T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ZEYTİNYAĞINDAN AZELAİK ASİT ELDESİ VE GELİŞTİRİLECEK KREM FORMÜLASYONLARININ BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN *İN-VİTRO* KOŞULLARDA DEĞERLENDİRİLMESİ

SİBEL CARI

YÜKSEK LİSANS

Kimya Anabilim Dalı

EYLÜL-2020

KONYA

Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

ZEYTİNYAĞINDAN AZELAİK ASİT ELDESİ VE GELİŞTİRİLECEK KREM FORMÜLASYONLARININ BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN *İN-VİTRO* KOŞULLARDA DEĞERLENDİRİLMESİ

Sibel CARI

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Hamide Filiz AYYILDIZ
2020, 215 Sayfa

Jüri
Doç. Dr. Hamide Filiz AYYILDIZ
Prof. Dr. Hüseyin KARA
Doç. Dr. Mustafa TOPKAFA

Sağlıklı ve sürdürülebilir bir yaşamın her geçen gün daha da önem kazanmaya başladığı dünyamızda, daha sağlıklı, daha güzel ve daha uzun yaşamın simgesi olarak "İyi Yaşam" teması öne çıkmaktadır. Bu temayı sağlamaya yönelik son zamanlarda gelişen davranışlardan biri de, doğal kaynakların ve bu kaynaklardan elde edilen ürünlerin kullanımına olan ilginin artmasıdır. Doğal kaynakların/ürünlerin kullanımının ön plana çıktığı alanların başında *gıda, ilaç* ve *kozmetik* sektörleri gelmektedir.

Sunulan bu tez çalışmasında; fonksiyonel bir gıda olarak hayatımızda önemli bir yer teşkil eden zeytinyağından, birçok farmasötik ve kozmesötik etkiye sahip olduğu bilinen azelaik asidin (AA) elde edilmesi, saflaştırılması ve topikal krem formülasyonlarının geliştirilerek, antibakteriyel özelliklerinin *in-vitro* koşullarda incelenmesi amaçlanmıştır.

AA; anti-bakteriyel, anti-enflamatuar ve komedolitik özelliklere sahip bir ajan olup, akne başta olmak üzere birçok cilt probleminin tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Hiperpigmentasyon bozukluklarının (rozasea, solar lentigo ve melazma gibi) iyileştirilmesinde son derece etkin olduğu bilinen AA`nın; yara, yanık, hatta bazı kanser tümörleri üzerinde terapötik etkisinin bulunduğunu gösteren *in-vitro* ve *in-vivo* çalışmalar mevcuttur. Teratojenik, mutajenik ve toksik etkilerinin bulunmaması sebebiyle AA, benzer etkilere sahip birçok bileşiğe kıyasla daha güvenli ve tereddütsüz bir kullanıma da sahiptir.

Doymuş bir dikarboksilik asit olan AA; buğday, çavdar, arpa gibi tahıllardan ve bazı hayvansal ürünlerden doğal olarak elde edilebilmektedir. AA`nın endüstriyel skaladaki üretimi ise, oleik asidin (OA) ozonizasyonu ile sağlanmaktadır.

Sunulan tez çalışması ***(i)*** zeytinyağı numunelerinden serbest yağ asitlerinin eldesi, ***(ii)*** serbest yağ asidi karışımlarından OA eldesi ve saflaştırılması, ***(iii)*** OA`dan AA eldesi ve saflaştırılması, ***(iv)*** saflaştırılan AA bileşiklerinin antibakteriyel aktivitelerinin *in-vitro* koşullarda incelenmesi, ***(v)*** saflaştırılan AA bileşiklerinin kullanılmasıyla farklı içeriklere sahip topikal krem formülasyonlarının geliştirilmesi ve ***(vi)*** geliştirilen krem formülasyonlarının antibakteriyel aktivitelerinin in-vitro koşullarda incelenmesi olmak üzere 6 aşamada gerçekleştirilmiş olup, çalışma kapsamında elde edilen önemli sonuçları şöyle sıralamak mümkündür:

Naturel sızma ve riviera zeytinyağı numunelerinden sabunlaştırma işlemi ile elde edilen ve OA eldesinde çıkış maddesi olarak kullanılan *serbest yağ asitleri için işlem verimi % 79-86 olarak hesaplanmıştır*.

Serbest yağ asidi karışımlarından OA eldesi için, çalışma prensipleri farklı 3 metot kullanılmış olup (*düşük sıcaklıkta direk kristalizasyon, üre fraksiyonlama* ve *düşük sıcaklıkta çözücü kristalizasyonu*); bunlar arasında OA eldesi için en uygun ve verimli metodun, % 83,04 saflık dercesine ulaşılmasını sağlayan ve diğer metotlara kıyasla basit, kolay uygulanabilir ve çevre dostu (çözücülerin geri kazanılabilmesi sebebiyle) bir yöntem olan, *düşük sıcaklıkta çoklu çözücü kristalizasyonu metodu* olduğu belirlenmiştir. Deneyler sırasında elde edilen katı ve sıvı kısımlar içinde bulunan OA ve diğer temel yağ asitlerinin miktar ve saflık derecelerinin tespitinde RP-HPLC yöntemi kullanılmıştır.

Tez kapsamında elde edilen OA`dan AA eldesi için, 2 farklı metot kullanılmış olup *(ozon jeneratörü yardımıyla ozonizasyon/parçalama* ve *$H_2O_2$/bir katalizör varlığında oksidasyon/parçalama*); bunlar arasında AA eldesi için en uygun ve verimli metodun, *OA`nın H_2O_2/H_2WO_4 varlığında oksidasyonu/parçalanması* ve reaksiyon karışımı içerindeki *AA`nın X/sıcak su ile saflaştırılması* basamaklarını içeren ve yüksek bir saflık derecesi (% 83,03 - % 98,73) ve verim düzeyine (% 9,28 - % 12,50) ulaşılmasını sağlayan prosedür olduğu sonucuna varılmıştır. Deneyler sırasında elde edilen reaksiyon karışımları içerisindeki AA, OA ve pelargonik asit (PA) gibi ana türlerin miktarlarının belirlenmesinde GC-MS yönteminden faydalanılmış, elde edilen AA bileşiklerinin yapısal kimliğinin aydınlatılmasında ise, ^{1}H-NMR ve ATR-FTIR yöntemleri kullanılmıştır.

Tez kapsamında saf olarak elde edilen AA bileşiklerinin antibakteriyel aktivite tayinleri; *disk difüzyon* ve *Mikrodilüsyon Broth* yöntemlerinin kullanılması ile gerçekleştirilmiştir. D*isk difüzyon yöntemi ile antibakteriyel aktivite tayini* deneyleri sonunda; elde edilen herbir AA bileşiğinin, incelenen bakteri türlerine karşı inhibisyon bölgesi oluşturduğu ve bu etkinin cilt pH`sı aralığında daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, tez kapsamında elde edilen tüm AA türlerinin, standart AA`dan daha fazla antibakteriyel aktiviteye sahip oldukları da görülmüştür. *Mikrodilüsyon Broth yöntemi ile antibakteriyel aktivite tayini* deneyleri sonunda ise; tez kapsamında elde edilen AA bileşikleri için hesaplanan MİK değerlerinin (1000 µg/mL), standart AA için bulunan MİK değeri ile aynı olduğu görülmüş, pozitif kontrol olarak kullanılan Klaritromisin`in (CLR) MİK değeri ise; dirençli bakteriler için >128 µg/mL, duyarlı bakteriler için ise <0,25 µg/mL olarak bulunmuştur.

Tez çalışması kapsamında; etkin madde içeriği bakımından; *(i)* sadece AA içeren *(ii)* sadece salisilik asit (SA) içeren *(iii)* AA ve SA kombinasyonunu içeren formülasyonlar olmak üzere değişik şekillerde hazırlanan 6 farklı krem formülasyonu geliştirilmiştir. Hazırlanan krem formülasyonlarının organoleptik ve fiziksel/kimyasal özellikleri; oda şartlarında (25 °C ± 2 sıcaklık ve doğal oda nemi) ve stabilite dolabında (40 °C ± 5 sıcaklık, % 65 ±3 nem ve floresan ışıkta) yürütülen 3 aylık hızlandırılmış stabilite testleri ile belirlenmiş, elde edilen stabilite verilerinin kabul kriterleri ile karşılaştırılması neticesinde herbir ürün için maksimum bir raf ömrü öngörülmüştür.

Geliştirilen farklı içeriklere sahip krem formülasyonlarının d*isk difüzyon yöntemi ile antibakteriyel aktivite tayini* deneyleri sonunda*;* % 10 AA içeren krem formülasyonunun en fazla antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. *Mikrodilüsyon Broth yöntemi ile antibakteriyel aktivite tayini* deneyleri sonunda ise; sadece % 10 ve % 1 AA içeriğine sahip olan ticari krem numunelerinin 16000 µg/mL MİK değerinden düşük bir antibakteriyel aktivite değerine sahip olduğu (< 62,5 µg/mL), tez kapsamında hazırlanan diğer krem formülasyonlarına ait MİK değerlerinin ise >16000 olduğu tespit edilmiştir.

Hayatımızdaki önemli doğal kaynaklardan biri olan zeytinyağından, birçok terapötik ve fizyolojik etkiye sahip olduğu bilinen azelaik asidin eldesi ve yeni topikal krem formülasyonlarının geliştirilmesi amacıyla gerçekleştirilen bu tez çalışmasının; ilaç, kozmetik gibi sektörlerde hammadde açısından dışa bağımlı bir ülke oluşumuz göz önünde bulundurulduğunda, oldukça kıymetli bir çalışma olduğu düşünülmekte ve doğal kaynaklardan etkin madde ve/veya ürün eldesine yönelik çalışan bilim insanları ve araştırmacılar için teşvik edici ve yol gösterici olacağına inanılmaktadır.

Anahtar Kelimeler: ^{1}H-NMR, Antibakteriyel aktivite tayini, ATR-FTIR, Azelaik asit (AA), GC-MS, *İn-vitro* çalışmalar, Oksidasyon, Oleik Asit (OA), Ozonizasyon, RP-HPLC, Zeytinyağı

ABSTRACT

MS THESIS

AZELAIC ACID PRODUCTION FROM OLIVE OIL AND *IN-VITRO* EVALUATION OF THE BIOLOGICAL ACTIVITIES OF CREAM FORMULATIONS TO BE DEVELOPED

Sibel CARI

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF SELÇUK UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE CHEMISTRY

Advisor: Assoc. Prof. Hamide Filiz AYYILDIZ
2020, 215 Pages

Jury
Assoc. Prof. Hamide Filiz AYYILDIZ
Prof. Dr. Hüseyin KARA
Assoc. Prof. Mustafa TOPKAFA

In our world where a healthy and sustainable life becomes more and more important, the theme of "Good Life" stands out as the symbol of a healthier, more beautiful and longer life. One of the recent behaviors to provide this theme is the increasing interest in the use of natural resources and products obtained from these sources. Food, pharmaceutical and cosmetic sectors are among the areas where the use of natural resources / products come to the fore.

In this thesis presented; it is aimed to obtain and purify azelaic acid (AA), which is known to have many pharmaceutical and cosmeceutical effects, from olive oil, which has an important place in our lives as a functional food, and to examine its antibacterial properties *in-vitro.*

AA; It is an agent with anti-bacterial, anti-inflammatory and comedolytic properties and is widely used in the treatment of many skin problems, especially acne. AA known to be extremely effective in the treatment of hyperpigmentation disorders (such as rosacea, solar lentigo and melasma); There are *in-vitro* and *in-vivo* studies showing that it has a therapeutic effect on wounds, burns and even some cancer tumors. Due to its lack of teratogenic, mutagenic and toxic effects, AA has a safer and unwavering use compared to many compounds with similar effects.

AA, a saturated dicarboxylic acid; It can be obtained naturally from grains such as wheat, rye, barley and some animal products. The production of AA in industrial scale is provided by the ozonization of oleic acid (OA).

The presented thesis study (i) obtaining free fatty acids from olive oil samples, (ii) obtaining and purifying OA from free fatty acid mixtures, (iii) obtaining and purifying AA from OA, (iv) investigating the antibacterial activities of the purified AA compounds *in-vitro*, (v) The development of cream formulations with different contents by using purified AA compounds, and (vi) the *in-vitro* examination of the antibacterial activities of the cream formulations developed, and the important results obtained within the scope of the study can be listed as follows:

The processing efficiency for free fatty acids obtained by saponification process from natural extra virgin and riviera olive oil samples and used as starting material in OA production was calculated as 79-86%.

In order to obtain OA from free fatty acid mixtures, 3 methods with different operating principles have been used (direct crystallization at low temperature, urea fractionation and solvent crystallization at low temperature); Among these, it has been determined that the most suitable and efficient method for obtaining OA is the low temperature multi-solvent crystallization method, which provides a purity level of 83.04% and is a simple, easily applicable and environmentally friendly method (due to the ability to recover solvents) compared to other methods. RP-HPLC method was used to determine the amount and purity levels of OA and other essential fatty acids in the solid and liquid parts obtained during the experiments.

Two different methods have been used to obtain AA from the OA obtained within the scope of the thesis (ozonization / decomposition with the help of an ozone generator and H2O2 / oxidation / disintegration in the presence of a catalyst); Among these, the most suitable and efficient method for AA recovery includes oxidation / decomposition of OA in the presence of H2O2 / H2WO4 and purification of AA in the reaction mixture with X/hot water and a high purity (83.03% - 98%, 73) and the efficiency level (9.28% - 12.50%). GC-MS method was used to determine the amounts of main species such as AA, OA and pelargonic acid (PA) in the reaction mixtures obtained during the experiments, and 1H-NMR and ATR-FTIR methods were used to clarify the structural identity of the AA compounds.

Antibacterial activity determinations of pure AA compounds within the scope of the thesis; Disk diffusion and Microdilution Broth methods were used. At the end of antibacterial activity determination experiments by disk diffusion method; It was determined that each AA compound obtained formed an inhibition zone against the bacterial species examined and this effect was higher in the skin pH range. In addition, it has been observed that all AA species obtained within the scope of the thesis have higher antibacterial activity than standard AA. At the end of antibacterial activity determination experiments with Microdilution Broth method; The MIC values (1000 µg / mL) calculated for the AA compounds obtained within the scope of the thesis were found to be the same as the MIC values found for the standard AA, and the MIC value of Clarithromycin (CLR) used as positive control; It was found to be> 128 µg / mL for resistant bacteria and <0.25 µg / mL for sensitive bacteria.

Within the scope of thesis work; In terms of active substance content; Six different cream formulations prepared in different ways were developed: (i) formulations containing only AA (ii) containing only salicylic acid (SA) (iii) containing a combination of AA and SA. Organoleptic and physical / chemical properties of cream formulations prepared; Determined by 3-month accelerated stability tests conducted in room conditions (25 ° C ± 2 temperature and natural room humidity) and stability cabinet (at 40 ° C ± 5 temperature, 65% ± 3 humidity and fluorescent light), with the acceptance criteria of the stability data obtained. As a result of the comparison, a maximum shelf life is predicted for each product.

At the end of the antibacterial activity determination experiments of the cream formulations with different contents developed by the disk diffusion method; It was observed that the cream formulation containing 10% AA had the highest antibacterial activity. At the end of antibacterial activity determination experiments with Microdilution Broth method; It was determined that commercial cream samples with only 10% and 1% AA content had an antibacterial activity value lower than 16000 µg / mL MIC value (<62.5 µg / mL), and MIC values of other cream formulations prepared within the scope of the thesis were> 16000. has been.

This thesis study, which was carried out with the aim of obtaining azelaic acid, which is known to have many therapeutic and physiological effects from olive oil, which is one of the important natural resources in our lives, and the development of new topical cream formulations; when thinking the fact that we are a foreign-dependent country in terms of raw materials in sectors such as pharmaceuticals and cosmetics, it is a precious study and is believed to be an encouraging and guiding for scientists and researchers working on obtaining active ingredients and products from natural resources.

Keywords: ^{1}H-NMR, Antibacterial activity determination, ATR-FTIR, Azelaic acid (AA), GC-MS, *In-vitro* studies, Oleic Acid (OA), Olive Oil, Oxidation, Ozonization, RP-HPLC

ÖNSÖZ

Bu çalışma, Selçuk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Temel Bilimler Bölümü öğretim üyelerinden Doç. Dr. H.Filiz AYYILDIZ danışmanlığında tamamlanarak, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü`ne Yüksek Lisans tezi olarak sunulmuş ve S.Ü. BAP tarafından 19201046 nolu proje ile desteklenmiştir.

Lisansüstü çalışmalarım süresince bilimsel katkıları ve yardımları ile beni destekleyen ayrıca bu tez projesinin konu seçiminde, hazırlanmasında ve araştırmaların yürütülmesinde her türlü bilgi, tecrübe ve öngörüleriyle bana yol gösteren kıymetli danışman hocam Doç. Dr. H.Filiz AYYILDIZ'a sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarım boyunca ilgi ve desteğini gördüğüm Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyelerinden Sayın Prof. Dr. Hüseyin KARA hocama teşekkürü bir borç bilirim.

Tez süresince organik sentezler konusunda bilgi ve tecrübesiyle destekte bulunan Öğr. Gör. Dr. Fatih ÖZCAN'a ve *in-vitro* koşullarda biyolojik aktivite tayinlerinin gerçekleştirilmesi konusunda yardımlarını esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Fatih SEVGİ ve yüksek lisans öğrencisi Ayşe KAYAN`a minnetlerimi sunarım.

Geliştirilen krem formülasyonlarının organoleptik ve fiziksel/kimyasal özelliklerinin belirlenmesi için gerekli stabilite testlerinin gerçekleştirilmesinde yardımcı olan Dağlar Kozmetik Ürünleri İmalat ve Gıda Sanayi Ticaret A.Ş. Üretim Müdürü Muhammet SARIBEL`e teşekkür ederim.

Ayrıca, deneysel çalışmalarım boyunca manevi desteklerinin yanı sıra, bilgi ve tecrübeleriyle de bana destek olan, çalışma grubumuzun değerli üyelerinden Arş. Gör. Aslan TAŞ, doktora öğrencisi Huriye ÇAKIR TAŞ, Arş. Gör. M. Raşit BAKIR, doktora öğrencisi Oktay KALKAN ve yüksek lisans öğrencisi Ebru GÜLER`e teşekkür ederim.

Ve son olarak çalışmalarım boyunca maddi ve manevi desteklerini benden hiçbir zaman esirgemeyen, beni bugünlere getiren sevgili annem Vesile CARI, babam Halil İbrahim CARI ve ağabeyim Murat CARI 'ya da minnettar olduğumu belirtir, en derin saygı ve şükranlarımı sunarım.

Bu tezi canımdan çok sevdiğim aileme atfediyorum…

Sibel CARI

KONYA-2020

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iv**

ABSTRACT ..... **vi**

ÖNSÖZ ..... **viii**

İÇİNDEKİLER ..... **ix**

ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **xiii**

TABLOLAR DİZİNİ ..... **xviii**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **xviii**

1. GİRİŞ **1**

1.1. Zeytinyağı **3**

1.1.2. Zeytinyağının bileşenleri 5

1.1.2.1. Majör bileşenler 6

1.1.2.2. Minör bileşenler 7

1.1.3. Zeytinyağında kalite kontrol kriterleri 10

1.1.3.1. Kaliteyi belirten parametreler 10

1.1.3.2. Saflığını belirten parametreleri 11

1.1.4. Zeytinyağı kalite kontrol analizlerinde kullanılan metotlar 13

1.1.5. Zeytinyağındaki biyoaktif bileşenler ve sağlık üzerindeki etkileri 14

1.2. Oleik Asit (OA) **14**

1.2.1. OA`nın yapısı, fiziksel ve kimyasal özellikleri 15

1.2.2. OA kaynakları ve OA miktarını etkileyen faktörler 15

1.2.3. OA`nın kullanım alanları 16

1.2.4. OA`nın Kimyasal Reaksiyonları 17

1.2.4.1 Esterleşme 17

1.2.4.2. Tuz oluşturma 17

1.2.4.3. Çift bağların hidrojenlenmesi (hidrojenizasyon) 17

1.2.4.4. Halojenlenme 18

1.2.4.5. Oksitlenme 18

1.3. Azelaik Asit (AA) **19**

1.3.1. AA`nın yapısı, fiziksel ve kimyasal özellikleri 19

1.3.2. AA kaynakları ve elde edilme yöntemleri 19

1.3.3. AA uygulama alanları 21

1.3.4. AA`nın farmakolojik özellikleri 22

1.3.5. AA`nın farmakodinamik özellikleri 22

1.3.6. AA`nın farmakokinetik özellikleri 23

1.3.7. AA`nın yan etkileri 24

1.3.8. AA`ya alternatif tedavi ajanları/yöntemleri 25

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI **26**

2.1. OA Eldesi ile İlgili Çalışmalar **26**

2.2. AA Eldesi ile İlgili Çalışmalar **30**

3. MATERYAL VE YÖNTEM 36

3.1. Kullanılan Kimyasallar 36

3.2. Kullanılan Cihazlar, Kolonlar ve Diğer Ekipmanlar 37

3.3. Biyolojik Çalışmada Kullanılan Materyaller 38

3.4. Kullanılan Yağlar 38

3.5. Zeytinyağı Numuneleri Üzerinde Gerçekleştirilen Fizikokimyasal Analizler 39

3.5.1. Serbest yağ asidi (% FFA) tayini 39

3.5.2. Peroksit sayısı (PV) tayini 39

3.5.3. İyot sayısı (IV) tayini 40

3.5.4. Sabunlaşma sayısı (SV) tayini 41

3.5.5. Yağ asit kompozisyonu tayini 41

3.5.5.1. Yağ asitlerinin Metanol/KOH ile metil esterlerine (FAME) dönüştürülmesi 41

3.5.5.2. GC-FID yöntemi ile FAME tayini 42

3.6. Zeytinyağı Numunelerinden Serbest Yağ Asitlerinin Eldesi 42

3.7. Serbest Yağ Asidi Karışımından Oleik Asit (OA) Eldesi ve Saflaştırılması 44

3.7.1. Düşük sıcaklıkta direk kristalizasyon metodu (DSDKM) 44

3.7.2. Üre fraksiyonlama metodu (ÜFM) 45

3.7.3. Düşük sıcaklıkta çözücü kristalizasyonu metodu (DSÇKM) 46

3.7.3.1. Çapraz çözücü kristalizasyonu metodu 46

3.7.3.2. Çoklu çözücü kristalizasyon metodu 47

3.8. OA Miktarının ve Saflığının HPLC Yöntemi ile Belirlenmesi 48

3.9. OA`den AA Eldesi, Saflaştırılması ve *İn-Vitro* Koşullarda Gerçekleştirilen Çalışmalar 48

3.9.1. OA`nın V_2O_5 katalizörü varlığında ozon jeneratörü ile ozonilasyonu 49

3.9.1.1. Ozonizasyondan elde edilen AA'nın fraksiyonlu distilasyon yöntemi ile saflaştırılması 50

3.9.1.2. Ozonizasyon karışımındaki yağ asitlerinin Metanol/BF_3 ile metil esterlerine (FAME) dönüştürülmesi 50

3.9.1.3. Ozonizasyon karışımındaki AA`nın GC-MS yöntemi ile tayini 51

3.9.2. OA`nın H_2O_2/WO_3 varlığında oksidasyonu/parçalanması 52

3.9.2.1. H_2O_2/WO_3 kullanılarak elde edilen AA'nın EtOAc/sıcak su ile saflaştırılması 52

3.9.2.2. EtOAc kullanılarak saflaştırılan AA`nın NMR yöntemi ile karakterizasyonu 54

3.9.3. OA`nın H_2O_2/H_2WO_4 varlığında oksidasyonu/parçalanması 54

3.9.3.1. H_2O_2/H_2WO_4 kullanılarak elde edilen AA'nın $CHCl_3$/sıcak su ile saflaştırılması 55

3.9.3.1.1. $CHCl_3$ kullanılarak saflaştırılan AA`nın GC-MS yöntemi ile tayini 56

