methods

This research was carried out at the Novagenix Bioanalytical R&D Centre, Herbal Product Analysis Laboratory, Ankara, Turkey.

Chemicals and materials

HPLC grade methanol, formic acid and acetonitrile (Merck, Germany, purity >99.9%) were purchased and used with no further purification. Millipore filtered water was obtained by passing the distilled water through a Milli-Q® system (Millipore Corp., Milford, MA). Sildenafil reference standard was obtained from

Sigma (St. Louis, MO) and dissolved in HPLC grade methanol.

Sample

The herbal honey mixture found in Ankara, Turkey, was used as an immune system booster. A premarketing regulatory review was sought for this honey and claimed suspicion on the presence of sildenafil or other PDE-5 inhibitors. Many products labelled as "herbal" or "all natural" (herbal/natural) escape a premarketing regulatory review through marketing as over-the-counter (OTC) dietary supplements.

Sample preparation

Three different extraction methods were applied to the sample. For the first extraction, 5 g honey mixture was dissolved in 15 mL methanol, for the second extraction 5 g honey mixture was dissolved in 15 mL acetonitrile, and for the third extraction 5 g honey mixture was dissolved in 15 mL acetonitrile/water (50:50, v/v). The samples were subjected to ultrasonic treatment for 15 minutes, and then cooled to room temperature. After the sonication, samples were centrifuged at 5500 rpm. Approximately 2 mL of each supernatant solution after microfiltration was added in three vials and placed in the UPLC autosampler. The samples were analyzed by UPLC/Q-ToF.

Standard preparation

Sildenafil stock standard solution was prepared by accurately weighing an amount equivalent to 5 mg of the drug, which was dissolved in 20 mL methanol to produce a concentration of 0.25 mg/mL.

Preparation of mobile phase

HPLC-grade acetonitrile and formic acid (Merck, Germany, purity >99.9%) were purchased and used with no further purification. The mobile phase was

0.1% formic acid aqueous solution/acetonitrile (70:30, v/v) filtered through a cellulose acetate membrane of 0.2 μm (Waters, USA) and degassed in ultrasonic bath for 5 minutes before being used. Milli-Q[®] ultrapure water was used for mobile phase preparation.

UPLC- MS Analysis

The samples were analyzed on a quadrupole time-of-flight mass spectrometer (Xevo G2-XS Qtof-MS, Waters Micromass, UK) with an electrospray ionization probe in positive ion acquisition mode (ESI(+)), coupled to an ultraefficient liquid chromatography Acquity[®] I-Class UPLC-TUV consisting of a binary pump, autosampler, column oven and a tunable UV-detector (Waters, USA). Scientific Information System from Waters (USA). Separation was performed in a column Acquity[®] UPLC BEH C18 (2.1 μm x 50 mm x 1.7 μm). Mobile phase flow rate was 0.7 mL/min. Column was maintained at 60 °C during the analysis. Chromatograms were monitored at 290 nm. Chromatographic separation lasted for 2 min. For LC-ESI (+) QTOF-MS system, ESI (+) source conditions were as follows; source temperature of 120 °C, capillary voltage of 3 kV, cone voltage of 40 V and collision energy 6 eV. The spectra were scanned in the range of m/z from 50 to 2000. The UPLC-Q-TOF-MS data of samples were acquired and analyzed by Waters UNIFI software.

Results and discussion

The chromatographic method for the simultaneous determination of sildenafil used in this study was developed and validated previously for the different analytical matrices (Ortiz et al., 2013). The standard and examined analytes were separated under the given chromatographic conditions.

The herbal honey mixture sample was extracted with different solvents, and different extraction media responded very similarly. Chromatogram of Sildenafil standard is shown in Fig. 2 with the retention time of 0.45 s. Representative chromatograms of sildenafil ($m/z = 474.5$) in different extract honey samples are shown in Fig. 3. Sildenafil was eluted within 2 min of the chromatographic run. The retention times for sildenafil in different extractants were 0.47 in methanol, 0.45 in acetonitrile, and 0.47 min in acetonitrile/water (50:50, v:v), respectively. The peaks were well-resolved with no overlapping. When compared to the standard, the herbal honey mixture sample contained sildenafil having similar retention time to the standard. UPLC/Q-ToF is used in pharmaceutical analytical laboratories throughout the world for identity testing, because it is simple, rapid, robust and inexpensive. In confirmation experiments, we conducted a qualitative analysis.