3.9.3.1.2. $CHCl_3$ kullanılarak saflaştırılan AA`nın NMR yöntemi ile karakterizasyonu 56

3.9.3.1.3. $CHCl_3$ kullanılarak saflaştırılan AA`nın FT-IR yöntemi ile karakterizasyonu 56

3.9.3.2. H_2O_2/H_2WO_4 kullanılarak elde edilen AA'nın X/sıcak su ile (patentlendirilecek metoda ait çözücü) saflaştırılması 56

3.9.3.2.1. X/sıcak su (patentlendirilecek metoda ait çözücü) kullanılarak saflaştırılan AA`nın GC-MS yöntemi ile tayini 57

3.9.3.2.2. X/sıcak su (patentlendirilecek metoda ait çözücü) kullanılarak saflaştırılan AA`nın NMR yöntemi ile karakterizasyonu 57

3.9.3.2.3. X/sıcak su (patentlendirilecek metoda ait çözücü) kullanılarak saflaştırılan AA`nın FT-IR yöntemi ile karakterizasyonu 58

3.9.4. X/sıcak su (patentlendirilecek metoda ait çözücü) kullanılarak saflaştırılan AA`nın *in-vitro* koşullarda incelenmesi 58

3.9.4.1. AA`nın disk difüzyon yöntemi ile antibakteriyel aktivite tayini 58

3.9.4.2. AA`nın Mikrodilüsyon Broth yöntemi ile antibakteriyel aktivite tayini 59

3.10. AA İçeren Farklı Topikal krem Formülasyonlarının Geliştirilmesi..... 62
3.10.1. Geliştirilen topikal krem formülasyonlarının organoleptik ve fiziksel/kimyasal özellikleri..... 63
3.10.2. Geliştirilen topikal krem formülasyonlarının in-vitro koşullarda incelenmesi..... 63
3.10.2.1. Krem formülasyonlarının disk difüzyon yöntemi ile antibakteriyel aktivite tayini..63
3.10.2.2. Krem formülasyonlarının mikrodilüsyon broth yöntemi ile antibakteriyel aktivite tayini..... 63

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA..... 64

4.1. Zeytinyağı Numuneleri Üzerinde Gerçekleştirilen Fizikokimyasal Analizler..... 64
4.1.1. Serbest yağ asidi (%FFA) tayini..... 64
4.1.2. Peroksit sayısı (PV) tayini..... 64
4.1.3. İyot sayısı (IV) tayini..... 65
4.1.4. Sabunlaşma sayısı (SV) tayini..... 65
4.1.5. GC-FID ile yağ asit kompozisyonu tayini..... 65

4.2. Zeytinyağı Numunelerinden Sabunlaştırma Yöntemi ile Serbest Yağ Asitlerinin Eldesi..... 66
4.2.1. Sabunlaştırma İşleminin Verimi..... 66
4.2.2. Serbest Yağ Asidi Miktarlarının RP-HPLC Yöntemi ile Belirlenmesi..... 66

4.3. Serbest Yağ Asidi Karışımından Farklı Metotlarla OA Eldesi ve Saflaştırılması..... 69
4.3.1. Düşük sıcaklıkta direkt kristalizasyon metodu (DSDKM) ile OA eldesi..... 70
4.3.2. Üre fraksiyonlama metodu (ÜFM) ile OA eldesi..... 74
4.3.3. Düşük sıcaklıkta çözücü kristalizasyonu metodu (DSÇKM) ile OA eldesi..... 80
4.3.3.1. Çapraz çözücü kristalizasyonu metodu ile OA eldesi..... 80

4.4. OA`dan AA Eldesi, Saflaştırılması ve *İn-Vitro* Koşullarda İncelenmesi..... 97
4.4.1. Standart OA, AA ve PA için gerçekleştirilen karakterizasyon çalışmaları..... 97
4.4.1.1. Standart AA`nın Farklı Çözücüler İçindeki Çözünürlüğünün Belirlenmesi..... 97
4.4.1.2. Standart OA, AA ve PA`nın ^{1}H-NMR yöntemi ile karakterizasyonu..... 99
4.4.1.3. Standart AO, AA ve PA`nın FT-IR yöntemi ile karakterizasyonu..... 101
4.4.2. OA`nın V_2O_5 katalizörü varlığında ozon jeneratörü ile ozonilasyonu/parçalanması..... 104
4.4.2.1. Ozonizasyon/parçalama karışımındaki AA`nın GC-MS yöntemi ile tayini..... 105
4.4.2.2. Ozonizasyon/parçalama işleminden elde edilen AA'nın fraksiyonlu distilasyon yöntemi ile saflaştırılması..... 109
4.4.3. OA`nın H_2O_2/WO_3 varlığında oksidasyonu/parçalanması..... 109
4.4.3.1. H_2O_2/WO_3 kullanılarak elde edilen AA'nın EtOAc/sıcak su ile saflaştırılma verimi..... 110
4.4.3.2. EtOAc kullanılarak saflaştırılan AA`nın NMR yöntemi ile karakterizasyonu..... 111
4.4.4. OA`nın H_2O_2/H_2WO_4 varlığında oksidasyonu/parçalanması..... 112
4.4.4.1. H_2O_2/H_2WO_4 kullanılarak elde edilen AA'nın $CHCl_3$/sıcak su ile saflaştırılma verimi 115
4.4.4.1.1. $CHCl_3$ kullanılarak saflaştırılan AA`nın NMR yöntemi ile karakterizasyonu . 119
4.4.4.1.2. $CHCl_3$ kullanılarak saflaştırılan AA`nın FT-IR yöntemi ile karakterizasyonu 120
4.4.4.2. H_2O_2/H_2WO_4 kullanılarak elde edilen AA'nın X/sıcak su (patentlendirilecek metoda ait çözücü) ile saflaştırılma verimi..... 122
4.4.4.2.1. X/sıcak su kullanılarak saflaştırılan AA`nın NMR yöntemi ile karakterizasyonu.. 128
4.4.4.2.2. X/sıcak su (patentlendirilecek metoda ait çözücü) kullanılarak saflaştırılan AA`nın FT-IR yöntemi ile karakterizasyonu..... 130
4.4.5. X/sıcak su (patentlendirilecek metoda ait çözücü) kullanılarak saflaştırılan AA`nın *in-vitro* koşullarda incelenmesi..... 132
4.4.5.1. AA`nın Disk difüzyon yöntemi ile antibakteriyel aktivite tayini..... 132
4.4.5.2. AA`nın Mikrodilüsyon Broth yöntemi ile antibakteriyel aktivite tayini..... 138

4.4.6. Geliştirilen topikal krem formülasyonlarının organoleptik ve fiziksel/kimyasal özelliklerinin incelenmesi 142
4.4.7. Geliştirilen topikal krem formülasyonlarının *in-vitro* koşullarda incelenmesi 148
4.4.7.1. Krem formülasyonlarının disk difüzyon yöntemi ile antibakteriyel aktivite tayini .. 148
4.4.7.2. Krem formülasyonlarının mikrodilüsyon broth yöntemi ile antibakteriyel aktivite tayini 152

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 157

5.1. Sonuçlar 157

5.2. Öneriler 165

EKLER 167

EK-1 167

EK-2 170

KAYNAKLAR 167

ÖZGEÇMİŞ 175

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Zeytinyağındaki Majör ve Minör Bileşenler 5
Şekil 1.2. E Vitamini (α-tokoferol) 8
Şekil 1.3. Kolesterol Molekülünün Yapısı 9
Şekil 1.4. Skualen Yapısı 9
Şekil 1.5. OA`nın Kimyasal Yapısı 15
Şekil 1.6. OA`nın Esteleşme Reaksiyonu 17
Şekil 1.7. OA`nın Pt/ Ni/ Cu Katalizörlüğünde Yapısına Hidrojen Katılması Reaksiyonu 18
Şekil 1.8. OA`nın Bir Halojen İle Doyurulma Reaksiyonu 18
Şekil 1.9. OA`nın Kuvvetli Oksidanlar İle Parçalanma Reaksiyonu 18
Şekil 1.10. AA`nın Kimyasal Yapısı 19
Şekil 3.1. Zeytinyağı Numunelerinden Serbest Yağ Asitlerinin Elde Edilmesinde Yer Alan Basamaklar (a) Sabunlaştırma Basamağı, (b) Sabunlaşan Kısmın Su Fazına Alınması, (c) Hekzan İlavesi ile Sabunlaşan ve Sabunlaşmayan Kısımların Birbirinden Ayrılması, (d) HCl İlavesi ile Yağ Asitlerinin Serbest Hale Geçirilmesi, (e) Serbest Yağ Asitlerinin Hekzan ile Ekstraksiyonu, (f) Hekzan Fazının Su ile Yıkanarak (2 Kez) Daha Saf Hale Getirilmesi, (g) Susuz Na_2SO_4 İle Serbest Yağ Asitleri İçindeki Nemin Uzaklaştırılması, (h) Serbest Yağ Asitleri İçerisinde Bulunan Çözücünün (Hekzan) Evaporatörde Uzaklaştırılması 43
Şekil 3.2. Düşük Sıcaklıkta Direk Kristalizasyon Metodu ile OA Eldesi (a) 1. Kristalizasyon İşleminden Elde Edilen Katı ve Sıvı Kısmın Birbirinden Ayrılması, (b) 1. Kristalizasyon İşlemin Sonunda den Elde Edilen Doymuş ve Tekli Doymamış Yağ Asitleri (Katı) ile Çoklu Doymamış Yağ Asitlerinin (Sıvı) Görünümü 44
Şekil 3.3. Üre Fraksiyonlama Metodu ile OA Eldesi (a) Üre Fraksiyonlama İşleminde Kullanılan Malzemeler, (b) Ürenin ~75 °C`de Metanol İçerisinde Çözülmesi, (c) Üre-Metanol Karışımına Serbest Yağ Asitlerinin Kısımlar Halinde Eklenmesi, (d) Gerekli Kimyasal İlavelerinden Sonra Oluşan Su ve Hekzan Fazının Birbirinden Ayrılması 45
Şekil 3.4. Çapraz Çözücü Kristalizasyonu Metodu ile OA Eldesi (a) Metanol Sonrası Kristalizasyon İşleminden Elde Edilen Kristallerin Görünümü, (b) Aseton Sonrası Kristalizaasyon İşleminden Elde Edilen Kristallerin Görünümü 46
Şekil 3.5. Aseton Kullanılarak Gerçekleştirilen Çoklu Çözücü Kristalizasyonu Metodu ile OA Eldesi (a) Oluşan Kristallerin Süzülmesi İşlemi, (b) Çözücü İlavesinden Sonra Kristallenmeye Bırakılan Karışımlar, (b) Kristalizasyon İşlemi sonunda Elde Edilen Kristaller 48
Şekil 3.6. Ozonizasyon Yöntemi ile OA`den AA Eldesi 49
Şekil 3.7. Ozonizasyon İşleminden Elde Edilen Kompleks Karışımdan AA`nın Fraksiyonlu Distilasyon Yöntemi ile Saflaştırılması 50
Şekil 3.8. AA İçeren Karışımlara GC-MS Analizi Öncesi Uygulanan Metanol/BF_3 ile Metil Esterlerine (FAME) Dönüştürme Prosedürü 51
Şekil 3.9. H_2O_2/WO_3 Kullanılarak Elde Edilen AA'nın EtOAc/Sıcak Su İle Saflaştırılması İşleminden Elde Edilen Kristallerin Görünümü 54
Şekil 3.10. OA H_2O_2/H_2WO_4 Varlığında Oksidasyonu/Parçalanması ile AA Eldesi (a) Katalizör Olarak Kullanılan H_2WO_4`ün %35`lik H_2O_2 İçerisinde Çözülmesi, (b) H_2O_2/H_2WO_4/OA İçeren Reaksiyon Karışımının Görünümü 55
Şekil 3.11. AA`nın Mikrodilüsyon Broth Yöntemi ile Antibakteriyel Aktivite Tayininde Kullanılan (a) Mikroplaka Okuyucu, (b) Otomatik Dispenser 61
Şekil 3.12. Tez Kapsamında Elde Edilen AA`nın Kullanılmasıyla Geliştirilen Farklı Krem Formülasyonlarının Görünümü 63
Şekil 4.1. Standart Oleik Aside Ait RP-HPLC Kromatogramı 67
Şekil 4.2. *A Naturel Sızma* Zeytinyağı Numunesinden Elde Edilen Serbest Yağ Asitlerine Ait RP-HPLC Kromatogramı 68
Şekil 4.3. *B Naturel Sızma* Zeytinyağı Numunesinden Elde Edilen Serbest Yağ Asitlerine Ait RP-HPLC Kromatogramı 68

Şekil 4.4. *C Riviera* Zeytinyağı Numunesinden Elde Edilen Serbest Yağ Asitlerine Ait RP-HPLC Kromatogramı 69
Şekil 4.5. DSDKM ile OA Eldesinde Kullanılan *C Riviera* Zeytinyağı Numunesinden Elde Edilmiş Serbest Yağ Asitlerine Ait RP-HPLC Kromatogramı 71
Şekil 4.6. DSDKM Yöntemi ile OA Eldesinde 1. Kristalizasyon İşlemi Sonunda Elde Edilen Katı Kısma Ait RP-HPLC Kromatogramı (*C Riviera* zeytinyağı numunesinden elde edilen serbest yağ asitleri kullanılmıştır) 71
Şekil 4.7. DSDKM Yöntemi ile OA Eldesinde 1. Kristalizasyon İşlemi Sonunda Elde Edilen Sıvı Kısma Ait RP-HPLC Kromatogramı (*C Riviera* zeytinyağı numunesinden elde edilen serbest yağ asitleri kullanılmıştır) 72
Şekil 4.8. ÜFM Yöntemi ile OA Eldesinde 1. Fraksiyonlama İşlemi Sonunda Elde Edilen Katı Kısma Ait RP-HPLC Kromatogramı (*C Riviera* zeytinyağı numunesinden elde edilen serbest yağ asitleri kullanılmıştır) 75
Şekil 4.9. ÜFM Yöntemi ile OA Eldesinde 1. Fraksiyonlama İşlemi Sonunda Elde Edilen Katı Kısmın Hekzan ile Etkileştirilmesi Sonrası Elde Edilen Ürüne Ait RP-HPLC Kromatogramı 76
Şekil 4.10. ÜFM Yöntemi ile OA Eldesinde 1. Fraksiyonlama İşlemi Sonunda Elde Edilen Sıvı Kısma Ait RP-HPLC Kromatogramı (*C Riviera* zeytinyağı numunesinden elde edilen serbest yağ asitleri kullanılmıştır) 77
Şekil 4.11. Çapraz Çözücü Kristalizasyonu Metodu ile OA Eldesinde, Aseton İlavesi Sonrası Gerçekleştirilen Kristallendirme İşleminden Elde Edilen Katı Kısma Ait RP-HPLC Kromatogramı (*C Riviera* zeytinyağı numunesinden elde edilen serbest yağ asitleri kullanılmıştır) 81
Şekil 4.12. Çapraz Çözücü Kristalizasyonu Metodu ile OA Eldesinde, Aseton İlavesi Sonrası Gerçekleştirilen Kristallendirme İşleminden Elde Edilen Sıvı Kısma Ait RP-HPLC Kromatogramı (*C Riviera* zeytinyağı numunesinden elde edilen serbest yağ asitleri kullanılmıştır) 81
Şekil 4.13. Çapraz Çözücü Kristalizasyonu Metodu ile OA Eldesinde, Aseton ile 1. Kristallendirme Basamağından Elde Edilen Katı Kısım Üzerine Metanol İlave Edilmesi Sonrası Gerçekleştirilen 2. Kristallendirme İşleminden Elde Edilen Katı Kısma Ait RP-HPLC Kromatogramı 82
Şekil 4.14. Çapraz Çözücü Kristalizasyonu Metodu ile OA Eldesinde, Aseton ile 1. Kristallendirme basamağından elde edilen katı kısım üzerine Metanol İlave Edilmesi Sonrası Gerçekleştirilen 2. Kristallendirme İşleminden Elde Edilen Sıvı Kısma Ait RP-HPLC Kromatogramı 83
Şekil 4.15. Çapraz Çözücü Kristalizasyonu Metodu ile OA Eldesinde, Metanol İlavesi Sonrası Gerçekleştirilen Kristallendirme İşleminden Elde Edilen Katı Kısma Ait RP-HPLC Kromatogramı (*C Riviera* zeytinyağı numunesinden elde edilen serbest yağ asitleri kullanılmıştır) 86
Şekil 4.16. Çapraz Çözücü Kristalizasyonu Metodu ile OA Eldesinde, Metanol İlavesi Sonrası Gerçekleştirilen Kristallendirme İşleminden Elde Edilen Sıvı Kısma Ait RP-HPLC Kromatogramı (*C Riviera* zeytinyağı numunesinden elde edilen serbest yağ asitleri kullanılmıştır) 87
Şekil 4.17. Çapraz Çözücü Kristalizasyonu Metodu ile OA Eldesinde, Metanol ile 1. Kristallendirme Basamağından Elde Edilen Katı Kısım Üzerine Aseton İlave Edilmesi Sonrası Gerçekleştirilen 2. Kristallendirme İşleminden Elde Edilen Katı Kısma Ait RP-HPLC Kromatogramı 88
Şekil 4.18. Çapraz Çözücü Kristalizasyonu Metodu ile OA Eldesinde, Metanol ile 1. Kristallendirme Basamağından Elde Edilen Katı Kısım Üzerine Aseton İlave Edilmesi Sonrası Gerçekleştirilen 2. Kristallendirme İşleminden Elde Edilen Sıvı Kısma Ait RP-HPLC Kromatogramı 88
Şekil 4.19. Çoklu DSÇKM ile OA Eldesinde Kullanılan *C Riviera* Zeytinyağı Numunesinden Elde Edilmiş Serbest Yağ Asitlerine Ait RP-HPLC Kromatogramı 91
Şekil 4.20. Çoklu Çözücü Kristalizasyonu Metodu ile OA Eldesinde, Aseton İlavesi Sonrası Gerçekleştirilen 1. Kristallendirme İşleminden Elde Edilen Katı Kısma Ait RP-HPLC Kromatogramı 92

Şekil 4.21. Çoklu Çözücü Kristalizasyonu Metodu ile OA Eldesinde, 1. Kristalizasyondan Elde Edilen Katı Üzerine Aseton İlavesi Sonrası Gerçekleştirilen 2. Kristallendirme İşleminden Elde Edilen Katı Kısma Ait RP-HPLC Kromatogramı 92
Şekil 4.22. Çoklu Çözücü Kristalizasyonu Metodu ile OA Eldesinde, 2. Kristalizasyondan Elde Edilen Katı Üzerine Aseton İlavesi Sonrası Gerçekleştirilen 3. Kristallendirme İşleminden Elde Edilen Katı Kısma Ait RP-HPLC Kromatogramı 93
Şekil 4.23. Çoklu Çözücü Kristalizasyonu Metodu ile OA Eldesinde, 3. Kristalizasyondan Elde Edilen Katı Üzerine Aseton İlavesi Sonrası Gerçekleştirilen 4. Kristallendirme İşleminden Elde Edilen Katı Kısma Ait RP-HPLC Kromatogramı (7 pik dikkate alınmıştır) 94
Şekil 4.24. Çoklu Çözücü Kristalizasyonu Metodu ile OA Eldesinde, 3. Kristalizasyondan Elde Edilen Katı Üzerine Aseton İlavesi Sonrası Gerçekleştirilen 4. Kristallendirme İşleminden Elde Edilen Katı Kısma Ait RP-HPLC Kromatogramı (4 temel pik dikkate alınmıştır) 95
Şekil 4.25. Standart AA`nın *Eter* İçindeki Çözünürlük Testi Sonunda Elde Edilen GC-MS Kromatogramı 98
Şekil 4.26. Standart AA`nın *Hekzan* İçindeki Çözünürlük Testi Sonunda Elde Edilen GC-MS kromatogramı 98
Şekil 4.27. Standart AA`nın *Kloroform* İçindeki Çözünürlük Testi Sonunda Elde Edilen GC-MS Kromatogramı 98
Şekil 4.28. Standart AA`ya Ait ^{1}H-NMR Spektrumu 99
Şekil 4.29. Standart PA`ya Ait ^{1}H-NMR Spektrumu 100
Şekil 4.30. Standart OA`ya Ait ^{1}H-NMR Spektrumu 101
Şekil 4.31. Standart AA İçin ATR Tekniği Kullanılarak Elde Edilmiş FT-IR Spektrumu 102
Şekil 4.32. Standart PA İçin ATR Tekniği Kullanılarak Elde Edilmiş FT-IR Spektrumu 103
Şekil 4.33. Standart OA İçin ATR Tekniği Kullanılarak Elde Edilmiş FT-IR Spektrumu 103
Şekil 4.34. OA Bir Katalizör Varlığında Ozonilasyonu Sonucu Parçalanması ve Açığa Çıkan Ürünler (Pfrang ve ark., 2014) 104
Şekil 4.35. Ozonilasyon/Parçalama Deneylerinde Kullanılan OA Ait GC-MS Kromatogramı 105
Şekil 4.36. % 5`lik Saf AA`nın Metanoldeki Çözeltisine Ait GC-MS Kromatogramı 106
Şekil 4.37. Ozonilasyon/Parçalama Deneylerinden Alınan Reaksiyon Karışımlarındaki AA Miktarının GC-MS Yöntemi ile Tespiti için Kullanılan Kalibrasyon Grafiği (R^2= 0,9985) 106
Şekil 4.38. 10 Saatlik Ozonizasyon/Parçalama İşlemi Sonucu Elde Edilen Reaksiyon Karışımına Ait GC-MS Kromatogramı 107
Şekil 4.39. 24 Saatlik Ozonizasyon/Parçalama İşlemi Sonucu Elde Edilen Reaksiyon Karışımına Ait GC-MS Kromatogramı 107
Şekil 4.40. 36 Saatlik Ozonizasyon/Parçalama İşlemi Sonucu Elde Edilen Reaksiyon Karışımına Ait GC-MS Kromatogramı 107
Şekil 4.41. 10, 24 ve 36 Saatlik Ozonizasyon/Parçalama İşlemi Sonucu Elde Edilen Reaksiyon Karışımlarına Ait GC-MS Kromatogramlarında AA Piklerinin Üst Üste Görünüşü 108
Şekil 4.42. OA Bir Katalizör ve Bir Yükseltgen Varlığında Parçalanması Sonucu Açığa Çıkan Ürünler (Benessere ve ark., 2015) 110
Şekil 4.43. OA`nın H_2O_2/WO_3 Varlığında Oksidasyonu/Parçalanması (asit ilaveli) Deneyinden Elde Edilen Katı Maddeye Ait ^{1}H-NMR Spektrumu. ^{1}H-NMR (400 MHz DMSO) 111
Şekil 4.44. Standart OA`nın (% 90,85) H_2O_2/H_2WO_4 Varlığında Oksidasyonu/Parçalanması Sonucu Elde Edilen Kompleks Karışımına Ait GC-MS Kromatogramı (daha sonra $CHCl_3$-sıcak su ile saflaştırılan karışım) 112
Şekil 4.45. Tez Kapsamında Elde Edilen OA`nın (% 68,02) H_2O_2/H_2WO_4 Varlığında Oksidasyonu/Parçalanması Sonucu Elde Edilen Kompleks Karışımına Ait GC-MS Kromatogramı (daha sonra X/sıcak su ile saflaştırılan karışım) 113

Şekil 4.46. OA (% 90,85) H_2O_2/H_2WO_4 Varlığında Oksidasyonu/Parçalanması İşleminde Sıcak Su İlavesi Sonrası Elde Edilen Karışımın Süzülmesi ile Süzgeç Kağıdında Kalan Yağlı Kısma Ait GC-MS Kromatogramı ($CHCl_3$ ve sıcak su ile saflaştırma prosedürünün uygulandığı deney) 115
Şekil 4.47. OA (% 90,85) H_2O_2/H_2WO_4 Varlığında Oksidasyonu/Parçalanması İşleminde Elde Edilen Yağlı Kısmın Sıcak Su ile Yıkanması Sonrası Elde Edilen Katı Kalıntıya Ait GC-MS Kromatogramı ($CHCl_3$ ve sıcak su ile saflaştırma prosedürünün uygulandığı deney) 116
Şekil 4.48. OA`nın (% 90,85) H_2O_2/H_2WO_4 Varlığında Oksidasyonu/Parçalanması İşleminde $CHCl_3$ ile Ekstraksiyon İşlemi Sonrası Ayrılan Su Fazından Elde Edilen Beyaz Renkli Kristallere (1. Kademe AA) Ait GC-MS Kromatogramı 117
Şekil 4.49. OA`nın (% 90,85) H_2O_2/H_2WO_4 Varlığında Oksidasyonu/Parçalanması İşleminde $CHCl_3$ ile Ekstraksiyon İşlemi Sonrası Ayrılan $Chcl_3$ Fazından Elde Edilen Beyaz Renkli Kristallere (2. kademe AA) Ait GC-MS Kromatogramı 118
Şekil 4.50. OA`nın H_2O_2/H_2WO_4 Varlığında Oksidasyonu/Parçalanması ve $CHCl_3$ ve Sıcak Su İle Saflaştırılması Prosedüründen Elde Edilen Katı Maddeye Ait ^{1}H-NMR Spektrumu. 120
Şekil 4.51. OA H_2O_2/H_2WO_4 Varlığında Oksidasyonu/Parçalanması ve $CHCl_3$ ve Sıcak Su ile Saflaştırılması Prosedüründen Elde Edilen Katı Maddeye Ait FT-IR Spektrumu 121
Şekil 4.52. OA`nın $H_2O_2/H_2WO_4$ Varlığında Oksidasyonu/Parçalanması ve $CHCl_3$ ve Sıcak Su ile Saflaştırılması Prosedüründen Elde Edilen Katı Madde ve Standart AA`ya ait FT-IR Spektrumlarının Karşılaştırılması 121
Şekil 4.53. OA (% 68,02) H_2O_2/H_2WO_4 Varlığında Oksidasyonu/Parçalanması İşleminde Sıcak Su İlavesi Sonrası Elde Edilen Karışımın Süzülmesi ile Süzgeç Kağıdında Kalan Yağlı Kısma Ait GC-MS Kromatogramı (X/sıcak su ile saflaştırma prosedürünün uygulandığı deney) 123
Şekil 4.54. OA (% 68,02) H_2O_2/H_2WO_4 Varlığında Oksidasyonu/Parçalanması İşleminde Elde Edilen Yağlı Kısmın Sıcak Su ile Yıkanması Sonrası Elde Edilen Süzüntü Kısmına Ait GC-MS Kromatogramı (X/sıcak su ile saflaştırma prosedürünün uygulandığı deney) 124
Şekil 4.55. OA`nın (% 68,02) H_2O_2/H_2WO_4 Varlığında Oksidasyonu/Parçalanması İşleminde X ile Ekstraksiyon İşlemi Sonrası Ayrılan Su Fazından Elde Edilen Beyaz Renkli Kristallere Ait GC-MS Kromatogramı (X/sıcak su ile saflaştırma prosedürünün uygulandığı deney-1) 125
Şekil 4.56. OA`nın (% 68,02) H_2O_2/H_2WO_4 Varlığında Oksidasyonu/Parçalanması İşleminde X ile Ekstraksiyon İşlemi Sonrası Ayrılan Su Fazından Elde Edilen Beyaz Renkli Kristallere Ait GC-MS Kromatogramı (X/sıcak su ile saflaştırma prosedürünün uygulandığı deney-2) 126
Şekil 4.57. OA`nın (% 63,50) H_2O_2/H_2WO_4 Varlığında Oksidasyonu/Parçalanması İşleminde X ile Ekstraksiyon İşlemi Sonrası Ayrılan Su Fazından Elde Edilen Beyaz Renkli Kristallere Ait GC-MS Kromatogramı (X/sıcak su ile saflaştırma prosedürünün uygulandığı deney-3) 127
Şekil 4.58. OA`nın (% 68,02) H_2O_2/H_2WO_4 Varlığında Oksidasyonu/Parçalanması ve X/sıcak Su İle Saflaştırılması Prosedüründen Elde Edilen Katı Maddeye Ait ^{1}H-NMR Spektrumu. 128
Şekil 4.59. OA`nın (% 68,02) H_2O_2/H_2WO_4 Varlığında Oksidasyonu/Parçalanması ve X/Sıcak Su İle Saflaştırılması Prosedüründen Elde Edilen Katı Maddeye Ait ^{1}H-NMR Spektrumu *(2. tekrar deney)*. 129
Şekil 4.60. OA`nın (% 63,50) H_2O_2/H_2WO_4 Varlığında Oksidasyonu/Parçalanması ve X/Sıcak Su İle Saflaştırılması Prosedüründen Elde Edilen Katı Maddeye Ait ^{1}H-NMR Spektrumu *(3. tekrar deney)*. 130
Şekil 4.61. OA`nın (% 68,02) H_2O_2/H_2WO_4 Varlığında Oksidasyonu/Parçalanması ve X/Sıcak Su ile Saflaştırılması Prosedüründen Elde Edilen Katı Maddeye Ait FT-IR Spektrumu. 131

Şekil 4.62. OA`nın $H_2O_2/H_2WO_4$ Varlığında Oksidasyonu/Parçalanması ve X/Sıcak Su ile Saflaştırılması Prosedürünü İçeren 3 Tekrarlı Deneylerden Elde Edilen Katı Maddelere ve Standart AA`Ya Ait FT-IR Spektrumlarının Karşılaştırılması 131
Şekil 4.63. Elde Edilen AA Bileşikleri için *Staphylococcus Aureus* ATCC 25923 Bakterisi ile Disk Difüzyon Yöntemi Kullanılarak Elde Edilen İnhibisyon Zonlarının Görünümü (Soldaki besiyeri pH: 7,3 - sağdaki besiyeripH: 5,6`dır) 133
Şekil 4.64. Elde Edilen AA Bileşikleri için MRSA *Staphylococcus Aureus* ATCC 43300 Bakterisi ile Disk Difüzyon Yöntemi Kullanılarak Elde Edilen İnhibisyon Zonlarının Görünümü (Soldaki besiyeri pH: 7,3 - sağdaki besiyeripH: 5,6`dır) 134
Şekil 4.65. Elde Edilen AA Bileşikleri için *Staphylococcus Epidermidis* ATTC 35984 Bakterisi ile Disk Difüzyon Yöntemi Kullanılarak Elde Edilen İnhibisyon Zonlarının Görünümü (Soldaki besiyeri pH: 7,3 - sağdaki besiyeripH: 5,6`dır) 134
Şekil 4.66. Elde Edilen AA Bileşikleri için *Staphylococcus Epidermidis* ATTC 12228 Bakterisi ile Disk Difüzyon Yöntemi Kullanılarak Elde Edilen İnhibisyon Zonlarının Görünümü (Soldaki besiyeri pH: 7,3 - sağdaki besiyeripH: 5,6`dır) 134
Şekil 4.67. Disk Difüzyon Yöntemi ile Antibakteriyel Aktivitesi İncelenen Maddeler İçin Belirlenen İnhibisyon Bölgelerine Ait Çap Değerlerinin Çubuk Grafik İle Gösterim. 136
Şekil 4.68. Elde Edilen AA Bileşikleri İçin *Staphylococcus Aureus* ATCC 25923 Bakterisinin (a) 24 Saat İnkübasyon Sonrasındaki Görüntüsü b) TTC ile Boyanma Sonrası Görüntüsü 139
Şekil 4.69. D ve E Kodlu Bileşiklerin *Staphylococcus Aureus* ATCC 25923 Bakterisi İçin MİK Değerlerinin Belirlenmesinde Kullanılan Optik Yoğunluk (OD)-Konsantrasyon (µg/mL) Grafikleri 140
Şekil 4.70. Elde Edilen AA Bileşikleri için MRSA ATCC 43300 Bakterisinin (a) 24 Saat İnkübasyon Sonrasındaki Görüntüsü (b) TTC ile Boyanma Sonrası Görüntüsü 140
Şekil 4.71. Elde Edilen AA Bileşikleri İçin *Staphylococcus Epidermidis* ATTC 35984 Bakterisinin (a) 24 Saat İnkübasyon Sonrasındaki Görüntüsü (b) TTC ile Boyanma Sonrası Görüntüsü 141
Şekil 4.72. Elde Edilen AA Bileşikleri İçin *Staphylococcus Epidermidis* ATTC 12228 Bakterisinin (a) 24 Saat İnkübasyon Sonrasındaki Görüntüsü (b) TTC ile Boyanma Sonrası Görüntüsü 141
Şekil 4.73. Geliştirilen Krem Formülasyonları İçin *Staphylococcus Aureus* ATCC 25923 Bakterisi ile Disk Difüzyon Yöntemi Kullanılarak Elde Edilen İnhibisyon Zonlarının Görünümü (Soldaki besiyeri pH: 7,3 - sağdaki besiyeri pH: 5,6`dır) 149
Şekil 4.74. Geliştirilen Krem Formülasyonları İçin *MRSA ATCC 43300* Bakterisi ile Disk Difüzyon Yöntemi Kullanılarak Elde Edilen İnhibisyon Zonlarının Görünümü (Soldaki besiyeri pH: 7,3 - sağdaki besiyeripH: 5,6`dır) 149
Şekil 4.75. Geliştirilen Krem Formülasyonları İçin *Staphylococcus Epidermidis ATTC 35984* Bakterisi ile Disk Difüzyon Yöntemi Kullanılarak Elde Edilen İnhibisyon Zonlarının Görünümü (Soldaki besiyeri pH: 7,3 - sağdaki besiyeripH: 5,6`dır) 150
Şekil 4.76. Geliştirilen Krem Formülasyonları İçin *Staphylococcus Epidermidis ATTC 12228* Bakterisi ile Disk Difüzyon Yöntemi Kullanılarak Elde Edilen İnhibisyon Zonlarının Görünümü (Soldaki besiyeri pH: 7,3 - sağdaki besiyeripH: 5,6`dır) 150
Şekil 4.77. Geliştirilen Krem Formülasyonları İçin *Staphylococcus Aureus* ATCC 25923 Bakterisine Ait (a) 24 Saat İnkübasyon Sonrası (b) TTC ile Boyanma Sonrası Mikroplaka Görüntüleri 153
Şekil 4.78. Geliştirilen Krem Formülasyonları İçin MRSA ATCC 43300 Bakterisine Ait a) 24 Saat İnkübasyon Sonrası b) TTC ile Boyanma Sonrası Mikroplaka Görüntüleri 154
Şekil 4.79. Geliştirilen Krem Formülasyonları İçin *Staphylococcus Epidermidis* ATTC 35984 Bakterisine Ait (a) 24 Saat İnkübasyon Sonrası (b) TTC ile Boyanma Sonrası Mikroplaka Görüntüleri 154
Şekil 4.80. Geliştirilen Krem Formülasyonları İçin *Staphylococcus Epidermidis* ATTC 12228 Bakterisine Ait (a) 24 Saat İnkübasyon Sonrası (b) TTC ile Boyanma Sonrası Mikroplaka Görüntüleri 155

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1.1. Zeytinyağı İçerisinde Bulunan Triaçilgliserollerin % Miktarları (Boskou ve ark., 2006) 6
Tablo 1.2. Zeytinyağı Kalite ve Saflığı Belirleyen Parametreler ve Parametreleri Değerlendirmede Kullanılan Standart Metotlar 13
Tablo 1.3. Zeytinyağı İçerisinde Bulunan Biyoaktif Bileşiklerin Sağlık Üzerine Etkileri 14
Tablo 3.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasallar 36
Tablo 3.2. Deneylerde Kullanılan Cihazlar 37
Tablo 3.3. *İn-Vitro* Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar ve Besiyerleri 38
Tablo 3.4. GC-FID yöntemi ile Yağ Asit Kompozisyonu Analizi için Metot Parametreleri 42
Tablo 3.5. Zeytinyağı Numunelerinden Elde Edilen Serbest Yağ Asidi Karışımlarının RP-HPLC ile Analizi için Metot Parametreleri 48
Tablo 3.6. AA içeren Karışımların GC-MS Yöntemi ile Analizi için Metot Parametreleri 51
Tablo 3.7. Krem Formülasyonlarının Geliştirilmesinde Kullanılan Etkin ve Yardımcı Maddelerin Miktarları (% w/w) 62
Tablo 4.1. Deneylerde Kulalnılan Zeytinyağı Numunelerinin % FFA Miktarları 64
Tablo 4.2. Deneylerde Kulalnılan Zeytinyağı Numunelerinin PV Miktarları (mg O_2/kg yağ) 64
Tablo 4.3. Zeytinyağı Numunelerinin IV Miktarları (g I_2/100 g yağ) 65
Tablo 4.4. Zeytinyağı Numunelerinin SV Miktarları (mg KOH/kg yağ) 65
Tablo 4.5. Çalışmada Kullanılan Zeytinyağları İçin HKARA Metodu ile Gerçekleştirilen Yağ Asit Kompozisyonu Çalışmalarından Elde Edilen Yağ Asit Dağılımları (%) 66
Tablo 4.6. Zeytinyağı Numunelerinden Elde Edilen Serbest Yağ Asidi Karışımlarındaki Yağ Asidi Türleri için RP-HPLC Yöntemi ile Belirlenen Alıkonma Zamanları 67
Tablo 4.7. Standart OA`nın Ait RP-HPLC Kromatogramı Verileri 67
Tablo 4.8. *A Naturel Sızma* Zeytinyağı Numunesinden Elde Edilen Serbest Yağ Asitlerine Ait RP-HPLC Kromatogram Verileri 68
Tablo 4.9. *B Naturel Sızma* Zeytinyağı Numunesinden Elde Edilen Serbest Yağ Asitlerine Ait RP-HPLC Kromatogram Verileri 68
Tablo 4.10. *C Naturel Sızma* Zeytinyağı Numunesinden Elde Edilen Serbest Yağ Asitlerine Ait RP-HPLC Kromatogram Verileri 69
Tablo 4.11. DSDKM ile OA Eldesinde Kullanılan *C Riviera* Zeytinyağı Numunesinden Elde Edilmiş Serbest Yağ Asitlerine Ait RP-HPLC Kromatogramı Verileri 71
Tablo 4.12. DSKM Yöntemi ile OA Eldesinde 1. Kristalizasyon İşlemi Sonunda Elde Edilen Katı Kısma Ait RP-HPLC Kromatogramı Verileri 71
Tablo 4.13. DSDKM Yöntemi ile OA Eldesinde 1. Kristalizasyon İşlemi Sonunda Elde Edilen Sıvı Kısma Ait RP-HPLC Kromatogramı Verileri 72
Tablo 4.14. *A Naturel Sızma*, *B Naturel Sızma* ve *C Riviera* Zeytinyağı Numunelerinden Elde Edilen Serbest Yağ Asidi Karışımlarından DSDKM Yöntemi ile OA Eldesi için Toplu RP-HPLC Analiz Sonuçları 73
Tablo 4.15. ÜFM Yöntemi ile OA Eldesinde 1. Fraksiyonlama İşlemi Sonunda Elde Edilen Katı Kısma Ait RP-HPLC Kromatogramı Verileri 75
Tablo 4.16. ÜFM Yöntemi ile OA Eldesinde 1. Fraksiyonlama İşlemi Sonunda Elde Edilen Katı Kısmın Hekzan ile Etkileştitilmesi Sonrası Elde Edilen Ürüne Ait RP-HPLC Kromatogramı Verileri 76
Tablo 4.17. ÜFM Yöntemi ile OA Eldesinde 1. Fraksiyonlama İşlemi Sonunda Elde Edilen Sıvı Kısma Ait RP-HPLC Kromatogramı Verileri 77
Tablo 4.18. *A Naturel Sızma*, *B Naturel Sızma* ve *C Riviera* Zeytinyağı Numunelerinden Elde Edilen Serbest Yağ Asidi Karışımlarından ÜFM Yöntemi ile OA Eldesi için Toplu RP-HPLC Analiz Sonuçları 79
Tablo 4.19. Çapraz Çözücü Kristalizasyonu Metodu ile OA Eldesinde, Aseton İlavesi Sonrası Gerçekleştirilen Kristallendirme İşleminden Elde Edilen Katı Kısma Ait RP-HPLC Kromatogramı Verileri 81
Tablo 4.20. Çapraz Çözücü Kristalizasyonu Metodu ile OA Eldesinde, Aseton İlavesi Sonrası Gerçekleştirilen Kristallendirme İşleminden Elde Edilen Sıvı Kısma Ait RP-HPLC Kromatogramı Verileri 81

Tablo 4.21. Çapraz Çözücü Kristalizasyonu Metodu ile OA Eldesinde, Aseton ile 1. Kristallendirme Basamağından Elde Edilen Katı Kısım Üzerine Metanol İlave Edilmesi Sonrası Gerçekleştirilen 2. Kristallendirme İşleminden Elde Edilen Katı Kısma Ait RP-HPLC Kromatogramı Verileri 83
Tablo 4.22. Çapraz Çözücü Kristalizasyonu Metodu ile OA Eldesinde, Aseton ile 1. Kristallendirme basamağından elde edilen katı kısım üzerine Metanol İlave Edilmesi Sonrası Gerçekleştirilen 2. Kristallendirme İşleminden Elde Edilen Sıvı Kısma Ait RP-HPLC Kromatogramı Verileri 83
Tablo 4.23. *A Naturel Sızma*, *B Naturel Sızma* ve *C Riviera* Zeytinyağı Numunelerinden Elde Edilen Serbest Yağ Asidi Karışımlarından Çapraz Çözücü Kristalizasyonu Metodu ile (Aseton Sonrası Metanol) OA Eldesi için Toplu RP-HPLC Analiz Sonuçları 85
Tablo 4.24. Çapraz Çözücü Kristalizasyonu Metodu ile OA Eldesinde, Metanol İlavesi Sonrası Gerçekleştirilen Kristallendirme İşleminden Elde Edilen Katı Kısma Ait RP-HPLC Kromatogramı Verileri 86
Tablo 4.25. Çapraz Çözücü Kristalizasyonu Metodu ile OA Eldesinde, Metanol İlavesi Sonrası Gerçekleştirilen Kristallendirme İşleminden Elde Edilen Sıvı Kısma Ait RP-HPLC Kromatogramı Verileri 87
Tablo 4.26. Çapraz Çözücü Kristalizasyonu Metodu ile OA Eldesinde, Metanol ile 1. Kristallendirme Basamağından Elde Edilen Katı Kısım Üzerine Aseton İlave Edilmesi Sonrası Gerçekleştirilen 2. Kristallendirme İşleminden Elde Edilen Katı Kısma Ait RP-HPLC Kromatogramı Verileri 88
Tablo 4.27. Çapraz Çözücü Kristalizasyonu Metodu ile OA Eldesinde, Metanol ile 1. Kristallendirme basamağından elde edilen katı kısım üzerine Aseton İlave Edilmesi Sonrası Gerçekleştirilen 2. Kristallendirme İşleminden Elde Edilen Sıvı Kısma Ait RP-HPLC Kromatogramı Verileri 89
Tablo 4.28. *A Naturel Sızma*, *B Naturel Sızma* ve *C Riviera* Zeytinyağı Numunelerinden Elde Edilen Serbest Yağ Asidi Karışımlarından Çapraz Çözücü Kristalizasyonu Metodu ile (Metanol Sonrası Aseton) OA Eldesi için Toplu RP-HPLC Analiz Sonuçları 90
Tablo 4.29. Çoklu DSÇKM ile OA Eldesinde Kullanılan *C Riviera* Zeytinyağı Numunesinden Elde Edilmiş Serbest Yağ Asitlerine Ait RP-HPLC Kromatogramı Verileri 91
Tablo 4.30. Çoklu Çözücü Kristalizasyonu Metodu ile OA Eldesinde, Aseton İlavesi Sonrası Gerçekleştirilen 1. Kristallendirme İşleminden Elde Edilen Katı Kısma Ait RP-HPLC Kromatogramı Verileri 92
Tablo 4.31. Çoklu Çözücü Kristalizasyonu Metodu ile OA Eldesinde, 1. Kristalizasyondan Elde Edilen Katı Üzerine Aseton İlavesi Sonrası Gerçekleştirilen 2. Kristallendirme İşleminden Elde Edilen Katı Kısma Ait RP-HPLC Kromatogramı Verileri 93
Tablo 4.32. Çoklu Çözücü Kristalizasyonu Metodu ile OA Eldesinde, 2. Kristalizasyondan Elde Edilen Katı Üzerine Aseton İlavesi Sonrası Gerçekleştirilen 3. Kristallendirme İşleminden Elde Edilen Katı Kısma Ait RP-HPLC Kromatogramı Verileri 93
Tablo 4.33. Çoklu Çözücü Kristalizasyonu Metodu ile OA Eldesinde, 3. Kristalizasyondan Elde Edilen Katı Üzerine Aseton İlavesi Sonrası Gerçekleştirilen 4. Kristallendirme İşleminden Elde Edilen Katı Kısma Ait RP-HPLC Kromatogramı Verileri (7 pik dikkate alınmıştır) 94
Tablo 4.34. Çoklu Çözücü Kristalizasyonu Metodu ile OA Eldesinde, 3. Kristalizasyondan Elde Edilen Katı Üzerine Aseton İlavesi Sonrası Gerçekleştirilen 4. Kristallendirme İşleminden Elde Edilen Katı Kısma Ait RP-HPLC Kromatogramı Verileri (4 temel pik dikkate alınmıştır) 95
Tablo 4.35. *A Naturel Sızma*, *B Naturel Sızma* ve *C Riviera* Zeytinyağı Numunelerinden Elde Edilen Serbest Yağ Asidi Karışımlarından Çoklu Çözücü Kristalizasyonu Metodu ile (Aseton) OA Eldesi için Toplu RP-HPLC Analiz Sonuçları 96
Tablo 4.36. Ozonilasyon/Parçalama Deneylerinde Kullanılan OA Ait GC-MS Kromatogramı Verileri 106
Tablo 4.37. OA`nın Ozonizasyonu/Parçalanması İşlemi Sırasında 10, 24 ve 36. Saatlerde Alınan Numuneler için Elde Edilen GC-MS Analizi Verileri 108
Tablo 4.38. Standart OA`nın (% 90,85) H_2O_2/H2WO_4 Varlığında Oksidasyonu/Parçalanması Sonucu Elde Edilen Kompleks Karışımına Ait GC-MS kromatogramı Verileri 113