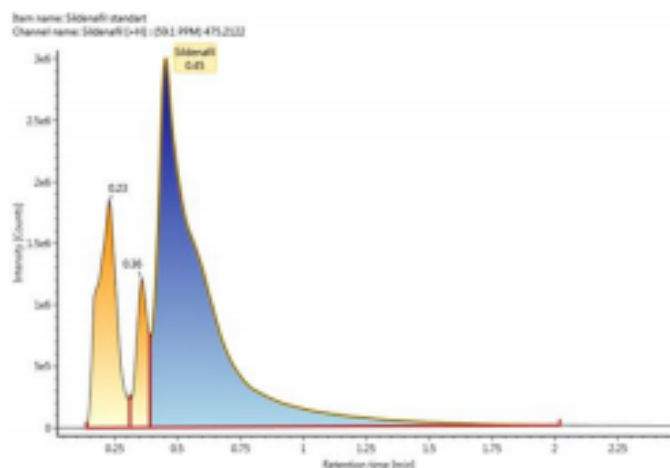


Fig. 2. UPLC chromatogram of sildenafil standard

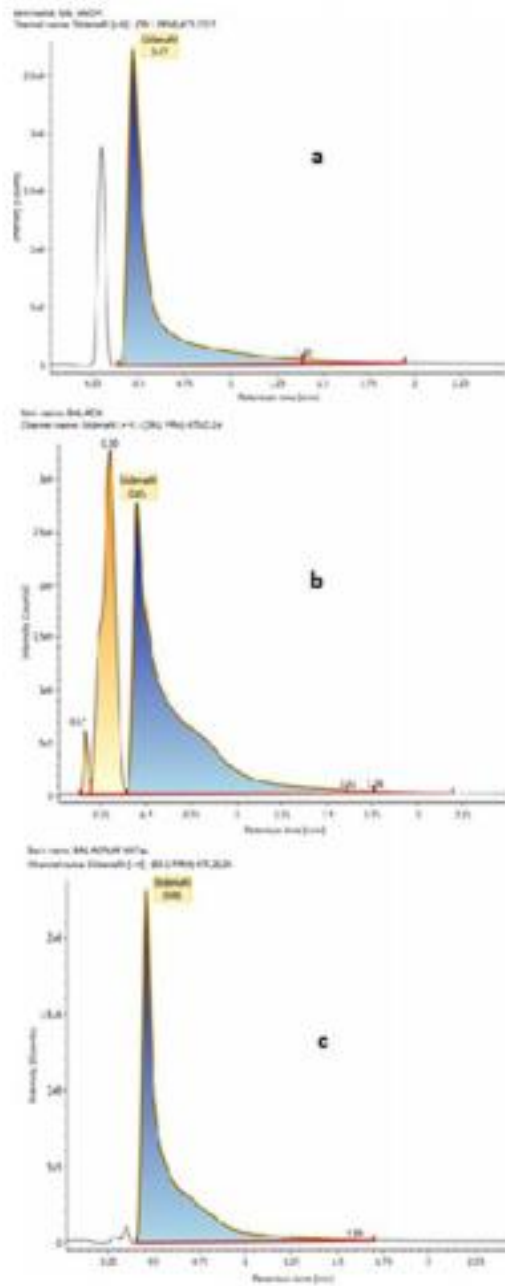


Fig. 3. Representative chromatograms of sildenafil (SIL; $m/z = 474.5$). SIR, single-ion recording; ES+, electrospray positive ion mode. Chromatograms of product (a), (b) and (c) extracts. Peaks correspond to peak of sildenafil. Chromatogram (a) sample extractant; Methanol, (b) sample extractant; Acetonitrile, (c) sample extractant; Acetonitrile/Water (50:50, v/v)

Various methods have been employed in detection of sildenafil and related compounds in various media. High performance liquid chromatography (HPLC) method is developed for the determination of the amount of sildenafil in pharmaceutical preparations and for evaluation of pharmacokinetic parameters of sildenafil. Thin layer chromatography (TLC) methods are used for the identification of sildenafil as an illegal additive in roborant soft drinks and foods (Al-Tahami, 2014).

The sample examined in the present study is a herbal honey mixture used as an immune system booster and the composition of honey is rather complicated. The presence of the active substance has been confirmed in the tested sample. In qualitative terms, there is a high incidence of adulteration of dietary supplements in the Turkish market.

The high incidence of adulteration with sildenafil is due to the fact that it is likely to be discovered first, for that matter being the cheapest in procurement. This way the manufacturer will be able to reduce the cost of the production as well as to increase profit margin (Al-Tahami, 2014).

Conclusions

The derived data confirmed that the multi-residual ultra performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC/Q-ToF) method is a fast and reliable method for the routine analysis of honey products adulterated with of PDE-5 inhibitors. The influence of different solvents and different extraction was examined, and different extraction media responded very similarly. To our knowledge, this is the first time that sildenafil illegally mixed into a herbal honey mixture has been found by ultra performance liquid chromatography-quadrupole time of flight mass spectrometry using Waters UNIFI software in Turkey.

These findings confirm the phenomenon of adulteration of food supplements in the world market, which is increasing in recent years. This represents a serious risk to public health considering that the synthetic analogues of approved PDE-5 inhibitors are often not characterized for their efficacy and toxicity, and that their mechanism of action might involve other receptors. Their presence in the market represents an important challenge for the scientific investigation and for the subsequent judicial process. Consequently, the authorities should have a programme for screening adulterants in

counterfeit herbal products, quickly spot new trends in which drugs are being counterfeited and stop distribution of fake medicines.

Acknowledgements

The authors would like to thank Novagenix Bioanalytical R&D Centre for their support of this work and for supplying the authors with reference standard.

References

- Alkharfy, K.M. (2009): Simple and sensitive LC-ESI-MS method for the quantitation of sildenafil in plasma samples. *J. Sep. Science*, 32, 3866-3870. <https://doi.org/10.1002/jssc.200900469>.
- Al-Tahami, K. (2014): Determination of sildenafil, vardenafil and tadalafil in dietary supplements sold in the Yemeni market. *Int. J. Scient. Res. (IJSR)* 3,4, 403-405. <https://doi.org/10.15373/22778179/APR2014/143>.
- Damiano, F., Silva, C., Gregori, A., Vacondio, F., Mor, M., Menozzi, M., Di Giorgio, D. (2014): Analysis of illicit dietary supplements sold in the Italian market: Identification of a sildenafil thioderivative as adulterant using UPLC-TOF/MS and GC/MS. *Sci. Justice* 54 (3), 228-237. <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2014.02.009>.
- Maryam A. (2016): Some Aspects of the Problem of Adulterated Herbal Medicines by the Illegal Addition of Active Pharmaceutical Ingredients. *J. Clin. Toxicol.* 6, e124. <https://doi.org/10.4172/2161-0495.1000e124>.
- Ortiz, R. S., de Cássia Mariotti, K., Holzschuh, M. H., Romão, W., Limberger, R. P., Mayorga, P. (2013): Profiling counterfeit Cialis, Viagra and analogs by UPLC-MS. *Forensic sci. int.* 229 (1), 13-20. <https://doi.org/10.1016/j.forensint.2013.03.024>.
- Ren, Y., Wu, C., Zhang, J. (2012): Simultaneous screening and determination of 18 illegal adulterants in herbal medicines and health foods for male sexual potency by ultra-fast liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Sep. Sci.* 35, 2847-2857. <https://doi.org/10.1002/jssc.201200780>.
- Rendell, M. S., Rajfer, J., Wicker, P. A., Smith, M. D., Sildenafil Diabetes Study Group. (1999): Sildenafil for treatment of erectile dysfunction in men with diabetes: a randomized controlled trial. *Jama*, 281 (5), 421-426. <https://doi.org/10.1001/jama.281.5.421>.
- Umrani, D.N., Ramesh, K.G. (1999): Pharmacology of sildenafil citrate. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* 43, 160-164.