Tablo 4.39. Tez Kapsamında Elde Edilen OA`nın (% 68,02) H_2O_2/H_2WO_4 Varlığında Oksidasyonu/Parçalanması Sonucu Elde Edilen Kompleks Karışımına Ait GC-MS Kromatogramı Verileri 113
Tablo 4.40. OA (% 90,85) H_2O_2/H_2WO_4 Varlığında Oksidasyonu/Parçalanması İşleminde Sıcak Su İlavesi Sonrası Elde Edilen Karışımın Süzülmesi ile Süzgeç Kağıdında Kalan Yağlı Kısma Ait GC-MS Kromatogram Verileri 115
Tablo 4.41. OA (% 90,85) H_2O_2/H_2WO_4 Varlığında Oksidasyonu/Parçalanması İşleminde Elde Edilen Yağlı Kısmın Sıcak Su ile Yıkanması Sonrası Elde Edilen Katı Kalıntıya Ait GC-MS Kromatogram Verileri 116
Tablo 4.42. OA`nın (% 90,85) H_2O_2/H_2WO_4 Varlığında Oksidasyonu/Parçalanması İşleminde $CHCl_3$ ile Ekstraksiyon İşlemi Sonrası Ayrılan Su Fazından Elde Edilen Beyaz Renkli Kristallere (1. Kademe AA) Ait GC-MS Kromatogram Verileri 117
Tablo 4.43. OA`nın (% 90,85) H_2O_2/H_2WO_4 Varlığında Oksidasyonu/Parçalanması İşleminde $CHCl_3$ ile Ekstraksiyon İşlemi Sonrası Ayrılan $CHCl_3$ Fazından Elde Edilen Beyaz Renkli Kristallere (2. kademe AA) Ait GC-MS Kromatogram Verileri 118
Tablo 4.44. OA (% 68,02) H_2O_2/H_2WO_4 Varlığında Oksidasyonu/Parçalanması İşleminde Sıcak Su İlavesi Sonrası Elde Edilen Karışımın Süzülmesi ile Süzgeç Kağıdında Kalan Yağlı Kısma Ait GC-MS Kromatogram Verileri (X/sıcak su ile saflaştırma prosedürünün uygulandığı deney) 123
Tablo 4.45. OA`nın (% 68,02) H_2O_2/H_2WO_4 Varlığında Oksidasyonu/Parçalanması İşleminde Elde Edilen Yağlı Kısmın Sıcak Su ile Yıkanması Sonrası Elde Edilen Süzüntü Kısmına Ait GC-MS Kromatogram Verileri (X/sıcak su ile saflaştırma prosedürünün uygulandığı deney) 124
Tablo 4.46. OA`nın (% 68,02) H_2O_2/H_2WO_4 Varlığında Oksidasyonu/Parçalanması İşleminde X ile Ekstraksiyon İşlemi Sonrası Ayrılan Su Fazından Elde Edilen Beyaz Renkli Kristallere Ait GC-MS Kromatogram Verileri (X/sıcak su ile saflaştırma prosedürünün uygulandığı deney-1) 125
Tablo 4.47. OA`nın (% 68,02) H_2O_2/H_2WO_4 Varlığında Oksidasyonu/Parçalanması İşleminde X ile Ekstraksiyon İşlemi Sonrası Ayrılan Su Fazından Elde Edilen Beyaz Renkli Kristallere Ait GC-MS Kromatogram Verileri (X ve sıcak su ile saflaştırma prosedürünün uygulandığı deney-2) 126
Tablo 4.48. OA`nın (% 63,50) H_2O_2/H_2WO_4 Varlığında Oksidasyonu/Parçalanması İşleminde X ile Ekstraksiyon İşlemi Sonrası Ayrılan Su Fazından Elde Edilen Beyaz Renkli Kristallere Ait GC-MS Kromatogram Verileri (X/sıcak su ile saflaştırma prosedürünün uygulandığı deney-3) 127
Tablo 4.49. Elde Edilen AA Bileşikleri için Disk Difüzyon Yöntemi ile Antibakteriyel Aktivitesi İncelenen Maddeler İçin Belirlenen İnhibisyon Bölgelerine Ait Çap Değerleri 136
Tablo 4.50. Elde Edilen AA Bileşikleri İçin Mikrodilüsyon Broth Yöntemi ile Antibakteriyel Aktivitesi İncelenen Maddeler İçin Belirlenen MİK Değerleri (µg/mL) 142
Tablo 4.51. % 0,5 AA İçeren Krem Formülasyonu için Oda Şartlarında (25 °C ± 2) 0. Hafta Gerçekleştirilen Stabilite Testlerine Ait Sonuçlar ve Kabul Kriterleri 143
Tablo 4.52. % 0,5 AA İçeren Krem Formülasyonu için Oda Şartlarında (25 °C ± 2) 12 Hafta Boyunca Gerçekleştirilen Hızlandırılmış Stabilite Testlerine Ait Sonuçlar 144
Tablo 4.53. % 0,5 AA İçeren Krem Formülasyonu için Stabilite Kabininde (40 °C ± 5 sıcaklık, % 65 ±3 nem ve floresan ışıkta) 0. Hafta Gerçekleştirilen Stabilite Testlerine Ait Sonuçlar ve Kabul Kriterleri 144
Tablo 4.54. % 0,5 AA İçeren Krem Formülasyonu için Stabilite Kabininde (40 °C ± 5 sıcaklık, % 65 ±3 nem ve floresan ışıkta) 12 Hafta Boyunca Gerçekleştirilen Hızlandırılmış Stabilite Testlerine Ait Sonuçlar 145
Tablo 4.55. % 0,5 AA İçeren Krem Formülasyonu için Hızlandırılmış Stabilite Testi Sonuçları ve Ürün Spesifikasyonunu Gösteren Kabul Kriterleri 145
Tablo 4.56. Geliştirilen Krem Formülasyonları İçin Disk Difüzyon Yöntemi ile Antibakteriyel Aktivitesi İncelenen Maddeler İçin Belirlenen İnhibisyon Bölgelerine Ait Çap Değerleri 151
Tablo 4.57. Geliştirilen Krem Formülasyonları İçin Mikrodilüsyon Broth Yöntemi ile Antibakteriyel Aktivitesi İncelenen Krem Formülasyonları İçin Belirlenen MİK Değerleri (µg/mL) 155

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

- **α** : Alfa
- **β** : Beta
- **γ** : Gama
- **δ** : Sigma
- **ώ** : Omega
- **N** : Normalite
- **M** : Molarite
- **%** : Yüzde
- **dk** : Dakika
- **g** : Gram
- **mL** : Mililitre
- **µL** : Mikrolitre
- **°C** : Santigrat derece

Kısaltmalar

- **AA** : Azelaik asit
- **ACN** : Asetonitril
- **AOAC** : The Association of Official Analytical Chemists
- **ATCC** : Amerikan tipi kültür koleksiyonu
- **DAD** : Diyod array dedektör
- **DMSO** : Dimetilsülfoksit
- **DSA:** : Dihidrosistearik asit
- **DSÇKM** : Düşük sıcaklıkta çözücü kristalizasyonu metodu
- **DSDKM** : Düşük sıcaklıkta direk kristalizasyon metodu
- **FAME** : Yağ asidi metil esterleri
- **FFA** : Serbest yağ asidi
- **FTIR** : Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi
- **GC** : Gaz kromatografisi
- **GC-FID** : Gaz kromatografisi-Alev iyonlaşmalı dedektör
- **GC-MS** : Gaz kromatografisi-Kütle spektrometresi
- **HPLC** : Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
- **IV** : İyot sayısı
- **LLL** : Linoleik-Linoleik-Linoleik

- **OLnL** : Oleik- Linolenik-Linoleik
- **LOL** : Linolenik- Oleik- Linolenik
- **OLnO** : Oleik- Linolenik-Oleik
- **OOL** : Oleik-Oleik-Linoleik
- **OOO** : Oleik-Oleik-Oleik
- **MHA** : Mueller Hinton Agar
- **MHB** : Mueller Hinton Broth
- **MİK** : Minimum İnhibitör Konsantrasyonu
- **MRSA** : Metisilene Dirençli Staphylococcus aureus ATCC 43300
- **MS** : Kütle Spektrofotometresi
- **N** : Normalite
- **NMR** : Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
- **OA** : Oleik asit
- **PA** : Pelargonik asit
- **PLL** : Palmitik-Linoleik-Linoleik
- **PLnO** : Palmitik-Linolenik-Oleik
- **POL** : Palmitik-Oleik-Linoleik
- **POO** : Palmitik-Oleik-Oleik
- **POP** : Palmitik-Oleik-Palmitik
- **POS** : Palmitik-Oleik-Stearik
- **PV** : Peroksit sayısı
- **SA** : Salisilik asit
- **S.a** : Staphylococcus aureus ATCC 25923
- **S.e** : Staphylococcus epidermidis ATCC 35984
- **S.e*** : Staphylococcus epidermidis ATCC 12228
- **SOO** : Stearik-Oleik-Oleik
- **SV** : Sabunlaşma sayısı
- **TAG** : Triaçilgliserol
- **TTC** : 2,3,5 Triphenly-tetrazolium chloride
- **ÜFM** : Üre fraksiyonlama metodu

1. GİRİŞ

Sağlıklı ve sürdürülebilir bir yaşamın her geçen gün daha da önem kazanmaya başladığı dünyamızda, daha sağlıklı, daha güzel ve daha uzun yaşamın simgesi olarak "İyi Yaşam" teması öne çıkmaktadır (Keykubat, 2016). Son zamanlarda, bu temayı sağlamaya yönelik gelişen davranışlardan biri de, doğal kaynakların ve bu kaynaklardan elde edilen ürünlerin kullanımına yönelik ilginin artmasıdır. Doğal kaynakların/ürünlerin kullanımının ön plana çıktığı alanların başında gıda, ilaç ve kozmetik gelmektedir (Faydaoğlu, 2011).

Doğal kaynaklar; genel olarak bitkiler, hayvanlar, insanlar, mikroorganizmalar, inorganik maddeler ve mineraller olmak üzere gruplandırılmaktadırlar. Bunlar arasında en yaygın kullanım alanına sahip olan ise, beslenme ihtiyacını karşılamasının yanı sıra; ilaç, kimya, kozmetik ve zirai mücadele sektörlerinde etkinlik gösteren önemli kimyasal bileşenlere sahip olan bitkilerdir (Gölükcü ve ark., 2012).

Bitkilerin insanlar tarafından gıda kaynağı ve hastalıkları iyileştirme gibi farklı amaçlarla kullanımları insanlık tarihi kadar eski olup, buna dair izler binlerce yıl öncesine ait kalıntılar ile de kanıtlanmış durumdadır (Koçyiğit, 2005; Gezgin, 2007). Günümüzde ise, özellikle sağlık alanında kullanılan bitki sayısındaki artış kayda değer ölçüdedir. Örneğin; ilaç sektöründe sentetik ilaçlar büyük bir paya sahip olmasına rağmen, ilaç üretiminde öncül hammadde olarak kullanılan pek çok bileşiğin bitkilerden elde edildiği bilinmekte ve şu anda reçete ile satılan ilaçların % 25'lik bir kısmını bitkiler ve bitkisel ilaç hammaddelerinden elde edilen ilaçlar oluşturmaktadır (Tınmaz, 2013).

Ülkemiz geniş yüz ölçümü, coğrafi konumu, iklimi, bitki çeşitliliği ve tarımsal potansiyeli sayesinde tıbbi ve aromatik bitki ticaretinde önde gelen ülkelerden biridir (Sağında, 2014). Şöyle ki; gelişmiş ülkelerdeki bitkisel ilaç, gıda ve kozmetik sektörlerinin hammaddesini oluşturan bitkilerin çoğu, 1/3'lük endemik tür içeriği ile 10.000 civarında bitki türü zenginliğine sahip olan Ülkemiz florasından sağlanmaktadır (Yücer, 2012; Tınmaz, 2013). Bu sebeple, Ülkemizin tıbbi ve aromatik bitki ticareti yönünden ne kadar önemli bir konumda olduğu dikkate alınarak, söz konusu bitkilerin katma değeri yüksek ürüne dönüştürülmesi noktasında dinamik ve sistematik bir yaklaşım sergilenmelidir.

Ülkemizde bulunan bitkiler arasında tür ve içerik bakımından oldukça değerli bileşenler içeren, gıda, ilaç ve kozmetik başta olmak üzere birçok alanda kullanılan bitkilerden biri de, Oleaceae (Zeytingiller) familyasının bir üyesi olan ve **"bütün ağaçların ilki"** olarak kabul edilen zeytin ağacıdır (*Olea europaea* L.). Arkeolojik ve jeolojik buluntular zeytinin M.Ö. 6000 yılından beri kullanıldığını göstermektedir (Mumkaya, 2012). Akdeniz uygarlığının sembolü olarak kabul edilen zeytinin anavatanı Türkiye olup, birçok Akdeniz ülkesinde de kültürü yapılmaktadır. Zeytin ağacından elde edilen ürünler arasında en değerli olarak kabul edilen ürün ise, ekonomik açıdan büyük bir öneme sahip olan ve besleyici, duyusal, fonksiyonel kalitede bir "meyve suyu" olarak nitelendirilen zeytinyağıdır (Matos ve ark., 2007; Özata ve Cömert, 2016).

Diğer yağlarda olduğu gibi zeytinyağında bulunan bileşenler de, majör ve minör bileşenler olmak üzere iki kısma ayrılmaktadır. Toplam yağ ağırlığının % 98'ini oluşturan ve sabunlaşabilir özellikte majör bileşenleri; triaçilgliseroller, diaçilgliseroller, monaaçilgliseroller ve yağ asitleri oluştururken, toplam yağ ağırlığının % 2'sini oluşturan minör bileşenler ise; tokoferoller, steroller, hidrokarbonlar, gliserit olmayan esterler ve mumlar, triterpenik akoller, alifatik alkoller, uçucu aroma bileşenleri, renk verici pigmentler ve fenolik bileşikleri içermektedirler (Kiritsakis, 1998; Gümüşkesen, 1999).

Zeytinyağının temel (major) bileşenlerinden olan yağ asitlerinin % 55-83'ünü *tekli doymamış yağ asitleri (TDYA)* (özellikle oleik asit), % 4- 20'sini *çoklu doymamış yağ asitleri (ÇDYA)*, % 8-14'ünü ise *doymuş yağ asitleri* oluşturmaktadır. Yüksek OA içeriği ile karakterize edilen zeytinyağındaki diğer temel yağ asitleri linoleik, palmitik ve stearik asitlerdir. İnsan vücudunda en çok bulunan yağ asidi olan ve sağlık açısından da birçok faydası bulunan OA`nın zeytinyağındaki yüksek oranı, zeytinyağını oksidasyona karşı dayanıklı kılmakta, dolayısıyla yüksek stabiliteye ve uzun raf ömrüne sahip bir yağ olan zeytinyağı, ilaç, kozmetik gibi önemli sektörlerde etkin ve yaygın bir şekilde kullanılabilmektedir(Owen ve ark., 2000b).

OA gibi sağlık üzerinde birçok faydası bulunan doymamış yağ asitlerinin ve bunları içeren bitkisel yağların modifiye edilerek kullanılmaları son zamanlarda dikkat çeken uygulamalardan biridir. Bu uygulamalar arasında en çok ilgi çekeni ise, doymamış yağ asidi içeren bitkisel yağların ozonlanması ve ozonlanmış bu yağların gıda, kozmetik ve farmasötik gibi çeşitli endüstrilerde kullanılmasıdır (Sadowska ve ark., 2008). OA`dan elde edilen bir diğer ürün ise, OA`nın ozonlama reaksiyonu

sonunda elde edilen *azelaik asittir (AA).* Bununla birlikte, OA`nın bir oksidan ve bir katalizör varlığında oksidatif bölünmesi sonucu elde edilen tek ürün AA olmayıp, pelargonik asit (PA) de bu reaksiyon ile elde edilen bir diğer değerli üründür.

PA; bir plastikleştirici, parfüm, mantar ilacı ve reçine olarak biyo-yağlayıcı madde endüstrisinde talep görürken (Masyithah ve Ginting, 2018),AA ise; anti-enflamatuar ve anti-bakteriyel özelliklere sahip olup, farmasötik endüstrisinde, akne karşıtı bir ajan ve saç büyümesini uyarıcı bir madde olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır(Burchacka ve ark., 2016b; Mazurek ve Pierzchała, 2016b). Bu bağlamda AA; sahip olduğu potansiyel terapötik etkileri sebebiyle, sadece cildi temizleyici, görünümü değiştirici ve koruyucu olarak davranan bir kozmetik ürün değil, istenilen kozmetik sonuca fizyolojik etki ile ulaşan, deri ve deriye bağlı oluşumların yapı ve fonksiyonlarını olumlu yönde etkileyen ve biyolojik aktivitesi olduğu iddia edilen bir bileşik olması sebebiyle de kozmesötik bir etkin madde olarak değerlendirilmelidir.

1.1. Zeytinyağı

Zeytinyağı, sadece zeytin ağacı, *Olea europaea* L. meyvelerinden elde edilen besleyici, duyusal ve fonksiyonel kalitede bir yağdır. Çözücü kullanılarak ekstrakte edilen veya reesterifikasyon işlemi ile doğal trigliserid yapısı değiştirilmiş yağlar ve diğer yağlarla karışımı bu tanımın dışındadır (Tebliğ, 2017).

Kalori değeri ve sindirilebilirlik derecesi yüksek, esansiyel yağ asitlerinin kaynağı ve yağda çözünen A, D, E ve K vitaminlerinin deposu olan ve genel terapötik özelliklerine katkı yapabilen değişik bileşenleri ile adeta "*fonksiyonel gıda"* olarak değerlendirilen zeytinyağı, zeytinin çekirdeğiyle birlikte sıkılarak, hiçbir kimyasal işlem görmeden elde edilebilen şeffaf, yeşilimsi/sarımtırak renkli ve aromatik kokulu bir sıvı olup, bitkisel yağlar arasında rafinasyona tabi tutulmadan üretilebilen hemen hemen tek yağ olma özelliğine sahiptir (Ruiz-Gutiérrez, 2000; Stark ve Madar, 2002). Zeytinyağının rafinasyon işlemine tabi tutulmaması, yapısında yer alan ve sağlık üzerinde olumlu etki gösteren birçok bileşiğin yağ içerisinde kalmasını sağlamakta ve zeytinyağının eşsiz aroma ve lezzetini oluşturan birçok bileşenin kaybını önlemektedir (Kara, 2011). Zeytinyağının bu özelliklerini oluşturan ve oksidasyona karşı dayanıklı olmasını sağlayarak gerek ilaç gerekse kozmetik sektöründe kullanılabilir kılan bileşenler ise; içerisinde bulunan OA, (özellikle natürel zeytinyağında yüksek oranda

bulunmaktadır) karotenoidler, tokoferoller, steroller, skualen, klorofil ve fenolik maddelerdir (Min, 1989; Morelló ve ark., 2004).

Zeytinyağı, içerisinde bulunan etken maddeler sebebiyle tıp biliminin babası olan Hipokrat tarafından **"büyük terapötik"** olarak tanımlanmış ve geçmişten günümüze birçok hastalığın tedavisinde ve/veya tedaviye yardımcı olarak kullanılmıştır. Sağlıklı beslenme, sağlığa faydalı ürünler tüketme, yaşam kalitesini artırma ve iyi olma (wellness) gibi konuların ön plana çıktığı günümüzde de, sağlığa olan faydalarından dolayı zeytinyağına olan ilgi her geçen gün biraz daha artmaktadır.

Zeytinyağı, Türk Gıda Kodeksi Zeytinyağı ve Pirina Yağı Tebliği`ne göre zeytinyağı; **natürel**, **rafine**, **riviera** ve **çeşnili** zeytinyağı olmak üzere 4 sınıfta incelenmektedir (Tebliğ, 2017).

A) Naturel Zeytinyağı

Zeytin ağacı meyvesinden, doğal niteliklerinde değişikliğe neden olmayacak bir ısıl ortamda, sadece yıkama, dekantasyon, santrifüj ve filtrasyon işlemleri gibi mekanik veya fiziksel işlemler uygulanarak elde edilen; kendi kategorisindeki ürünlerin fiziksel, kimyasal ve duyusal özelliklerini taşıyan yağlardır.

Natürel zeytinyağları *3 kategoride* incelenmektedir.

— **Natürel sızma zeytinyağı**: Doğrudan tüketime uygun, serbest yağ asitliği oleik asit cinsinden her 100 gramda 0,8 gramdan fazla olmayan yağlardır.

— **Natürel birinci zeytinyağı:** Doğrudan tüketime uygun, serbest yağ asitliği oleik asit cinsinden her l00 gramda 2,0 gramdan fazla olmayan yağlardır.

— **Ham zeytinyağı/Rafinajlık:** Serbest yağ asitliği oleik asit cinsinden her 100 gramda 2,0 gramdan fazla olan ve/veya duyusal ve karakteristik özellikleri bakımından doğrudan tüketime uygun olmayan, rafinasyon veya teknik amaçlı kullanıma uygun yağlardır.

B) Rafine Zeytinyağı

Ham zeytinyağının doğal trigliserit yapısında değişikliğe yol açmayan metotlarla rafine edilmeleri sonucu elde edilen ve serbest yağ asitliği oleik asit cinsinden her l00 gramda 0,3 gramdan fazla olmayan yağdır.

C) Riviera Zeytinyağı

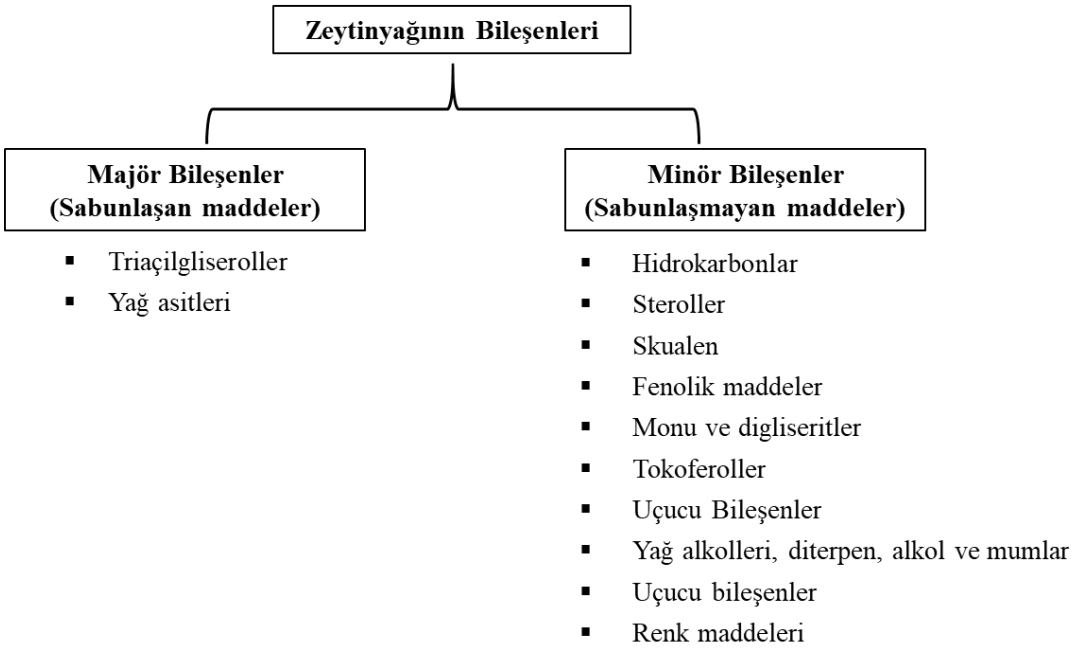
Rafine zeytinyağı ile doğrudan tüketime uygun natürel zeytinyağları karışımından oluşan ve serbest yağ asitliği oleik asit cinsinden her l00 gramda l,0 gramdan fazla olmayan yağdır.

D) Çeşnili Zeytinyağı

Zeytinyağlarına değişik baharat, bitki, meyve ve sebzelerin ilave edilmesi ile elde edilen ve diğer özellikleri açısından bu Tebliğ kapsamında kendi kategorisindeki ürünlerin özelliklerini taşıyan yağdır.

1.1.2. Zeytinyağının bileşenleri

Kimyasal bileşimi incelendiğinde Zeytinyağının sabit bir bileşiminin olmadığı ve zeytinin türüne, üretim yılına, yetiştiği araziye ve zeytinin sıkılma metoduna göre farklılık gösterdiği görülmektedir. Diğer yemeklik yağlarda olduğu gibi zeytinyağı da sabunlaşan trigliserit kısmı (~% 98) ve sabunlaşmayan kısım (~ % 2) olmak üzere iki temel birimden oluşmaktadır **(Şekil 1.1.).** Zeytinyağında oldukça az içeriğe sahip olan sabunlaşmayan özellikteki maddelerin, önemli fonksiyonlara sahip oldukları bilinmektedir (Göğüş ve ark., 2009).



Şekil 1.1. Zeytinyağındaki Majör ve Minör Bileşenler

1.1.2.1. Majör bileşenler

Zeytinyağının major bileşenlerinden (sabunlaşabilen maddeler) triaçilgliseroller ve yağ asitleri zeytinyağının yaklaşık % 98'ini oluşturmaktadır.

- **Triaçilgliseroller**

Gliserolün yağ asitleri ile esterleşmesiyle meydana gelen triaçilgliseroller, bitkisel yağların ana bileşeni olup; triaçilgliserolün yapısındaki yağ asitlerinin üçünün de aynı tür olması durumunda ***basit TAG`lar*** meydana gelirken, yağ asitlerinin ikisinin veya üçünün farklı olması durumunda ise ***karışık TAG`lar*** oluşmaktadır. Doymuş yağ asitlerinden meydana gelen TAG (PPS, SSS, PSP) ve üçlü doymamış yağ asitlerinden meydana gelen TAG`lar (PPLn, SSLn) zeytinyağında bulunmazken, zeytinyağında bulunan TAG`lerin daha çok OOO, POO, OOL, POL ve SOO yapısında olduğu bilinmekte ve bunlardan OOO (basit TAG) miktarı, zeytinyağı tağşişlerinin tespitinde kullanılmaktadır[1] (Boskou ve ark., 2006; İlyasoğlu, 2010).

Tablo 1.1. Zeytinyağı İçerisinde Bulunan Triaçilgliserollerin % Miktarları (Boskou ve ark., 2006)

TAG	Miktar (%)		TAG	Miktar (%)
OOO	45-59		OLnL	≤1
POO	12-20		LOL	≤1
OOL	12.5-20		OLnO	≤1
POL	5.5-7		PLL	≤1
SOO	3-7		PLnO	≤1
POP	≤1		LLL	≤1
POS	≤1			

- **Yağ asitleri**

Yüksek OA içeriği ile karakterize edilen zeytinyağının içerisinde bulunan diğer temel yağ asitleri; palmitik, linoleik ve ve stearik asitlerdir (İriş, 2008). İnsan vücudunda en çok bulunan yağ asidi olan ve sağlık açısından da birçok faydası bulunan OA`nın zeytinyağındaki yüksek oranı zeytinyağını oksidasyona karşı dayanıklı kılmakta ve yüksek stabiliteye & uzun raf ömrüne sahip olan zeytinyağı, ilaç ve kozmetik gibi sektörlerde yaygın bir şekilde kullanılabilmektedir (Owen ve ark., 2000b).

[1]P: palmitik asit, S: stearik asit, O: oleik asit, L: linoleik asit, Ln: linolenik asit

Uluslararası standartlara göre (sızma ve rafine) zeytinyağı için önerilen yağ asidi içerikleri; % 55-83 oleik, % 7.5-20 palmitik, % 3.5-20 linoleik, % 0.5-3.5, stearik, % 0.3-0.5 palmitoleik, % 0-1.5 linolenik, % 0-0.5 miristik asitten ve çok daha az miktarlarda diğer yağ asitlerinden oluşmalıdır (Tebliğ, 2017).

1.1.2.2. Minör bileşenler

Zeytinyağının minör bileşenleri olarak da adlandırılan sabunlaşmayan maddeler arasında en önemlileri; fenolik bileşenler (oleuropein, tyrisol ve hidroksityrisol), tokoferoller (vitamin E), steroller (beta-sitostero, campasterol, stigmasterol), hidrokarbonlar (squalen, karoten vb.)`dır (Keçeli ve Demirtaş, 2008).

- **Fenolik Bileşikler**

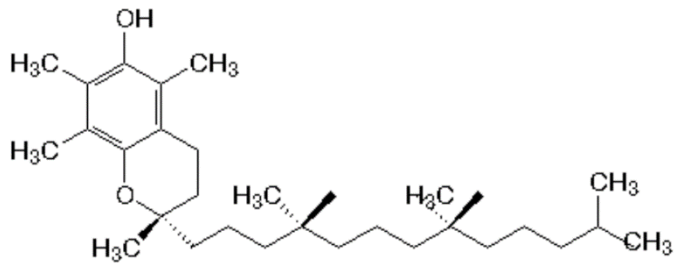
Fenolik bileşikler, nerdeyse bütün meyve ve sebzelerde az veya çok miktarda bulunan kompleks bileşikler olup ikincil bitki metabolitleridir (Le Floch ve ark., 1998; Bianco ve Uccella, 2000). Polifenol ismiyle de tanınan fenolik bileşiklerin en basiti, yapısında sadece bir tane hidroksil grubu bulunduran fenoldür (Canbaş, 1983). Fenolik bileşiklerin kalite ve sağlık üzerine etkileri sebebiyle, son yıllarda zeytinyağı içerisinde varolan fenolik bileşiklerin tanımlanması üzerine çeşitli çalışmalar yapılmıştır (De la Torre-Carbot ve ark., 2005). Zeytinyağında bulunan fenolik bileşikler, zeytinyağına diğer bitkisel yağlardan farklı özellikler (“acılık” ve “burukluk” gibi iki önemli tat unsuru vermesinin yanında, sarı-kırmızı-mavi tonlarındaki renk özellikleri) kazandırmaktadır (Cemeroğlu ve ark., 2009).

Zeytinyağında bulunan başlıca fenol bileşenleri; oleuropein, lignanlar, tirosol, hidroksitirosol, phidroksifenilasetik asit, kafeik asit, p-kumarik asit, ferulik asit ve vanillik asit olup, (Tuck ve Hayball, 2002) bunlar arasında *lignanlar* zeytinyağında en yüksek oranda bulunan fenolik bileşiklerdir, onu *oleuropein* kaynaklı basit fenoller (hidroksitirozol ve tirozol) ve *sekoiridoidler* (oleuropein, ligstrosid aglikon ve bunların her birinin dekarboksile dialdehit türevleri) izlemektedir (Owen ve ark., 2000b; Granados-Principal ve ark., 2010). Zeytinyağındaki her bir fenolik bileşik oto-oksidasyonu inhibe etmekte olup, basit fenoller, sekoiridoidler ve lignanlar sızma zeytinyağındaki total fenollerin % 47’sini oluşturmaktadır (Owen ve ark., 2000a; Perona ve ark., 2006).

Fenolik maddeler, besinsel değere sahip olmamakla birlikte sağlık üzerinde olumlu etkileri bulunan bileşenlerdir. Otuzdan fazla fenolik bileşik içeren zeytinyağının toplam fenolik içeriği; bazı kaynaklarda 196–500 mg/kg olarak verilirken, bazı kaynaklarda ise bu değer 40-1000 mg/kg olarak bildirilmiştir(Parthasarathy ve ark., 1990; Boskou, 2000; Hashim ve ark., 2005). Zeytinyağı içerisinde bulunan fenolik bileşiklerin miktarı ve kompozisyonu; zeytinin hasat zamanına, proses şartlarına ve zeytin ağaçlarının yetiştiği alanın yüksekliğine bağlı olarak farklılık göstermektedir.

- **Tokoferol**

Alfa, beta, gama ve delta olmak üzere dört homolog yapıya sahip olduğu bilinen tokoferoller, birçok bitkisel yağda bulunduğu gibi zeytinyağı içerisinde de bulunmaktadırlar. Zeytinyağında en fazla bulunan tokoferol türü toplam tokoferollerin yaklaşık % 95'ini teşkil eden α-tokoferoldür (% 5'lik kısmı ise beta ve gama tokoferoller oluşturmaktadır (Boskou, 2000). Sızma zeytinyağındaki toplam tokoferol içeriği 98-370 mg/kg olup, bu miktar zeytinin olgunluğu, saklama şartları ve depolama süresi gibi faktörlere bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Psomiadou ve ark., 2000).



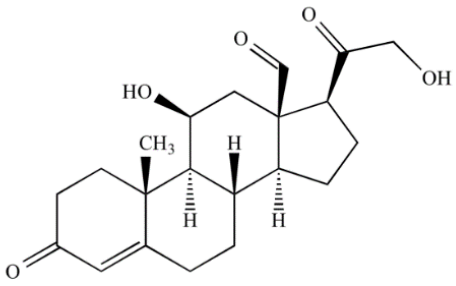
Şekil 1.2. E Vitamini (α-tokoferol)

- **Sterol**

"Sterol" terimi yüksek erime noktasına sahip ve kolesterole benzer özellik gösteren sabunlaşmayan alkoller için kullanılmaktadır (Gümüş, 2012). Bitkisel yağların karakteristik özelliklerini veren sterollerin bazıları doymuş özellik gösterirken, bazıları ise bir, iki veya üç çift bağı bünyesinde barındırabilmektedirler (kolesterol, stigmasterol, ergosterol vb.). Zeytinyağındaki steroller sabunlaşmayan maddelerin ~ % 20'sini oluşturmakta ve genel olarak 4 grupta incelenir. Bunlar;

- 4, 4- desmetilsteroller (normal steroller)
- 4α (Monomers) metil steroller
- 4, 4 dimetil steroller (triterpen alkoller)
- Triterpen dialkoller olarak sıralanabilir (Abidi, 2001).

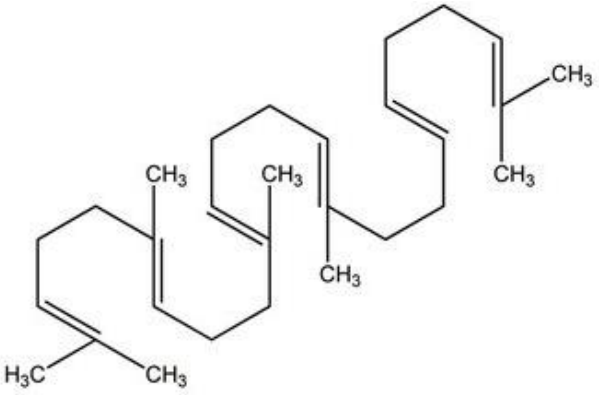
Zeytinyağı tağşişlerinin belirlenmesinde kullanılan en önemli kriterlerden olan sterol kompozisyonunu etkileyen başlıca faktörler; zeytinin çeşidi, zeytinin olgunluk derecesi, tarımsal uygulamalar, iklim ve yağ eldesinde kullanılan sistemdir. **Şekil 1.3.** sterollere örnek olarak kolesterol molekülünün yapısı verilmiştir.



Şekil 1.3. Kolesterol Molekülünün Yapısı

- **Skualen**

Skualen ($C_{30}H_{50}$), önemli biyolojik özellikleri olan yüksek doymamış bir alifatik hidrokarbondur (Konuşkan ve Canbaş, 2008). Önceleri sadece insan sebumunda ve köpek balığı karaciğer yağında bulunduğu düşünülen skualenin, araştırmalar sonucunda sızma zeytinyağında da bol miktarda bulunduğu tespit edilmiştir. Zeytinyağı içerisindeki skualen miktarı, zeytinyağında bulunan % 2`lik sabunlaşmayan kısmın büyük bir bölümünü oluşturmaktadır (% 60-75). Zeytinyağındaki skualen, vücuda alındıktan sonra, genellikle deri altında depo edilir ve birçok önemli faydası vardır. Bir triterpen olan skualen, hemoglobinden bağımsız olarak oksijeni hücreye doğrudan taşıyabilmekte ve tüm vücuda ulaştırabilmektedir. Skualenin kanser oluşumunu önlediğini ve yüksek anti-tümör aktivitesine sahip olduğu gösterir çalışmalar da mevcuttur.



Şekil 1.4. Skualen Yapısı

1.1.3. Zeytinyağında kalite kontrol kriterleri

Zeytinyağlarında kalite kontrol parametreleri; *kaliteyi* ve *saflığı* belirten analizler olmak üzere iki kısma ayrılmaktadır.

1.1.3.1. Kaliteyi belirten parametreler

Kaliteyi belirten parametreler; serbest yağ asitliği, peroksit sayısı, UV soğurma değerleri (özgül absorbans-K_{232}, K_{270}, ΔK), eterde çözünmeyen safsızlıklar, nem ve uçucu madde, ağır metaller olarak yer almaktadır (Göğüş ve ark., 2009).

- **Serbest yağ asitliği tayini:** Bu yöntem ile zeytinyağındaki serbest yağ asitlerinin miktarının belirlenmesi hedeflenmekte ve serbest yağ asitlerinin miktarı, genel olarak OA cinsinden, % olarak verilmektedir. Bu tayinde yağ numunesi, uygun çözücü veya çözücü karışımları içerisinde çözülür ve ortamda bulunan serbest yağ asitleri, etanollü potasyum hidroksit çözeltisi ile titre edilir (Yıldırım, 2015).
- **Peroksit sayısı tayini:** Peroksit sayısı (PV) yağlarda bulunan aktif oksijen miktarının bir ölçüsü olup, 1 kg yağda bulunan peroksit oksijeninin milieşdeğer gram cinsinden miktarıdır (Tebliğ, 2017). Yağdaki peroksit miktarı yağın ne kadar saklanabileceği ve bozulma derecesi hakkında bilgi vermektedir. Bu tayinde yağ numunesi, asetik asit-kloroform çözeltisi içinde çözündükten sonra, potasyum iyodür çözeltisi ile muamele edilmekte ve açığa çıkan serbest iyot, ayarlı sodyum tiyosülfat çözeltisi ile titre edilmektedir (Göğüş ve ark., 2009).
- **Ultraviyole ışığında özgül soğurma tayini:** Bu yöntem, zeytinyağı ve pirina yağının ultraviyole ışıkta spektrofotometrik olarak incelenmesini amaçlamaktadır. Yöntem, konjuge dien bileşiklerin 232 nm dalga boyunda, konjuge trien bileşiklerinin ise 270 nm dalga boyundaki ışığı absorbe etmesini temel alır. Söz konusu bu ürünler oksidasyon veya rafinasyon işlemleri sırasında meydana gelmektedir. Elde edilen sonuçlar ile, yağın kalitesi ve tağşişi hakkında bilgi sahibi olunabilmektedir. Bu tayinde yağ numunesi, uygun bir çözücüde çözülmekte ve numunlerin özgül absorbans değerleri, bir spektrofotometre yardımıyla saf çözücüye (kör) karşı belirlenmektedir (Tebliğ, 2017).
- **Eterde Çözünmeyen Safsızlıklar:** Zeytinyağının kalitesini ve niteliğini belirleyen önemli parametrelerden biri olan eterde çözünmeyen safsızlıklar; zeytinyağı üretimi sırasında, süreçlere tam olarak uyulmaması veya kötü üretim yapılması gibi durumlar sonunda, yağ içinde kalan ve petrol eterinde çözünmeyen uçucu maddeler dışındaki

toplam yabancı maddeleri ifade etmektedir. Bu maddeler genel olarak, kum ve toprak gibi maddeler, okside olmuş yağ asitleri, azotlu maddeler, mineral maddeler ve karbonhidratlar`dır (Göğüş ve ark., 2009).

- **Nem ve Uçucu Madde:** Zeytinyağının ekstraksiyon işlemi sırasından zeytinin meyvelerinden yağa geçen suyu, nemi ve uçucu maddeleri tespit etmek için gerçekleştirilmektedir (Göğüş ve ark., 2009). Bu analiz etüv, rezistanslı veya infrared nem tayin cihazları ve Karl-Fischer titratörlü nem tayin cihazları kullanılarak yapılabilmektedir.
- **Ağır Metaller:** Zeytinyağının depolanması veya işlenmesi sırasında kullanılan ekipmanlarından kaynaklı ağır metal kontaminasyonlarının tespiti amacıyla gerçekleştirilmektedir. Atomik absorbsiyon spektrofotometresi yardımıyla gerçekleştirilen analizlerde genellikle, demir ve bakır miktarları tayin edilmektedir (Göğüş ve ark., 2009).

1.1.3.2. Saflığını belirten parametreleri

Zeytinyağının saflığının belirlenmesinde kullanılan parametrelerin başında; kırılma indisi, yağ asitleri kompozisyonu, sterol kompozisyonu, toplam sterol miktarı, β-pozisyonlu palmitik ve stearik asit miktarı, vaks miktarı, trigliserit kompozisyonu ve stigmastadien miktarı gelmektedir.

- **Kırılma İndisi:** Zeytinyağının ne kadar saf olduğunu gösteren fiziksel analizlerden biridir. Refraktometre cihazı kullanılarak gerçekleştirilen ölçümler, ortam sıcaklığının sonuçları oldukça etkilemesinden dolayı 20 °C`de yapılmaktadır (Kayahan, 2003; Bozdoğan ve ark., 2010).
- **Yağ Asitleri Kompozisyonu:** Yağın türüne göre farklı oranlarda/miktarlarda bulunana yağ asitlerinin kompozisyonu, bitkisel yağların kendi türleri arasında ve yetiştirildiği bölgeler hakkında bilgi sahibi olunmasını sağlamaktadır. Ayrıca, yağ asitleri kompozisyonları kullanılarak, zeytinyağı gibi yağlarda yapılan tağşişler de belirlenebilmektedir (Bozdoğan ve ark., 2010). Zeytinyağında yüksek oranlarda bulunması beklenen yağ asitleri; oleik, linoleik, palmitik, stearik asitler olup; linolenik, miristik, araşidik, gadoleik, behenik ve lignoserik asit miktarının yüksek olması zeytinyağına diğer bitkisel yağların karıştırıldığının bir göstergesi olarak kabul edilmektedir.
- **Toplam Sterol Miktarı ve Sterol Kompozisyonu:** Zeytinyağındaki saflık kriterlerinden bir diğeri olansterol kompozisyonu da; zeytinyağı tağşişinin

belirlenmesinde kullanılan önemli kriterler arasında yer almaktadır (Bozdoğan ve ark., 2010). Fındık yağı gibi, zeytinyağı bileşimine benzerlik gösteren yağların karışımı bu analizle tespit edilebilmektedir. Zeytinyağının sabunlaşmayan önemli bir bölümünü oluşturan ve bir tür alkol grubu olan steroller, her bitkisel yağda farklı bir dağılım sergilediğinden; çok az miktarlardaki tağşişler, sterol analizleri yardımıyla kolayca tespit edilebilmektedir (Göğüş ve ark., 2009).

- **Trigliseritlerin 2.Pozisyonlu Palmitik ve Stearik Asit Toplamı:** Doymuş yağ asitlerinden palmitik (16:0) ve stearik (18:0) asidin, 2. pozisyondaki toplam yağ asitlerine oranı olarak ifade edilmektedir. Doğal olarak natürel zeytinyağlarının trigliserit molekülündeki orta karbon (2 ya da 3 formu) genellikle doymamış yağ asitlerinden oleik ya da linoleik asidi içerir. Bu pozisyonda doymuş yağ asitlerinden birinin bulunması ise, zeytinyağının esterifikasyona uğramış yağlarla karışmış olduğunun bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (Göğüş ve ark., 2009).
- **Vaks Miktarı:** Zeytinyağının, diğer rafine edilmiş tohum yağları ve pirina yağları ile tağşişinin tespitinde kullanılan bir diğer analiz metodudur. Vaks analizleri, yağ numunelerinde bulunan vaksların kolon kromatografi yöntemi ile ayrılmasından sonra, gaz kromatografisi yöntemi ile belirlenmesi esasına dayamaktadır. Bu analiz neticesinde, zeytinyağında yer alan C40, C42, C44 ve C46 karbon sayılı alifatik vaksların miktarları tespit edilmektedir. Vakslar, tüm bitkisel yağların kendi kendilerine verdikleri tepkimeler ile oluşmuş büyük moleküllerdir ve zeytinyağı içeriğinden uzaklaştırılması kolay değildir. Şöyle ki; zeytinyağı uzun süre bekletildiğinde, oksidasyon (bozunma) tepkimeleri, kendi iç tepkimelerinin önüne geçmektedir. Bu durumda peroksit miktarında artış gözlenirken, vaks miktarında aynı oranda bir yükseliş olmayabilir (Göğüş ve ark., 2009).
- **Stigmastadien Miktarı:** Zeytinyağı saflık parametreleri arasında yer alan stigmastadien, rafinasyon işlemi sırasında zeytinyağının fazla miktarda ağartma toprağı ile işlenmesi ve sonrasında ısıl işlemlere tabi tutulması sebebiyle oluşmaktadır. Natural zeytinyağı eldesinde, hiçbir zaman yüksek sıcaklık ve uzun süre ısıl işlem uygulanmamaktadır. Fakat rafine zeytinyağı için aynı durum söz konusu değildir. Bu sebeple rafine edilmiş tüm yağlarda stigmastadien miktarında yükseliş görülmektedir. Zeytinyağı tağşişlerinin belirlenmesinde stigmastadien miktarının tesbiti oldukça önemlidir. Stigmastadien miktarı tayin edilirken, ilk olarak stigmastadien yağdan ayrıştırılmakta, sonrasında ise gaz kromatografisi yöntemi kullanılarak tayin edilmektedir (Göğüş ve ark., 2009).

1.1.4. Zeytinyağı kalite kontrol analizlerinde kullanılan metotlar

Zeytinyağı kalite kontrol kriterlerinin belirlemesinde bazı resmi kuruluşlar tarafından standart kabul edilen metotlar kullanılmaktadır. Söz konusu bu metotların yer aldığı standartlar ve ilgili kuruluşlar aşağıda yer almaktadır:

1. Türk Gıda Kodeksi Zeytinyağı ve Pirina Yağı Tebliği 2007/36
2. TS 341 Yemeklik Zeytinyağı Standardı
3. Ulusal Standartlar (TSE)
4. Avrupa Birliği Standardı
5. Codex Alimenterious
6. Uluslararası Standartlar (ISO, AOCS)
7. Uluslararası Zeytinyağı Konseyi Ticari Standardı (IOCC)

Tablo 1.2. Zeytinyağı Kalite ve Saflığı Belirleyen Parametreler ve Parametreleri Değerlendirmede Kullanılan Standart Metotlar

Kalite Parametreleri için Gerçekleştirilen Analizler	**Standart Metotlar**
Serbest yağ asitliği tayini	AOCS Ca-5a-40, TS 1605, TS 342
Peroksit sayısı tayini	AOCS Cd 8b-90, ISO 3960, TS 4964
Ultraviyole ışığında özgül soğurma tayini	AOCS Cg 5-91, TS 5051,EN ISO 3656, ISO 3656
Eterde çözünmeyen safsızlıklar tayini	TS 1608 EN ISO 663'e, IUPAC 2.604'e ya da ISO 663
Nem ve uçucu madde	TS 1607, ISO 662, IUPAC 2.601'e ya da ISO 662
Ağır metaller	ISO 8294
SaflıkParemetreleri için Gerçekleştirilen Analizler	**Standart Metotlar**
Kırılma indisi tayini	ISO 6320, TS 4960, ISO 6320'ye ya da IUPAC 2.102
Yağ asitleri kompozisyonu	AOCS Ch 2-91, TS 4504, EN ISO 5509, TS 4664, EN ISO 5508
Toplam sterol miktarı ve sterol kompozisyonu	AOCS Ch 6-91, TS EN ISO 12228, ISO 12228, IUPAC 2.403'e
Trigliseritlerin 2.pozisyonlu palmitik ve stearik asit toplamı	AOCS Ch 3-91, TS 7163, EN ISO 6800
Vaks miktarı	AOCS Ch 8-02, TS 342
Stigmastadien miktarı	EN ISO 15788-1

1.1.5. Zeytinyağındaki biyoaktif bileşenler ve sağlık üzerindeki etkileri

Zeytinyağı içerisinde yer alan biyoaktif bileşenler ve sağlık üzerine olan etkileri **Tablo 1.3.**`de özet halinde verilmiştir.