Received: September 18, 2017

Accepted: October 18, 2017

MATERIALS AND METHODS

Materials: Both green coffee seeds and roasted Turkish coffee samples were obtained from a local market in Istanbul, Turkey.

In Vitro Digestion: *In vitro* digestion simulation method was performed according to the methodology, previously described by McDougal with some slight modifications [2]. *In vitro* digestion method has two steps including both gastric and intestinal phases.

Phenolic Profile: The total phenolic, flavonoid and proanthocyanin contents of both samples were measured using previously published methods [3].

Antioxidant Activity: The antioxidant capacities were evaluated by using the following methods: DPPH radical scavenging activity, CUPRAC (metal reducing activity) and total antioxidant capacity [3].

RESULTS AND DISCUSSION

Changes in the phenolic composition of coffee were observed following the *in vitro* digestion procedure on both green coffee and Turkish coffee extracts. In addition, the results of the antioxidant activity tests of Turkish and green coffee were different as well.

CONCLUSIONS

According to our study, antioxidant activity of digested Turkish and green coffee are close to each other. When we compared to undigested extraction, some differences were observed.

REFERENCES

1. Durak, A.; Gawlik-Drzki, U.; Kawiska, I. Coffee with ginger - Interactions of biologically active phytochemicals in the model system. *Food Chem*, 2015, 166, 261-269.
2. McDougal, G. J.; Fyffe, S.; Dobson, P.; Stewart, D. Anthocyanins from red wine - Their stability under simulated gastrointestinal digestion. *Phytochemistry*, 2005, 66:2540-2548.
3. Celep, E.; Aydin, A.; Kirmizibekmez, H.; Yegilada, E. Appraisal of *in vitro* and *in vivo* antioxidant potential of corallian cherry leaves. *Food Chem Toxicol*, 2013, 62, 448-455.

P-322: QUANTITATIVE ANALYSIS OF THYMOQUINONE IN NIGELLA SATIVA L. (BLACK CUMIN) SEEDS AND SEED OILS FROM LOCAL MARKETS OF TURKEY

S. İBİK¹, S. Aslan-Erdem², M. Kartal²

Ankara University, ¹Biotechnology Institute, ² Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacognosy, 06100 Tandoğan, Ankara, TURKEY

INTRODUCTION

Medicinally and economically important plant *Nigella sativa* L., popularly known as çörek otu in Turkey is grown in many parts of Turkey. The most important component of its essential oil is thymoquinone.

Thymoquinone is used in alternative medicine to treat cancer, rheumatism, headaches, and many diseases for thousands of years. In this study, 10 different seeds and seed oil samples were supplied from local markets in Ankara and their thymoquinone contents were investigated by using HPLC (High Performance Liquid Chromatography).

Medicinal plants have been a major source of therapeutic agents since ancient times to cure human diseases. *N. sativa* L., a spicy plant, is cultivated in various parts of the world. The seeds, also known as "black cumin" or "black cumin", as well as "çörek otu" in Turkey, have been used in many Middle Eastern, and Far Eastern Countries as a natural remedy for over 2000 years. In Turkey it is cultivated in Afyon, Burdur and Isparta provinces [1]. *N. sativa* is an annual plant. It grows up to 15-30 cm, is branched, more or less furry with finely divided, linear (but not thread-like) leaves. The flowers are delicate, and usually coloured white, with five petals. The seeds are three-sided and black color [1], [2]. The seeds and/or its oil is believed to be carminative, diuretic, lactagogue and vermifuge [3].