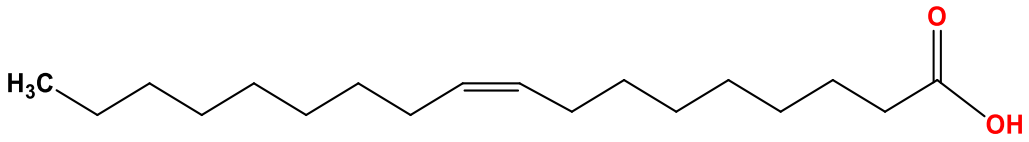
Tablo 1.3. Zeytinyağı İçerisinde Bulunan Biyoaktif Bileşiklerin Sağlık Üzerine Etkileri

Bileşenler	Etki mekanizmaları	Kaynak
Oleik Asit	Toplam LDL kolesterol ve trigliserit miktarını düşürür, tansiyon düşürücü ve antienflamatuvar etkisi vardır. Kolon, akciğer, göğüs ve prostat kanseri oluşum riskini azaltır.	(Yamaki ve ark., 2002; Barberger-Gateau ve ark., 2007)
Fenolik Bileşikler	LDL kolesterol oksidasyonunu engeller, DNA'ya karşı koruma sağlar, antienflamatuvar etki gösterir, UV'ye karşı koruma sağlar, sinir sistemini korur, kan glikoz seviyesini azaltıcı etkisi vardır ve iltihaplanmayı önler ve böylece kalp damar hastalıklarının oluşum riskini düşürmektedir.	(Al-Azzawie ve Alhamdani, 2006; Cicerale ve ark., 2008; Zhang ve ark., 2009; Hao ve ark., 2010)
Tokoferoller	Özellikle kalp-damar ve kanser hastalıklar gibi bazı kronik hastalıklarda koruyucu olarak önemli rol oynayan bileşiklerdir.	(Ortíz ve ark., 2006)
Fosfolipidler	Çeşitli metabolik hastalıkların tedavisinde, kolesterol seviyesini azaltıcı, hayvanlarda ve insanlarda hafızayı kuvvetlendirici özellikler göstermektedir.	(Konuşkan ve Altan, 2008).
Skualen	Deride antioksidan aktivitesi ile UV`nin açmış olduğu hasarı yok etme ve benzer şekilde sekualen radyoaktiviteye karşı da koruma sağlamaktadır.	(Bayram ve Özçelik, 2012)
Steroller	Membran lipit peroksidasyonuna karşı koruma sağlar, antienflamatuvar etkili, endotelyal bozukluklar üzerine etkili, plak oluşumunu azaltır, toplam LDL kolesterol ve trigliserit miktarını azaltır, akciğer, göğüs, mide kanserlerinde tümor büyümesini azaltır, immün yanıtı ve antioksidan enzim aktivitesini artırarak antikanserojen etki gösterir.	(Devaraj ve ark., 2006; Hallikainen ve ark., 2006)

1.2. Oleik Asit (OA)

Oleik asit (OA), kimyasal formülü CH_3-$(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_7$-COOH şeklinde olan; 18 karbonlu, 9. ve 10. karbonlar arasında bir çift bağ bulunduran, doymamış bir yağ asididir. Yaygın olarak omega-9 (ω-9) ismi ile bilinen OA, kısaca C18:1 olarak ifade edilmektedir. Bitkisel sıvı yağlarda en fazla miktarda bulunan OA, yağların kraliçesi olarak da tabir edilen zeytinyağının içeriğinde bulunan en önemli yağ asididir (Nas ve Gökalp, 2001; Rosan, 2001; Young, 2002; Özdemir ve Denkbaş, 2003; Win, 2005).

1.2.1. OA`nın yapısı, fiziksel ve kimyasal özellikleri



Şekil 1.5. OA`nın Kimyasal Yapısı

Kimyasal adı (CAS):(Z) -9-oktadekanoik asit

CAS numarası: 112-80-1

Moleküler formülü: $C_{18}H_{34}O_2$

Yapısal formülü: $CH_3–(CH_2)_7–CH=CH–(CH_2)_7–COOH$

Moleküler ağırlığı: 282,47

Erime sıcaklığı: 13,4 °C

Kaynama sıcaklığı: 286 °C

Yoğunluk (20 °C): 0,8905 g/cm^3

Çözünürlük: alkol, eter, aseton ve benzen

LD_{50} (oral, sıçan): 74000mg/kg

OA`nın, alfa ve beta olmak üzere iki farklı kristal formu mevcut olup; bunlardan alfa OA 13,4 °C'lik erime noktasına, beta OA ise 16,3 °C erime noktasına sahiptir. Erime noktaları dikkate alındığında, oda sıcaklığında sıvı halde bulunduğu görülen OA, suda çözünmez iken, alkolde bir miktar, eter ve organik çözücülerin birçoğunda ise oldukça fazla çözünmektedir. Bununla birlikte OA, doymamış bir yağ asidi olması sebebiyle katılma ve parçalanma reaksiyonları verebilmektedir (Kiriş, 2008).

1.2.2. OA kaynakları ve OA miktarını etkileyen faktörler

Bitkisel ve hayvansal yağlardan elde edilebilen temel yağ asitlerinden biri olan OA için en önemli kaynağın zeytinyağı olduğu bilinmekle birlikte (Kiriş, 2008); ayçiçeği, aspir, soya, yerfıstığı ve kanola gibi bitkilerden de OA elde etmek mümkündür (Dubois ve ark., 2007; Güzel, 2016). OA, tek bir gen ile yönetilen çekinik (resesif) bir karaktere sahip olup, bitkilerden elde edilen oleik asit oranı sabit değildir, fakat oleik

asit çoklu doymamış bir yağ asidi olan linoleik asit ile ters orantılı bir miktarda bulunur. Bir başka ifadeyle, söz konusu bu yağ asitlerinden biri artarken diğeri kesinlikle azalmaktadır (Fernandez-Martinez ve ark., 1986; Vrânceanu ve ark., 1995). İki yağ asidi arasındaki bu ilişki genetik olarak kontrol edilebilmesine rağmen, çevre şartları bu ilişkiyi pozitif veya b-negatif olarak etkileyebilmektedir (Lajara ve ark., 1990). Söz konusu bu çevresel şartlar şöyle sıralanabilir;

- Ekim Zamanı
- Sıcaklık
- Kuraklık
- Güneş Işığı (Solar Radiation)
- Gübreleme vb.

1.2.3. OA`nın kullanım alanları

İnsan yağ dokusunda en fazla miktarda bulunan yağ asidi olan OA`nın, birçok önemli faydasının bulunduğu ve günümüzde pek çok alanda kullanıldığı bilinmektedir**.**

Sağlık Alanında: OA (omega-9), kötü kolestrol olarak da bilinen, kandaki düşük yoğunluklu lipoproteinlerin (LDL) miktarını düşürüp, iyi kolestrol olarak bilinen yüksek yoğunluklu lipoproteinlerin (HDL) miktarını artırarak, kandaki toplam kolestrol miktarının düşmesini ve arteriosklerozisin (damar sertliği) gerilemesini sağlamaktadır (Nicolosi ve ark., 1991; Pérez-Jiménez ve ark., 2002). Buna ek olarak, OA, kalp rahatsızlıklarının gelişimini azaltmakta ve vücudumuzda serbest radikaller olarak bilinen toksik maddeleri yakalayarak, antioksidan üretimini artırmaktadır (Nicolosi ve ark., 1991; Thompson ve ark., 1991; Pérez-Jiménez ve ark., 2002). OA`nın kanser üzerine etkilerinin incelendiği *in-vitro* ve *in-vivo* çalışmalar ise, OA`nın göğüs, kolorektal ve prostat kanserlerinin oluşum riskini azalttığını göstermişti(Thompson ve ark., 1991).

Gıda Alanında: OA, birçok hazır paketlenmiş üründe hayvansal yağların (tereyağı vb.) yerine kullanılmakta, OA ile hazırlanan ekmek, kek ve pasta gibi unlu mamüller, herhangi bir soğutma işlemine tabi tutulmadan uzun süre tazeliğini koruyabilmektedir (Warner ve ark., 1997; Warner ve ark., 2001). OA, diğer bitkisel yağlara göre yanma derecesi yüksek bir yağ olduğundan (210 °C) kızartmalar için de tercih edilmektedir (Gamel ve ark., 1999; Warner ve ark., 2001; Aladedunye ve Przybylski, 2013). Ayrıca OA`nın gıdalardaki küf mantarı oluşumlarını da engellediği bilinmektedir (Davidson ve ark., 1999).

Kozmetik Alanında: OA günümüzde pek çok kozmetik firması tarafından yoğun bir şekilde kullanılan hammaddelerden birisidir. Şampuanlarda, rujlarda, topikal kremlerde, bronzlaşma ürünlerinde ve bazı cilt temizleyici ürünlerde sıklıkla yer alan OA `nın bu kadar fazla kullanılıyor olmasının sebebi ise, OA`nın birçok maddeye kıyasla daha hızlı ve kolay emilebilen bir madde olması ve cilt üzerinde daha fazla olumlu etki göster (Rabasco Álvarez ve ark., 2000).

OA`nın Diğer Kullanım Alanları: OA dimer asit ve poliamid üretiminin yanı sıra; sabunlarda, esterlerde, amidlerde ve polimerlerde yüzey gerilimini azaltıcı ajan olarak, yağlayıcı madde üretiminde ise aşınma etkisini azaltıcı madde olarak kullanılmakta olup, oldukça geniş bir kullanım alanına sahiptir.

1.2.4. OA`nın Kimyasal Reaksiyonları

Yapısında bir adet çift bağ bulundurması sebebiyle OA, doymamış bir yağ asidi olup, katılma ve parçalanma reaksiyonları verebilmektedir (Kiriş, 2008).

1.2.4.1 Esterleşme

OA`nın fonksiyonel karboksil grubu ile alkollerin hidroksil grupları tepkimeye girerek, ester ve su oluşturmaktadırlar.

$$C_{17}H_{33}COOH + R^1OH \underset{\longleftarrow}{\overset{H^+}{\longrightarrow}} C_{17}H_{33}COOR^1 + H_2O$$

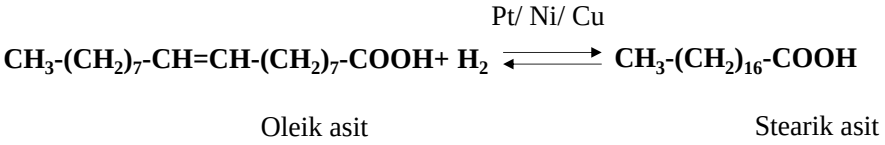
Şekil 1.6. OA`nın Esteleşme Reaksiyonu

1.2.4.2. Tuz oluşturma

Hayvansal ve bitkisel yağlardan elde edilen OA`nın, bazik ortamda hidrolizi sonucu OA tuzları oluşmakta ve oluşan bu tuzlar sabun olarak isimlendirilmektedir. Doymamış bir yağ asidi olan OA`dan elde edilen sabunlar, doymuş yağ asitlerinden elde edilen sabunlara göre suda ve alkolde çok daha fazla çözünmektedir.

1.2.4.3. Çift bağların hidrojenlenmesi (hidrojenizasyon)

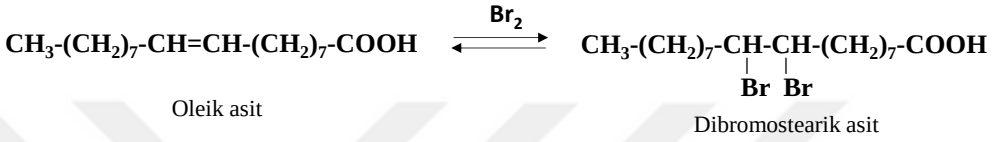
Bir katalizör varlığında (platin, nikel veya bakır), OA`nın yapısında bulunan çift bağa, kolaylıkla iki hidrojen katılabilir ve OA, doymuş bir yağ asidi olan stearik aside dönüşür.



Şekil 1.7. OA`nın Pt/ Ni/ Cu Katalizörlüğünde Yapısına Hidrojen Katılması Reaksiyonu

1.2.4.4. Halojenlenme

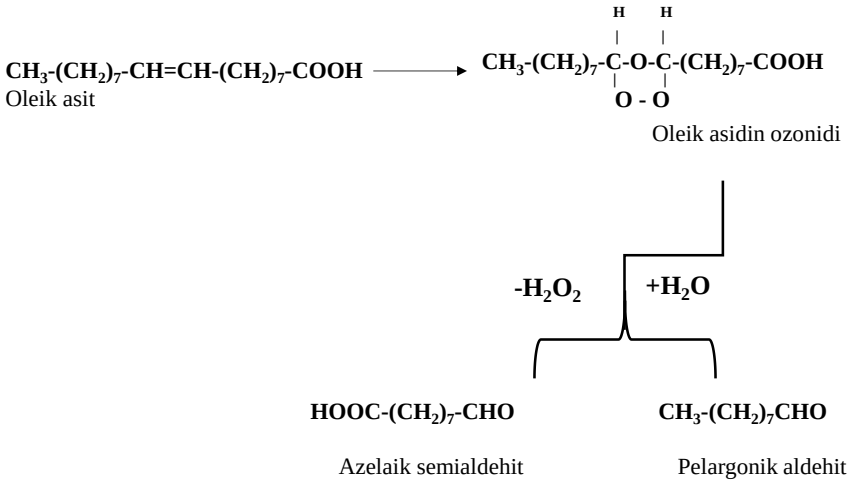
Doymamış bir yağ asidi olan OA`nın yapısında yer alan etilen bağının halojenlerden (flor, klor, brom, iyot gibi) biri ile doyurulmasına halojenlenme denilmektedir.



Şekil 1.8. OA`nın Bir Halojen İle Doyurulma Reaksiyonu

1.2.4.5. Oksitlenme

OA`nın yapısında bulunan çift bağ, potasyum permanganat ($KMnO_4$) gibi kuvvetli bir oksidanvarlığında parçalandığında, karboksilik asitler gibi oksidasyon ürünleri oluşmaktadır. Doymuş yağ asitleri, doymamış yağ asitlerine kıyasla oksidasyona daha dirençlidirler.



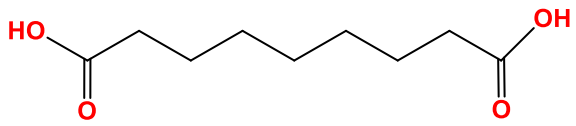
Şekil 1.9. OA`nın Kuvvetli Oksidanlar İle Parçalanma Reaksiyonu

Oksidasyon faktörü olarak ozon (O_3) molekülünün kullanıldığı durumlarda ise; ozonun çift bağa eklenmesi sonucu ozonid adı verilen türler meydana gelmektedir. Ozonidler indirgen şartlarda su ile hidroliz edildiklerinde, OA`daki çift bağın bulunduğu yerden parçalanarak iki aldehit molekülünü oluşturmakta, oksidan koşullarda hidroliz edildiklerinde ise, iki karboksilik asit molekülünü meydana getirmektedirler.

1.3. Azelaik Asit (AA)

Azelaik asit (AA), kimyasal formülü $HOOC(CH_2)_7COOH$ olan; 9 karbonlu doymuş bir dikarboksilik asittir. AA, OA`nın oksidasyonu/parçalanması ile veya serbest ve/veya esterleşmiş yağ asitlerinin kimyasal, fiziksel ve biyolojik reaksiyonları ile elde edilebilmektedir (Cavicchini ve Caputo, 1989).

1.3.1. AA`nın yapısı, fiziksel ve kimyasal özellikleri



Şekil 1.10. AA`nın Kimyasal Yapısı

Kimyasal adı (CAS): Nonandioik asit

CAS numarası: 123-99-9

Moleküler Formulü: $C_9H_{16}O_4$

Yapısal Formulü: $HOOC(CH_2)_7COOH$

Moleküler ağırlığı: 188,22 g/mol

Erime sıcaklığı: 107 °C

Kaynama sıcaklığı: 237 °C (20 hPa)

Yoğunluk (20 °C): 1,029 g/cm^3 (20 °C)

LD_{50} (oral, sıçan):4000 mg/kg

LD_{50} (deri için): 10 g/kg

Organoleptik Özellikleri: Beyaz, kokusuz, toz veya toz halinde kristal **Çözünürlüğü:** 1 L suda 1 °C'de 1 g, 20 °C'de 2,4 g, 50 °C'de 8,2 g, 65 °C'de 22 g çözünmektedir. Alkolde ve eterde kolayca çözünür (Reynolds, 1989).

Asitlik Sabitleri: Ka_1: 2.88 x10^{-5}**, Ka_2:** 3.86 x10^{-6}

1.3.2. AA kaynakları ve elde edilme yöntemleri

AA doğal olarak insan vücudunda ve çeşitli tahılların tohumlarında bulunmakla birlikte; bazı fiziksel, kimyasal ve biyolojik dönüşüm reaksiyonları ile de elde edilebilmektedir.

Günümüzde AA`nın eldesi için en yaygın kullanılan yöntem OA`nın ozonizasyonu olup, söz konusu prosedürde; OA içerisine sürekli olarak ~ % 2 oranında ozon gazı verilmekte (Roe ve Swern, 1960; Monomers, 1972) ve OA`nın temel parçalanma ürünü olan AA ve PA elde edilmeye çalışılmaktadır. Reaksiyonda açığa çıkan PA, aynı zamanda reaksiyonun yavaş cereyan etmesi için bir çözücü veya seyreltici işlevi de görmektedir. Reaksiyon ekzotermik olduğundan sıcaklık genellikle 50°C`de tutulmakta (Ab Rani ve ark., 2008a) ve oksidasyon reaksiyonunu katalizlemek için genellikle mangan tuzları kullanılmaktadır. Reaksiyon sonunda elde edilen karışımda; azelaik asit, pelargonik asit, palmitik asit, stearik asit ve ozonlama sırasında oluşan ester ve dimer gibi yüksek moleküler ağırlıklı ürünler bulunmaktadır. Karışık halde bulunan oksidasyon ürünlerinden; pelargonik asit ve diğer düşük kaynama noktasına sahip asitler karışımın üst kısmında yer alırken, ağır olan esterler ve dimer yapıdaki asitler çoğunlukla tortu kısmında bulunmaktadır. Karışım içerisindeki temel türlerden olan AA`nın diğer türlerden ayrılması ise genellikle sıcak su yardımıyla gerçekleştirilmektedir. Bunun için, elde edilen reaksiyon karışımı üzerine sıcak su ilavesi yapılarak, AA`nın çözünmesi sağlanmakta, daha sonra çözelti içerindeki AA, kristallendirme işlemi ve/veya çözücünün uçurulması yöntemiyle elde edilebilmektedir (Goebel ve ark., 1957; Oehlschlaeger ve Rodenberg, 1968; Ab Rani ve ark., 2008a).

Ozonizasyon yönteminden önce, ticari AA eldesi için kullanılan yöntem; kromik asit çözeltisinin kullanılması ile OA`nın oksidasyonudur. 1940`ların sonlarında Emery tarafından kullanılan bu yöntem, kromik asit çözeltisinin elektrolitik hücrelerde yeniden üretilebilmesine rağmen, yine de pahalı bir yöntem olma dezavantajına sahiptir. Yöntemde, oksidasyon işlem sonunda elde edilen karışım içerisindeki PA, indirgenmiş basınçta damıtılma işlemi uygulanarak, AA ise, sıcak sudan kristallendirilerek izole edilmektedir (Fitzpatrick ve Myers, 1948).

AA eldesinde kullanılan iyi bir laboratuvar yöntemi ise; oleik asidin permanganat çözeltisi ile oksidasyonudur. Bu yöntemde, sadece küçük miktarlarda suberik asit oluşumu gözlenmekte ve oldukça az bozulma meydana gelmektedir. Literatürde, bu yöntemin kullanılması ile asetonda gerçekleştirilen oksidasyon işlemi için % 83 azelaik asit verimi rapor edilmiştir (Armstrong ve Hilditch, 1925).

OA`nın oksidasyonu için bazı araştırmacılar tarafından kullanılan bir diğer reaktif de nitrik asittir. (Ellingboe, 1940; Kuceski, 1962). Ancak nitrik asit; azelaik asidin degradasyonuna ve bunun sonucu olarak da nispeten büyük miktarlarda suberik

asit oluşumuna yol açan bir kimyasal olduğu için, kullanımı dezavantajlıdır. Bu yöntemle elde edilen oksidasyon ürünlerinin ~ % 65 azelaik asit ve ~ % 35 suberik asit içerdiği bilinmektedir.

Azelaik asit eldesi için, hava oksidasyonu da kapsamlı bir şekilde incelenmiş olup, bu yöntemle elde edilen reaksiyon karışımında azelaik asidin yanı sıra; diğer dibazik asitlerin ve özellikle de suberik asidin bulunduğu tespit edilmiştir. Genellikle kobalt katalizörlerinin kullanıldığı bu yöntemden elde edilen verim % 15`ten fazla değildir (Loder ve Salzberg, 1942).

AA`ya giden bir başka yol da bütadien kullanımından geçmektedir. Bu yöntemde bütadien, bir alkol varlığında monoestere karbonile edilen 1,5-siklooktadiene dimerize edilir. Belde edilen bu esterin hidrolizi ve sonrasında gerçekleştirilen kostik bölünme aşaması ile, yüksek verim ve saflıkta AA elde edilmesi mümkündür (Johnson, 1984).

1.3.3. AA uygulama alanları

AA, anti-enflamatuar, anti-bakteriyel ve komedolitik özelliklere sahip bir madde olup; farmasötik endüstrisinde, akne karşıtı bir ajan, saç büyümesini uyarıcı bir ilaç ve çeşitli hiperpigmentasyon bozukluklarının (rozasea, solar lentigo ve melazma gibi) iyileştirilmesi ve tedavisinde etkin bir madde olarak kullanılmaktadır (Burchacka ve ark., 2016a; Mazurek ve Pierzchała, 2016a).

AA`nın etkili olduğu inflamatuvar deri hastalıklarından biri olan rozasea, birden fazla evresi bulunan bir rahazlık olup; yapısında kızarıklık, papülopüstüler (inflamatuvar) rozasea ve deri nodüllerini bulundurmaktadır (Cohen ve Tiemstra, 2002). Rozasea hastalığına sahip bireylerin birçoğunda yüzün orta bölümünde sürekli seyreden bir kızarıklık görülmektedir. Bu hastalığın iyileştirilmesi ve tedavi edilmesinde en çok kullanılan topikal ajan AA olup, hastalığın tedavisi için ~% 20 oranında AA içeren krem ve jellerin etkili olduğu bulunmuştur (Maddin, 1999).

AA`nın etki gösterdiği cilt sorunlarından bir diğeri olan melazma ise; net sınırları olan, genellikle simetrik, açık gri ya da koyu kahverengi makül ve lekelerle karakterize edilen yaygın bir rahatsızlıktır. Pigmentasyonun derecesi, aktif melanositlerin sayısına, sentezine, melanazomların büyüklüğüne ve keratinositler içindeki yüzdesine bağlıdır. AA, hiperaktif melanositler üzerindeki seçici etkisi

sayesinde melazma tedavisinde kullanılmaktadır (Grimes, 1995). % 20 AA içeren krem etkinliğinin, hidrokortizon içeren kremle (% 2) karşılaştırıldığı bir çalışmada, AA kremin tedavide daha fazla etkinlik gösterdiği görülmüştür (Verallo-Rowell ve ark., 1989).

Ayrıca, AA üzerinde gerçekleştirilen çalışmalar; AA`nın, insan kutanöz malign ve koroid melanomu gibi çeşitli tümör hücre hatları üzerinde doza ve zamana bağlı bir antiproliferatif etkisi olduğunu ve normal hücrelere kıyasla selektif olarak tümör hücrelerine nüfuz edebildiğini de göstermiştir. AA`nın bu özelliği, DNA sentezinde kullanılan enzimleri ve mitokondriyal oksidoredüktazları inhibe edebilme özelliğinden kaynaklanmaktadır (Breathnach, 1999).

Sağlık sektöründe kullanımının yanı sıra AA, ticari kullanımda da polimer endüstrisinde bir polyester, poliamitler ve poliüretan tabakalarının bir bileşiği olarak karşımıza çıkmaktadır.

1.3.4. AA`nın farmakolojik özellikleri

AA, akut veya kronik toksisitesi bulunmayan ve teratojenik, mutajenik özellikte olmayan bir maddedir. AA tirozinaz aktivitesini yok etme yeteneği sebebiyle, birçok hiperpigmentasyon rahatsızlığının iyileştirilmesi/tedavisinde yer almaktadır (Gupta ve Gover, 2007). Ayrıca, AA`nın akne lekelerini yok ettiği de bilinmektedir (Passi ve ark., 1989b; Schallreuter ve Wood, 1990).

Yapılan çalışmalar komedonal ve inflamatuvar aknede AA`nın diğer topikal tedaviler kadar etkili olduğunu göstermektedir. AA`ya karşı herhangi bir bakteri direnci bildirilmemiştir (Bershad, 2001; Krautheim ve Gollnick, 2004; Tüzün ve Dolar, 2004; Yamaner, 2008).