Pharmacologically, active constituents of seed oils are known as, Thymoquinone (TQ), Dithymoquinone (DTQ), Thymohydroquinone (THQ) and Thymol (THY) [4].

Black cumin seeds are used in food industry as preservative and spice.

MATERIALS AND METHODS

Samples: Samples were supplied from local markets in Ankara. Each seeds and seed oils have different brands. The seeds were coded as NS 1 to 10 and the seed oils were coded as NO 1 to 10.

Seed extraction: 5 g seeds were powdered and stirred with 200 ml methanol for 2 hours, then filtered and evaporated by using a rotary evaporator. The residue was solved gradually with methanol and completed to 50 ml with methanol.

Oil extraction: 20 µL black cumin oils were filtered from SPE C18 cartridge with 2x400µL methanol (Figure 1).



Fig. 1. Oil extraction from SPE C18 cartridge.

HPLC Conditions: Samples were analyzed with Agilent Technologies 1200 series high pressure liquid chromatography (HPLC), including a binary pump, vacuum degasser, auto-sampler, diode array detector. Column: Eclipse XDB-C18 column (150 mm x 4.6 mm, 5 μ m).

Analysis conditions was as follows: Water:Methanol:2-propanol (50:45:5) solution was used for separation at a flow rate of 0.9 mL min⁻¹. Analysis time was 28 min. and detection wavelength was set at 254 nm for thymoquinone. Injection volume was 10 μ L for each sample and standard solutions. All the calculations concerning the quantitative analysis were performed with external standardization by measurement of peak areas.

RESULTS AND DISCUSSION

Thymoquinone was observed in all samples. The amount of the thymoquinone found in the seeds and seed oils are given in Table 1 and Table 2 with both concentration and percentages, respectively.

According to the tables given below, sample NS1 has the highest and sample NS4 has the lowest percentage of thymoquinone. For oil samples; sample NO9 has the highest and sample NO4 has the lowest percentage of thymoquinone.

Table 1. Concentrations and percentages of thymoquinones in seeds:

Sample Name	Concentration (ppm)	Percentage of Thymoquinone
NS1	376.192	0,376
NS2	100.579	0,101
NS3	15.190	0,152
NS4	9.806	0,009
NS5	20.959	0,021
NS6	107.062	0,107
NS7	84.782	0,085
NS8	14.278	0,014
NS9	106.614	0,106
NS10	167.061	0,167

Table 2. Concentrations and percentages of thymoquinones in seed oils:

Sample Name	Concentration (ppm)	Percentage of Thymoquinone
NO1	84.217	0,079
NO2	126.521	0,138
NO3	96.467	0,099
NO4	18.121	0,017
NO5	236.276	0,213
NO6	177.964	0,215
NO7	69.931	0,082
NO8	35.848	0,053
NO9	175.434	0,216
NO10	51.837	0,063

CONCLUSIONS

The percentages of thymoquinone are varies for each sample. When compared, the amount of the almost equal in both seed and seed oil samples.

REFERENCES

1. Gençler-Ozkan, A.M, *Nigella arvensis* L. in FFD Monographs, Tedavide kullanılan Bitkiler, editör Demirezer, L.Ö., 2nd edition, MN Medikal & Nobel, 2011, p 423-431, Ankara
2. Davis, P.H., Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Edinburgh University Press, 1965-1985, Vol. 1-9, Edinburgh
3. Houghton, P.J., Zarka, R., Heras, B., Houti, R.S. "Fixed oil of *N. arvensis* and derived thymoquinone inhibit eicosanoid generation in leucocytes and membrane lipid peroxidation" *Planta Med.*, 1995, 61, 33-36.
4. Ghoshali, O.A, Houti, A.A. & Crooks, P.A. High performance liquid chromatography analysis of the pharmacologically active quinines and related compounds in the oil of the black seed (*Nigella arvensis*). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1999, 19, 757-762.
5. Bourgois S, Ksouri R, Bellia A, Skandrani I, Falleh H and Marzouk B. Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella arvensis* L. shoots and roots, *CR BIOC*, 2008; 331(1):48-55.