1.3.5. AA`nın farmakodinamik özellikleri

Dermatolojik bozuklukların tedavisinde AA`nın etki mekanizması/ mekanizmaları tam olarak bilinmemekle birlikte (Kakita, 1997), yapılan çalışmalar komedonal ve inflamatuvar aknede azelaik asitin diğer topikal tedaviler kadar etkili olduğunu göstermektedir. Ayrıca, azelaik aside karşı bakteri direnci bildirilmemiştir (Bershad, 2001; Krautheim ve Gollnick, 2004; Tüzün ve Dolar, 2004; Yamaner, 2008). Çoğunlukla % 15-20'lik krem formunda olan azelaik asidin, Ülkemizde ise % 20 krem ve % 15 jel formları bulunmaktadır (Yamaner, 2008).

Hafif etkili antimikrobiyal, komedolitik ve anti-inflamatuvar bir ajan olan azelaik asidin antimikrobiyal aktivitesi; aerob ve anaerob mikroorganizmalardaki hücresel protein sentezinin inhibisyonuyla ilişkilendirilirken (Töpert ve ark., 1989a) anti-inflamatuvar etkisi ise, reaktif oksijen türlerinin (oksi radikalleri) oluşum ve faaliyetlerini inhibe etmesine dayandırılmaktadır (Passi ve ark., 1989b; Akamatsu ve ark., 1991).

AA *in-vitro* olarak *S. epidermidis* ve *P. acnes*'e karşı bakteriyostatik (bakterinin gelişim ve üremesini önleyen fakat direkt öldürmeyen kimyasal, fiziksel, vb. ajanların etkisi) etki göstermekte ve bunların hem deri yüzeyindeki hem de foliküldeki konsantrasyonlarını azaltmaktadır (Passi ve ark., 1989a). AA`nın aerobik mikroorganizmalar üzerindeki etkisi ise; tirozinaz gibi çeşitli oksidoredüktif enzimleri, solunum zincirinin mitokondrial enzimlerini, tiyoredoksin redüktazı, 5-α redüktazı ve DNA polimerazı inhibe etmesi şeklinde olmaktadır (Passi ve ark., 1989a; Alonso ve ark., 2006).

Süspansiyon halindeki mikropartiküllere ek olarak, önemli bir AA fraksiyonu jelde çözülür (kremde % 25'e karşı % 3), bu da ilaç salımını ve cildin biyo kullanılabilirliğini artırır. Düşük lipid içeriği (% 3) formülasyonun yapışkanlığını en aza indirirken, yüksek su içeriği (% 70) soğutma ve nemlendirme etkileri ile sonuçlanır. Süspansiyon halindeki mikropartiküller ile birlikte, ıslatma bileşenleri yayılabilirliği artırır. Jel, kokular, organik çözücüler ve alkolden yoksundur ve cildin yaklaşık pH'ına (4,8) tamponlanır.

1.3.6. AA`nın farmakokinetik özellikleri

AA piyasaya ilk olarak % 20`lik konsantrasyonuna sahip bir krem formülasyonunda sunulmuştur. Günümüzde ise jel, sabun, köpük, solüsyon gibi birçok farklı formda AA içeren ürün bulunmaktadır. AA, lokal veya genel yan etkileri olmaksızın; topikal, fokal, oral, intravenöz, intra-arteriyel ve intralenfatik olarak uygulanabilmekte ve zararlı yan ürünler olmadan metabolize edilmektedir (Mingrone ve ark., 1983; Töpert ve ark., 1989b).

AA, insanlara topikal, ağızdan ve disodyum tuzu formunda doku içi enjeksiyon veya infüzyon yoluyla intravenöz, intra-arteriyel ve intralenfatik olarak lokal veya genel yan etkiler olmaksızın uygulanabilir (Mingrone ve ark., 1983; (Töpert ve

ark., 1989a). Farklı yollarla gerçekleştirilecek eşzamanlı bir uygulama, lezyonlu bölgelere uzun süreler boyunca yüksek konsantrasyonların verilmesini sağlayabilir.

Keratinositlerin çoğalmasını ve farklılaşmasını engelleyen azelaik asidin sebum üretimi üzerine bilinen herhangi bir etkisi olmamakla birlikte (Mayer-da-Silva, 1989) yine de hastalar sıklıkla, 1-2 aylık azelaik asit tedavisinden sonra derinin yağlı görünümünde gerileme olduğunu belirtmektedirler (Nazzaro-Porro, 1983). Azelaik asit içeren bir akne kreminin günlük 3-4 kez uygulanması ile ilaç, lezyonlara daha fazla oranda penetre olabilir (Nazzaro-Porro, 1987). Akne tedavisindeki etkinliği ilk olarak tedaviden 1-2 ay sonra saptanabilen azelaik asidin maksimum etkinliğine ise 4. ayın sonunda ulaşılabilmektedir (Katsambas ve ark., 1989).

Topikal azelaik asit, epidermis ve dermişte % 10`a kadar biyoyararlanıma sahiptir (Fala). Topikal uygulamadan sonra azelaik asit kreminin veya jelin yaklaşık % 4`ü sistemik olarak emilir (Fala). Beta oksidasyona uğrayarak daha kısa zincirli dikarboksilik asitlere dönüşebilen AA`nın idrardan atılımı genellikle orijinal formda olmaktadır (Fala). Topikal azelaik asidin yarı ömrü yaklaşık 12 saattir ve hasta tarafından endişe duyulan bölgeye günde iki kez uygulanmalıdır. Olumlu sonuçlar tipik olarak akne vulgarisli hastalarda 4 hafta içinde ve papülopüstüler rosacea hastalarında 12 hafta içinde görülmektedir (Fala).

1.3.7. AA`nın yan etkileri

Topikal azelaik asit ürünleri ile ilgili olarak hafif ve geçici yan etkiler bildirilmiştir. *Rozasea* için kullanılan % 15 AA içeriğine sahip jelin (*Finacea jel*) yan etkileri arasında; yanma, batma/karıncalanma (% 29), kaşıntı (% 11), kireçlenme/kuru cilt (% 8) ve kızarıklık/tahriş (Fala) bulunmaktadır. *Akne vulgaris* için kullanılan % 20 içeriğine sahip krem (*Azelex*) de benzer yan etkilere sahip olmakla birlikte; bu etkiler klinik çalışmalarda daha az yaygın olarak belirtilmiştir: hastaların % 1-5`inde kaşıntı, yanma, batma ve karıncalanma ve hastaların % 1'inden daha azında kızarıklık, kuruluk, döküntü, soyulma, tahriş, dermatit görülmüştür (Fala). % 15 AA içeriğine sahip köpüğün (*Finacea köpüğü*) klinik deneyleri için de benzer yan reaksiyonlar bildirilmiştir.

1.3.8. AA`ya alternatif tedavi ajanları/yöntemleri

Şu an itibariyle, azelaik asit ile aynı etki mekanizmasına sahip olduğu bilinen başka bir etkin madde yoktur. Bununla birlikte; *akne vulgaris* tedavisinde kullanılabilecek topikal ve oral retinoidler, oral ve topikal antibiyotikler, benzoil peroksit, topikal dapson, salisilik asit, fotodinamik terapi, lazerler ve peeling gibi pek çok tedavi ajanları da bulunmaktadır. Antibiyotikler, benzoil peroksit ile kombinasyon halinde kullanılmadığında direnç geliştirdiklerinden tek başlarına tedavi amaçlı kullanılmamalıdırlar. Ayrıca azelaik asit, hamilelerde *akne vulgaris* için etkili bir monoterapi ajanıdır (Chien ve ark., 2016).

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. OA Eldesi ile İlgili Çalışmalar

(Mularczyk ve Drzymala, 1989) tarafından yapılan çalışmada, oleik asidin uzun zincirli yağ asitlerinden ayrılması için; fraksiyonlu damıtma ve aseton & metanolden kristallendirme işlemlerinin kombinasyonunu içeren bir yöntem tanımlanmıştır. Uygulanan yöntem beş basamaktan oluşmaktadır: ***(i)*** yağ asidi karışımı içerisindeki palmitik asidin kristalizasyon yöntemi ile kısmi ayrılması için numunenin 4 ° C'ye soğutulması, ***(ii)*** laurik ve miristik asitlerin uzaklaştırılması için düşük basınçta (0.8 mm Hg) damıtma işleminin gerçekleştirilmesi, (iii) stearik ve palmitik asidin -25 ° C'de asetondan kristalizasyonu, ***(iv)*** oleik asidin, palmitoleik ve linoleik asitlerden ayrılması için -10 °C'de sulu metanol çözeltisinden kristalizasyonu, ***(v)*** su ve metanolün uzaklaştırılması için, elde edilen ürünün (oleik asit) indirgenmiş basınçta (0,5 mm Hg) damıtılması. Araştırmacılar söz konusu prosedürün, literatürde sunulan diğer yöntemlere kıyasla çok daha basit olduğunu ve yukarıda belirtilen işlem basamaklarının sırasının, elde edilecek oleik asit saflığını artırma açısından çok da önemli olmadığını vurgulamışlardır. Bu prosedürün kullanılması ile; % 82 oleik asit içeren bir numune, % 98,7-98,9 oleik asit içeren bir ürüne dönüştürülmüştür.

(Swern ve Parker, 1952) tarafından yapılan çalışmada, hayvansal yağ asitlerinin ayrılması için, bazı tipik yenmeyen don yağı ve greslerin yağ asidi kompozisyonunu simüle etmek için tasarlanmış, saf yağ asitlerini içeren (% 3 miristik asit, % 30 palmitik asit, % 15 stearik asit, % 45 OA, % 7 linoleik asit) bir model karışım kullanılmıştır. Ayırma işlemi için bu model karışımdan 20 g tartılarak, % 90 metanol: % 10 su karışımı içinde çözülmüş, elde edilen çözelti 0 °C`ye kadar soğutularak, 8,4 g ağırlığında, 54-55 °C erime noktasına ve 1,7 iyot sayısına sahip (değerler stearik aside karışık gelmektedir) parlak kristaller elde edilmiştir. Süzme işlemi sonrası elde edilen süzüntüye 45 g üre eklenmiş ve karışım üre çözününceye kadar ısıtılmıştır. Sonra çözelti oda sıcaklığına kadar soğumaya bırakılmış ve oluşan 33 g katı üre kompleksinin süzme işlemi ile ayrılması sağlanmıştır. Kopleks üzerine sıcak su ilavesi yapıldığında, 8,2 g ağırlığında, iyot sayısı 73 olan renksiz bir sıvı asit elde edilmiştir (bileşim: % 78 OA, % 20 doymuş asitleri, % 2 linoleik asit). Üre ile kompleks olarak çöken OA verimi % 70 olarak tespit edilmiştir. Daha sonra, üre kompleksinin süzülmesi ile elde edilen süzüntü kuruluğa kadar buharlaştırılmış, mevcut üreyi çözmek için sıcak su ilave

edildikten sonra, sıvı asitler sulu çözeltiden eterle ekstrakte edildi. Eterin buharlaştırılması ile 3,4 g ağırlığında, iyot sayısı 121 olan bir ürün elde edilmiştir (bileşim: % 48 linoleik asit, % 37 OA ve % 15 doymuş asitleri). Üre ile kompleks oluşturan yağ asitlerinin distilasyonunda, en fazla doymuş yağ asidinin palmitik asit olduğu görülmüş, OA da % 90`dan daha iyi saflıkta elde edilmiştir. Araştırmacılar 1958 yılında, söz konusu çalışma yöntemini patentlemeyi de başarmışlardır.

(Kar, 2009) tarafından yapılan çalışmada, yüksek linoleik asit içeriğine sahip olan mısır yağından alkali izomerizasyon reaksiyonu ile gıda ve farmasötik alanlarda destek maddesi olarak kullanılabilecek konjuge linoleik asit (Mazurek ve Pierzchała) bakımından zengin bir ürünün elde edilmesi ve optimum reaksiyon koşullarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada, linoleik asidin alkali izomerizasyon reaksiyonu ile KLA'ya dönüşümü üzerine sıcaklık, zaman ve katalizör miktarı gibi parametrelerin etkileri incelenmiş ve optimum reaksiyon şartları; sıcaklık: 140 ºC, katalizör konsantrasyonu: 5 M ve reaksiyon süresi: 4 saat olarak tespit edilmiştir (bu şartlarda % 50,1 oranında KLA içeren bir izomerizasyon ürünü elde edilmiştir). Daha sonra, belirlenen optimum reaksiyon koşullarında elde edilen izomerizasyon ürününün üre fraksiyonlama yöntemi ile KLA'ca zenginleştirilmesi üzerinde çalışılmış ve en yüksek verimin; üre-yağ asitleri oranı: 2,5 ve üre-etanol oranı: 7 oranında olduğu zaman elde edildiği görülmüştür (bu koşullarda, gıda ve farmasötik amaçlar için uygun % 68 KLA içeren bir ürün elde edilmiştir).

(Özmen, 2013) tarafından yapılan çalışmada, omega-3 ve omega-6 yağ asitleri içeriği bakımından zengin olan *Echium vulgare* tohum yağından, üre fraksiyonlama yöntemi ve enzimatik yöntem ile çoklu doymamış yağ asidi (ÇDYA) konsantresi elde edilmeye çalışılmış ve reaksiyon koşulları tepki-yüzey yöntemi ile optimize edilmiştir. Üre fraksiyonlama çalışmaları için gerçekleştirilen optimizasyon çalışmalarında, üç seviyeli ve iki değişkenli bir merkezi kompozit tasarımı metodolojisi kullanılmış, cevap değeri olarak gama-linolenik asit ve stearidonik asit (SDA) konsantrasyonu seçilirken, kristalizasyon süresi (8-24 saat), üre:yağ asidi oranı (3-5:1 ağ/ağ) bağımsız değişkenler (faktör) olarak seçilmiştir. Modelden elde edilen veriler ile optimum reaksiyon koşulları üre:yağ asitleri oranı 5:1 (ağırlıkça), kristalizasyon süresi 8 saat olarak belirlenmiştir. Bu koşullar altında *Echium vulgare* tohum yağından %52,6 GLA ve SDA içeren ürün elde edilmiştir. Bu değerin modelden tahminlenen GLA ve SDA (50,2%) miktarı ile benzer olduğu görülmüştür. Deneyler sonucunda seçilen cevap değeri [GLA ve SDA

miktarı (%)] için kuadratik model elde edilmiş ve üre fraksiyonlama yöntemi için model katsayısı, (R^2) 0,85 olarak belirlenmiştir. Çalışmanın ikinci kısımında ise *Echium vulgare* tohumu yağından çoklu doymamış yağ asidi konsantresi üretimi için enzimatik hidroliz ve enzimatik esterifikasyon reaksiyonlarını içeren iki basamaklı enzimatik yöntem kulanılmıştır. Enzimatik hidroliz reaksiyonu spesifik olmayan Novozyme-435 ile 60°C'de 250 rpm çalkalama hızına sahip su banyosunda 48 saatte gerçekleştirilmiştir. Enzimatik hidroliz reaksiyonu sonucunda elde edilen yağ asitleri enzimatik esterifikasyon reaksiyonlarında kullanılmıştır. Enzimatik esterifikasyon reaksiyonlarının optimizasyonu için lauril alkol:yağ asidi oranı (1:1-3:1 mol/mol), reaksiyon süresi (8-16 saat) ve reaksiyon sıcaklığı (50-60°C) bağımsız değişkenler olarak seçilirken, cevap değeri olarak GLA ve SDA konsantrasyonu seçilmiştir. Modelden elde edilen veriler değerlendirildiğinde optimum reaksiyon koşulları; lauril alkol oranı:yağ asidi (1:1mol/mol), reaksiyon süresi 16 saat ve reaksiyon sıcaklığı 50°C olarak belirlenmiştir. Bu koşullar altında *Echium vulgare* tohum yağından %72,3 verimle %60,5 GLA ve SDA içeren ürün elde edilmiştir. Bu değerin modelden tahminlenen GLA ve SDA (59,5%) miktarı ile benzer olduğu görülmüştür. Deneyler sonucunda seçilen cevap değei [GLA ve SDA miktarı (%)] için kuadratik model elde edilmiş ve enzimatik esterifikasyon yöntemi için model katsayısı, (R^2) 0,84 olarak belirlenmiştir. Elde edilen çalışma sonuçları değerlendirildiğinde; ÇDYA eldesinde kullanılan enzimatik yöntemin yüksek verimli bir yöntem olduğu, enzimatik yöntemin ardından üre fraksiyonlama reaksiyonu uygulandığı zaman ise, daha yüksek konsantrasyonda ve verimde ürünler elde edebildiği tespit edilmiştir.

(Bahadi ve ark., 2019) tarafından yapılan çalışmada, palm yağ asidi karışımlarından metanol kristalizasyonu ile doymamış yağ asitleri elde edilmeye çalışılmıştır. Doymamış yağ asitlerinin ayrılması, tepki yüzeyi yöntemi aracılığıyla optimize edilmiş ve optimal bir model geliştirilmiştir. Çalışma için optimum deneysel şartlar şöyledir; metanol-yağ asitleri oranı: 15:1 (mL:g), kristalizasyon sıcaklığı: -15 ° C, kristallendirme süresi: 20,8 saat. Söz konusu şartlar altında elde edilen doymamış yağ asitleri yüzdesinin, % 55,2±0,8 ürün yüzdesi verimi ile % 95±0,3`ten yüksek olduğu görülmüştür. Palm yağ asidi karışımlarından izole edilen doymamış yağ asidi bileşiminin % 76,3 OA (C18:1), % 18,3 linoleik asit (18:2) ve % 0,2 linolenik asitten (C18:3) oluştuğu, sadece % 4,9±0,3 doymuş yağ asidi içerdiği tespit edilmiştir. Serbest yağ asitlerinden ayrılan doymamış yağ asitleri için, iyot değerinin 54,0±0,1 mg/g`dan

94,4±0,2 mg/g`ye yükseldiği görülmüştür. Sonuçlar, düşük sıcaklıkta metanol kristalizasyonunun çok aktif, düşük maliyetli, kararlı ve doymamış yağ asitlerinin bir yağ asitleri yağ karışımından ayrılması için nispeten kolay olduğunu göstermiştir.

(Japir ve ark., 2018a) tarafından yapılan çalışmada, metanolle kristallendirme yöntemi kullanılarak, ham palm yağına ait doymuş yağ asitleri karışımından (SFAs), palmitik asidin (PA) ayrılması için parametrelerin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Metanolle kristallendirme koşulları, D-optimal dizayn yöntemi kullanılarak tepki-yüzey metodolojisi (RSM) ile optimize edilmiştir. Yağ asit kompozisyonları, yağ asidi metil esterlerinin (FAME) bir gaz kromatografisi-alev iyonlaşma detektörü (GC-FID) cihazında analiz edilmesi ile belirlenmiştir. En yüksek SFA yüzdesi, yağ asitleri / metanol oranının 1: 20 (w/v), kristalizasyon sıcaklığının -15 °C ve kristallendirme süresinin 24 saat olduğu optimal şartlarda, %87,5 verimle, % 96`dan daha fazla olarak tespit edildi. Katı fraksiyondaki ayrılmış SFA`ların bileşiminin, ana bileşen olan % 96,7 palmitik asit (C16:0) ve % 3,3 stearik asitten (C18: 0) oluştuğu görülmüştür. Elde edilen sonuçlar; yüksek verim, düşük maliyet, stabilite, kullanılabilirlik, karşılaştırmalı geri kazanım kolaylığı ve iyi filtreleme & yıkama özelliklerine sahip iğne şeklinde kristaller oluşturma kabiliyeti nedeniyle, metanolün bir kristalizasyon çözücüsü olarak kullanılmasının tavsiye edilebileceğini göstermiştir.

(Japir ve ark., 2018b) tarafından yapılan çalışmada, metanolle kristallendirme yöntemi kullanılarak, ham palm yağına ait yağ asitleri karışımından, doymuş yağ asitlerinin (SFAs) ayrılması amaçlanmıştır. Yağ asit kompozisyonları, yağ asidi metil esterlerinin (FAME) bir gaz kromatografisi-alev iyonlaşma detektörü (GC-FID) cihazında analiz edilmesi ile belirlenmiştir. En yüksek SFA yüzdesi, yağ asitleri / metanol oranının 1: 15 (w/v), kristalizasyon sıcaklığının -15 °C ve kristallendirme süresinin 24 saat olduğu optimal şartlarda, %48,9 verimle, % 89`dan daha fazla olarak tespit edilmiştir. Çift kristalizasyondan sonra, ayrılmış SFA`ların bileşiminin, ana bileşen olan % 90 palmitik asit (C16:0) ve % 5,8 stearik asitten (C18:0) oluştuğu tespit edilmiştir. Ayrıca, doymuş katı üründe yaklaşık % 4,2 OA (C18:1) içeriğine rastlanmıştır. Elde edilen sonuçlara dayanarak; yüksek verim, düşük maliyet, kararlılık, elde edilebilirlik ve karşılaştırmalı geri kazanım kolaylığı nedeniyle, bir kristalizasyon çözücüsü olarak metanolün kullanılması, araştırmacılar tarafından tavsiye edilmiştir.

(Brown ve Shinowara, 1937) tarafından yapılan çalışmada, herhangi bir sabunlaştırma prosedürü kullanılmadan, zeytinyağındaki yağ asitlerinin doğrudan

kristalizasyonu ile oleik asit elde edilmeye çalışılmıştır. Zeytinyağındaki yağ asitlerinin üç çözünürlük grubuna ait olduğunun (daha yüksek doymuş asitler, oleik asit ve linoleik asit) varsayıldığı çalışmada; 225 g zeytinyağı numunesi 3450 mL asetonda çözülmüş ve kristallenmesi için -20 °C`de 1 gece boyunca bekletildikten sonra süzülmüştür. Bu işlemden elde edilen süzüntü -60 °C`ye soğutulmuş ve kuru bir buz-alkol banyosunda tekrar süzme işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kristal fraksiyonları, her seferinde 2000 mL aseton ilave edilmesi suretiyle 3 kez daha kristalizasyon işlemine tabi tutulmuştur. Bu prosedürde, daha fazla çözünür özellikte olan linoleik asit, süzüntüde kalmıştır. -60 °C'de gerçekleştirilen dört kristallendirme işleminden sonra, ürün (kristaller) aseton ile 1250 mL `ye tamamlanmış ve kristallerin ilk oluşumunu görmek için yaklaşık -35 C`ye kadar yavaşça soğutulmuştur. Bu işlemden elde edilen kristallerin büyük ölçüde oleik asit olduğu tespit edilmekle birlikte, -20 °C'de gerçekleştirilen ilk ayırma işleminde uzaklaştırılamayan bazı doymuş yağ asitlerinin de kristal yapısında bulunduğu belirlenmiştir. Süzüntüde kalan ürünün de oleik asit olduğu, benzer bir prosedürle elde edilen başka bir numunenin (-60 °C`de altı kristalizasyon işleminden geçrilen) analitik sabitleri ile yapılan karşılaştırma neticesinde belirlenmiştir.

2.2. AA Eldesi ile İlgili Çalışmalar

(Shi ve ark., 2013) tarafından yapılan çalışmada, OA`nın AA `ya dönüştürülmesinde ozon ve hidrojen peroksit oksidan olarak kullanılmış, hidrojen peroksit hacmi ve konsantrasyonu, ozon hacmi ve konsantrasyonu gibi önemli faktörlerin söz konusu proses üzerine olan etkileri incelenmiştir. Araştırmacılar 20 g OA; 0,6 g fosfotungstik asit ve 60 mL %30 hidrojen peroksit kullanılması ile 70 °C de 8 saat boyunca gerçekleştirdikleri deneyler sonunda %71 oranında bir AA verimi elde etmişlerdir.

(Lazim ve ark., 2008) tarafından yapılan çalışmada, küresel yapıda ve nanoboyutta WO_3 (tip 1 ve tip 2), CTAB yüzey aktif madde aracılı yöntemler kullanılarak hazırlanmıştır. Elde edilen WO_3 nanopartiküllerinin katalitik aktivitesi, OA`nın ozonoliz reaksiyonu için test edilmiş ve bulk WO_3 ve ticari WO_3 nano tozunun aktivitesi ile karşılaştırılmıştır. Üretilen WO_3 katalizörlerinin, pelargonik ve AA üretmeye yönelik seçiciliklerinin şu sırada azaldığı görülmüştür: tip 2 WO_3> tip 1 WO_3> bulk WO_3> ticari nano toz WO_3. Reaksiyonlar için elde edilen % verim değerlerinin ise şu sırada azaldığı görülmüştür: tip 2 WO_3> bulk WO_3> tip 1 WO_3>

ticari nano WO_3. Elde edilen sonuçlar, sentezlenen nano ölçekli WO_3 numunelerinin her ikisinin de, söz konusu ozonoliz reaksiyonu için kullanılan ticari WO_3 nano toz ve bulk WO_3`ten daha seçici olduğunu göstermiştir.

(Benessere ve ark., 2015) tarafından yapılan çalışmada, AA`nın üretimi ve saflaştırılması için mevcut yöntem olarak yer alan, OA ozonizasyonu prosesinin yerine kullanılabilecek iki sürdürülebilir yöntem açıklanmıştır. Bunlardan birincisi, OA'nın sodyum hipoklorit ile oksidatif parçalanması ve 9,10-dihidroksistearik asit (DSA) oluşturmasını içeren iki basamaklı bir proses iken, önerilen diğer alternatif metot, OA`daki çift bağın doğrudan oksidatif bölünmesi için 373 K sıcaklıkta, H_2O_2/H_2WO_4'ten oluşan bir kemokatalitik sistemin kullanılmasıdır.

(Kadhum ve ark., 2012) tarafından yapılan çalışmada, herhangi bir çözücü veya katalizör kullanılmaksızın, bir köpürme reaktöründe OA`nın yüksek sıcaklıkta doğrudan ozonlanması ile AA üretimi gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon, yüksek sıcaklıkta (150 °C), ince kabarcıklar üreten Bach kabarcıklama reaktöründe gerçekleştirilmiş ve 2 saat sonunda % 20 civarında bir reaksiyon verimi elde edilmiştir. AA üretimi, spektroskopik FT-IR ve ^{1}H-NMR verilerinin yanı sıra, hem sentezlenen hem de referans AA için gerçekleştirilen yüksek performanslı sıvı kromatografisi verilerinin de kullanılması ile doğrulanmıştır. Ayrıca, AA için kuantum kimyasal verilerin elde edilmesi ve molekül geometrisinin optimizasyonu için de teorik bir çalışma yapılmıştır.

(Ghoreishi ve ark., 2012) tarafından yapılan çalışmada, nanokompozit V_2O_5-polianilin (pani), bir katyonik yüzey aktif madde (setiltrimetil amonyum bromür, CTAB) ve vanadil sülfat hidrat kullanılarak misel çözeltisi yoluyla üretilmiş (TEM sonuçları, 20-70 nm büyüklüğünde V_2O_5-pani nanokompozitinin misel çözeltisi ile oluştuğunu göstermiştir) ve üretilen bu kompozit, OA`nın çözücü içermeyen bir ortamda bölünmesi ile AA ve PA elde edilmesinde katalizör olarak kullanılmıştır. GC`de gerçekleştirilen analizler sonunda; katalizör olarak kullanılmak üzere elde edilen nanokompozitin, sadece V_2O_5 kullanıldığı zamankine kıyasla AA'ya iki kat daha fazla seçici olduğu (sırasıyla % 53 ve % 28) tespit edilmiş, ayrıca nanokompozitin, nano V_2O_5`ye kıyasla AA ve PA'ya daha yüksek seçicilik gösterdiği (% 53`e kıyasla % 32) belirlenmiştir. V_2O_5`in poyaniline göre daha yüksek ağırlık yüzdesinde olduğu durumlarda, OA`nın ozonizasyon reaksiyonu sonundaki AA ve PA`ya dönüşümünün daha yüksek olduğu görülmüştür (Criegee mekanizmasına göre). OA`nın ozon absorpsiyonu FT-IR ile, katalizörün aktivitesi ve seçiciliği ise GC-FID ile izlenmiştir.

(Köckritz ve ark., 2010) tarafından yapılan çalışmada, metil oleat ve OA`nın Os katalizli oksidasyonu için, oksidasyon sistemi olarak $O_2$/aldehit`in kullanıldığı farklı reaksiyon yolları tartışılmıştır. Monometil azelat ve PA, söz konusu reaksiyonlarda metil oleattan başlayarak yaklaşık % 50-70'lik verimle elde edilen ana ürünler iken, değişen miktarlardaki metil 9,10-epoksistearat ve metil 9,10-dihidroksistearat da yan ürünler olarak bulunmuştur. Araştırmacılar, AA ve PA reaktant olarak sadece OA`den elde edildiğini belirtmekle birlikte, gözlenen ürünlerin paralel reaksiyon yollarında meydana geldiğini gösterir bulgulara rastlandığını da vurgulamışlardır. Bu bağlamda, OA`de bulunan C=C çift bağının bölünmesinde etkin rol oynayan oksidanın, O_2/aldehit tarafından Os katalizli oksidasyon reaksiyonu sırasında ortamda oluşan perasit olması muhtemel görülmüştür. OA ve metil oleatın bölünmesine ilişkin ek araştırmalar, H_2O_2/formik asit ortamında gerçekleşen bölünme reaksiyon sırasında meydana gelen performik asit oluşumunun, bu varsayımı desteklediğini göstermiştir.

(Köckritz ve ark., 2010) tarafından yapılan çalışmada, metil oleat ve OA`nın Os katalizli oksidasyonu için, oksidasyon sistemi olarak $O_2$/aldehit`in kullanıldığı farklı reaksiyon yolları tartışılmıştır. Monometil azelat ve PA, söz konusu reaksiyonlarda metil oleattan başlayarak yaklaşık % 50-70'lik verimle elde edilen ana ürünler iken, değişen miktarlardaki metil 9,10-epoksistearat ve metil 9,10-dihidroksistearat da yan ürünler olarak bulunmuştur. Araştırmacılar, AA ve PA reaktant olarak sadece OA`den elde edildiğini belirtmekle birlikte, gözlenen ürünlerin paralel reaksiyon yollarında meydana geldiğini gösterir bulgulara rastlandığını da vurgulamışlardır. Bu bağlamda, OA`de bulunan C=C çift bağının bölünmesinde etkin rol oynayan oksidanın, O_2/aldehit tarafından Os katalizli oksidasyon reaksiyonu sırasında ortamda oluşan perasit olması muhtemel görülmüştür. OA ve metil oleatın bölünmesine ilişkin ek araştırmalar, H_2O_2/formik asit ortamında gerçekleşen bölünme reaksiyon sırasında meydana gelen performik asit oluşumunun, bu varsayımı desteklediğini göstermiştir.

(Ab Rani ve ark., 2008b) tarafından yapılan çalışmada, OA`nın ozonizasyon reaksiyonu bir V_2O_5 katı faz katalizörünün boyutunun ve şeklinin etkisi; V_2O_5 nano çubuklar, V_2O_5 nanoparçacıklar ve bulk V_2O_5 kullanılarak araştırılmıştır. AA ve PA üretiminin gerçekleştirildiği katalitik reaksiyon sonuçları, V_2O_5 nanoçubukların, azealik asit için en yüksek seçiciliğe (% 83) sahip olduğunu göstermiştir. V_2O_5 nanoparçacıklarının AA ve PA için seçiciliği sırasıyla; % 37,3 ve % 33,3 olarak

bulunurken, bulk V_2O_5`in AA ve PA için seçiciliği ise sırasıyla; % 48.3 ve % 5.2 olarak tespit edilmiştir.

(Reynolds ve ark., 2006) tarafından yapılan çalışmada, bir çözeltideki OA`nın (cis-9-oktadekanoik asit) ozonizasyonu reaksiyonunda açığa çıkan ürünler, negatif iyon modunda, elektrosprey iyonizasyon - iyon tuzağı kütle spektrometresi kullanılarak incelenmiştir. Araştırmacılar, atmosferik organik aerosolün önemli bir bileşeni olan 1türü olduğunu dikkate alarak bu çalışmayı gerçekleştimişlerdir. Çalışma sonunda, öngörülen dört reaksiyon ürünü; *1-nonanal, nonanoik asit, 9-oksononanoik asit* ve *AA,* kabaca eşit verimlerde gözlenmiştir. Bu ürünlere ek olarak, 1000 Dalton'a kadar m/z oranları ile çok sayıda daha yüksek moleküler ağırlıklı bileşik tespit edilmiştir. Bu daha büyük iyonların tandem kütle spektrometrisi, ozonoliz ürünleri ve Criegee ara maddeleri arasındaki reaksiyonlar sonucu oluşan doğrusal R-asiloksialkil hidroperoksitler, ikincil ozonidler ve siklik diperoksidlerin karmaşık bir karışımını temsil ettiklerini ortaya koymuştur. Bunlar, OA`nın ozonizasyondan açığa çıkan büyük oligomerik türlerin ilk doğrudan aydınlatılmış yapılarıdır. Oligomerizasyon derecesinin ve dolayısıyla moleküler ağırlık dağılımının, reaksiyon süresi ile çözelti içersinde arttığı gözlenmiştir.

(Masyithah ve ark., 2017) tarafından yapılan çalışmada, oksitleyici ajan olarak hidrojen peroksit (H_2O_2) ve katalizör olarak tungstik asidi (H_2WO_4) kullanılarak, OA`nın oksidasyonu ile AA sentezi gerçekleştirilmişlerdir. Çalışmada, oksitleyici olarak H_2O_2/H_2WO_4 ile daha etkili, seçici ve çevre dostu bir yöntem geliştirmenin yanı sıra, iyot sayısının yüzde dönüşümü üzerine değişken karşılaştırma etkisinin önemi ve korelasyonu da belirlenmiştir. Araştırmacılar, maksimum AA verimi elde edebilmek için, deneylerdeki substrat mol oranı, yüzde katalizör ve sıcaklık gibi parametrelerin birbiriyle olan etkileşimlerinin etkisini, Merkezi Kompozit Tasarım (CCD) ve Tepki Yüzeyi Metodolojisi (RSM) kullanarak tespit etmeye çalışmışlardır. Elde ettikleri sonuçlar, tüm değişkenlerin iyot sayısının yüzde dönüşümü üzerinde etkili olduğunu (R^2= % 92.08) ve varyans analiz sonuçlarında yer alan tüm modellerin dönüşüm yüzdesine önemli ölçüde katkıda bulunduğunu göstermiştir. Deneylerdeki oksidatif parçalanma reaksiyonu, iyot sayısındaki azalma ile kanıtlanmış ve reaksiyon ürünü, fourier transform-kızılötesi spektroskopisi (FT-IR) ile analiz edilmiş ve iyot sayısındaki en çok azalmanın (% 99.12), substrat oksidan mol oranının 1:8, (OA/H_2O_2) ve katalizör substrat mol oranın % 3 (H_2WO_4/OA) olduğu şartlarda meydana geldiği gözlenmiştir. Ayrıca araştırmacılar, elde ettikleri madde üzerinde biyouyumluluk testleri

gerçekleştirmişler ve gerek geri dönüştürülebilir özellikte bir katalizör kullanmış olmaları gerekse açığa çıkan atığın toksik olmaması sebebiyle kullandıkları metodun çevre dostu bir metot olduğunu belirtmişlerdir.

(Godard ve ark., 2013) tarafından yapılan çalışmada, emülsifiye edici bir sistem aracılığıyla OA'nın oksidatif olarak parçalanması ile bir mono karboksiliksik asit olan PA ve dikarboksilik asit olan AA`nın elde edilmesi amaçlanmıştır. AA ve PA üretiminde geleneksel bir yöntem olarak kullanılan OA ozonizasyonun birçok dezavantaja sahip olması sebebiyle, sunulan çalışma çevre dostu alternatif bir yöntem olarak önerilmiştir. Çalışmada OA, bir oksidan olan hidrojen peroksit (H_2O_2, % 30) ve bir faz transfer katalizörü (yardımcı oksidan) olan perokso-tungsten kompleksini $Q_3\{PO_4[WO(O_2)_2]_4\}$ içeren iki fazlı (organik-su) bir kesikli reaktör içinde okside edilmiştir. Çalışmada, tungstofosforik asit, H_2O_2 ve farklı kuaterner amonyum tuzları (Q^+, Cl^-) kullanılarak birçok faz transfer katalizörü hazılanmış, prosese ait parametrelerin optimizasyonu için en iyi sonuçların $[C_5H_5N(n\text{-}C_{16}H_{33})]_3\{PO_4[WO(O_2)_2]_4\}$katalizörü kullanılması ile elde edildiği tespit edilmiştir. Optimizasyon şartlarını içeren $OA/H_2O_2/[C_5H_5N(nC_{16}H_{33})]_3\{PO_4[WO(O_2)_2]_4\}$ (1/5/ 0.02 mol oranı) sisteminin kullanıldığı, 85 °C`de 5 saat boyunca devam eden deneyler sonunda, >% 80 üzerinde bir verimle OA'nın AA ve PA`ya dönüştüğü gözlenmiştir. Ayrıca çalışmada, deneylerde kullanılan katalizörün geri kazanılması için de yeni bir prosedür geliştirilmiştir.

(Enferadi-Kerenkan ve ark., 2017) tarafından yapılan çalışmada, tungsten tozu öncü olarak kullanılarak, çevre dostu (yeşil) ve kolay bir yaklaşımla bir dizi tungsten oksit nanoparçacığı (NPs) sentezlenmiştir. Sentezlenen NP`ler, yüzey özelliklerinin ayarlanması ve bitkisel yağların H_2O_2 ile iki fazlı oksidasyon uyumluluğunun artırılması amacıyla, setiltrimetilamonyum bromür (CTAB) ile organo-fonksiyonelleştirilmiştir. Sentez çalışmaları sonunda farklı tungsten oksit yapıları elde edilmiş ve yapılar XRD, FTIR, TGA, TEM, N_2 adsorpsiyon/desorpsiyon izotermleri ve zeta potansiyel analizi ile karakterize edilmiştir. Sentezlenen tüm nanokatalizörlerin, OA`nın tamamen dönüştürebildiği gözlenmiş, elde edilmesi istenen diasitin (AA) en yüksek üretim verimi, ~% 80, daha önce rapor edilen heterojen çalışmalara kıyasla mükemmel aktivite gösteren, nanokatalizör yüzeyindeki CTA^+ miktarının optimizasyonu ile elde edilmiştir. Organo-fonksiyonilizasyon sayesinde, bu su toleranslı katalizör, en az dört döngüye kadar, aktivitede gözle görülür bir azalma olmadan uygun

geri kazanım ve sürekli yeniden kullanım sergilemesinin yanı sıra, önemli bir sızma da göstermemiştir.

(Brenna ve ark., 2020) tarafından yapılan çalışmada, OA`nın AA ve PA`ya dönüştürülmesi için kemo-enzimatik bir yaklaşım tanımlanmıştır. Endüstriyel ölçekte kullanılagelen ozonizasyon yöntemine alternatif olarak önerilen metot ile, üç basamak sonunda (kolon kromatografisine gerek duyulmamıştır) % 44 izolasyon verimine sahip yüksek kimyasal saflıkta AA elde edilmiştir. Metodun ilk basamağını, oksiran türevine karşılık gelen doymamış asidin kendi kendine epoksidasyonu için, peroleik asidin, % 35 H_2O_2 varlığında lipaz aracılığı ile üretimi oluştururken, elde edilen bu ara madde 9,10-dihidroksi stearik asit elde etmek için, asit katalizli bir ortamda parçalama işlemine tabii tutulmuştur. Sitokiyometrik bir oksidan olarak atmosferik oksijenin ve katalitik miktarda $Fe(NO_3)_3 \cdot 9 \cdot H_2O$, (2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-il) oksil (TEMPO) ve NaCl`ün kullanıldığı diol türevlerinin kimyasal oksidasyonu basamağı ise, herhangi bir katalizör kullanımına gerek duyulmadan, yaklaşık % 35 $H_2O_2$`nin kullanılması ile 9,10-dioksostearik asidin parçalanması sonucu pelargonik ve AA eldesini içermektedir.

(Capuzzi ve Digioia, 2020) tarafından patentlenen çalışmada, birden fazla fonksiyonel asit grubuna sahip olan trigliseritlerin hidrolizi ile dikarboksilik asitler saflaştırılmaya çalışılmıştır. Proses, bir kısım gliserinin, sulu bir fazda gerçekleştirilen hidroliz ürünlerinden ayrılmasını, elde edilen organik fazın buharlaştırılmasını ve/veya damıtılmasını ve buharlaştırılmış ve/veya damıtılmış dikarboksilik asitlerin en azından bir kısmının en az bir kristalleştirme işlemi ile geri kazanılmasını içermektedir. Proseste başlangıç malzemesi olarak yüksek oleik içeriğe sahip bir yağ kullanıldığında; organik fazın, başta AA ve PA olmak üzere, palmitik, stearik ve dihidroksi stearik asit içerdiği bildirilmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasallar

Sabunlaştırma prosedürü, titrimetrik analizler, numune hazırlama işlemleri, sentez reaksiyonları, saflaştırma basamakları ve karakterizasyon analizleri gibi çalışmalarda teknik özellikte (saflık derecesi >% 95) kimyasal ve çözücüler kullanılmış, HPLC ve GC`de gerçekleştirilen kromatografik analizlerde ise kromatografik saflıktaki kimyasal ve çözücülerden faydalanılmıştır. Deneylerde kullanılan tüm kimyasallar Merck ve Sigma firmalarından temin edilmiştir.

Tablo 3.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasallar

Zeytinyağı Numunelerinin Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi	
Serbest Yağ Asidi (%FFA) Tayini	**Peroksit Sayısı (PV) Tayini**
➢ NaOH (Sodyum hidroksit)	➢ $Na_2S_2O_3$ (Sodyum tiyosülfat)
➢ C_2H_5OH (Etanol)	➢ KI (Potasyum iyodür)
➢ Fenolftaleyn (PHP) indikatörü	➢ $CHCl_3$ (Kloroform)
➢ KOH (Potasyum hidroksit)	➢ CH_3COOH (Asetik asit)
➢ $C_4H_{10}O$ (Dietil eter)	➢ Nişasta (% 1`lik saf suda)
İyot Sayısı Tayini	**Sabunlaşma Sayısı Tayini**
➢ $Na_2S_2O_3$ (Sodyum tiyosülfat)	➢ H_2SO_4 (Sülfirik asit)
➢ Wijs çözeltisi	➢ C_2H_5OH (Etanol)
➢ CCl_4 (Karbon tetra klorür)	➢ KOH (Potastum hidroksit)
➢ KI (Potasyum iyodür)	➢ Fenolftalein (% 1`lik etanolde)
➢ Nişasta (% 1`lik saf suda)	
Yağ Asit Kompozisyonu Analizi	
➢ C_6H_{14} (Hekzan)	➢ KOH (Potastum hidroksit)
➢ CH_3OH (Metanol)	➢ Na_2SO_4 (Sususz sodyum sülfat)
Zeytinyağı Numunelerinden Serbest Yağ Asitlerinin Eldesi	
➢ Zeytinyağı	➢ HCl (Hidroklorik asit)
➢ C_2H_5OH (Etanol)	➢ C_6H_{14} (Hekzan)
➢ KOH (Potasyum hidroksit)	➢ Na_2SO_4 (Susuz sodyum sülfat)
OA Eldesi	
➢ CH_4N_2O (Üre)	➢ C_3H_6O (Aseton)
➢ C_2H_5OH (Etanol)	➢ C_6H_{14} (Hekzan)
➢ CH_3OH (Metanol)	
AA Eldesi	
➢ $C_{17}H_{33}COOH$ (Oleik asit)	➢ V_2O_5 (Vanadyum pentoksit)
➢ H_2O_2 (Hidrojen peroksit)	➢ X (patentlendirilecek metoda ait çözücü)
➢ H_2WO_4 (Tungstik asit)	➢ $C_4H_8O_2$ (Etil asetat)
➢ WO_3 (Tungsten (VI) oksit)	➢ $CHCl_3$ (Kloroform)

Topikal krem Formülasyonlarının Geliştirilmesi	
➢ $C_3H_4O_2$ (Karbomer)	➢ $C_{58}H_{114}O_{26}$ (Polisorbat-20)
➢ $C_3H_8O_3$ (Gliserin)	➢ $C_7H_6O_3$ (Salisilik asit)
➢ $(C_2H_6OSi)_nC_4H_{12}Si$ (Dimetikon100)	➢ $C_9H_{16}O_4$ (Azelaik asit)
➢ $C_{21}H_{42}O_4$ (Gliserol monostearat)	➢ $C_{29}H_{50}O_2$ (E vitamini)
➢ $C_{16}H_{34}O$ (Setil alkol)	➢ $C_6H_{15}NO_3$ (Triethanolamin, TEA)
➢ C_{10}-H_20-O_2.x-C_8-H_{16}-O_2.x-C_3-H_8-O_3 (Kaprik	➢ Ultra saf su
Diğer Kimyasallar	
Standartlar	**Kromatografik Saflıktaki Çözüler**
➢ $C_{17}H_{33}COOH$ (Oleik asit)	➢ C_2H_3N (Asetonitril)
➢ $C_9H_{16}O_4$ (Azelaik asit)	➢ Ultra saf su
➢ $C_9H_{18}O_2$ (Pelargonik asit)	➢ CH_3OH (Metanol)
➢ 37`lik FAME mix standardı	➢ CH_3COOH (Asetik asit)

3.2. Kullanılan Cihazlar, Kolonlar ve Diğer Ekipmanlar

Deneysel çalışmalarda kullanılan cihazlar, kolonlar ve diğer ekipmanlar marka ve modelleriyle birlikte aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 3.2. Deneylerde Kullanılan Cihazlar

Cihaz	**Marka, Model**
➢ HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi)	➢ Agilent 1200 serisi
➢ GC-FID (Gaz Kromatografisi-Alev İyonlaşma Dedektörü)	➢ Agilent 6890 serisi
➢ GC-MS (Gaz Kromatografisi-Kütle Dedektörü)	➢ Agilent 7890N-5975C
➢ Analitik terazi	➢ VA304 model GEC
➢ Vortex	➢ Isolab Mi0101002
➢ Ultrasonik banyo	➢ KUDOS SK 6GT model
➢ Manyetik karıştırıcı	➢ IKA RCT Classic
➢ pH metre	➢ Orion SA 720 pH meter
➢ Döner buharlaştıcı	➢ Buchi R-210
➢ Vakum pompası	➢ Buchi V-700
➢ Termostatlı ısıtıcı	➢ IKA VT5 S40
➢ Santrifüj	➢ NÜVE NF 400
➢ FT-IR spektrometre	➢ Perkin Elmer
➢ Ozon jeneratörü	➢ Ozonoxi
➢ Ultra saf su cihazı	➢ TKA
➢ Etüv	➢ Mido/2/AC
➢ Otoklav	➢ Nüve/Ot-4060
➢ Mikroplaka okuyucu	➢ BioTek µQuant
➢ Otomatik dispenser	➢ BioTek MicroFill
➢ Mc Farland cihazı	➢ Biosan Den-1
➢ Stabilite Dolabı	➢ Nüve TK120
➢ Viskozimetri	➢ Brookfield Viscometer D 220
Kolonlar	**Marka Model**
➢ C-18 Kolon	➢ ACE-5-C18 (25 cm x 4,6 mm ID)
➢ GC Kolonu/HP-88	➢ Agilent 112-88A7 HP-88 Kapiler, 100m x 250 µm x 0.20 µm nominal
➢ GC Kolonu/5-MS	➢ Agilent 19091S-433, HP-5MS kapiler kolon, 30m x 250 µm x 0.25 µm

Diğer Ekipmanlar	Marka
➢ Geri soğutucu	➢ Isolab
➢ Destilasyon Düzeneği	➢ Isolab
➢ Mikro pipet takımı	➢ Eppendorf
➢ 96 kuyucuklu polisitiren düz tabanlı mikroplaklar	➢ Isolab

3.3. Biyolojik Çalışmada Kullanılan Materyaller

İn-vitro çalışmalarda kullanılan mikroorganizmalar, standart Amerikan tipi kültür koleksiyon (ATCC-American Type Culture Collection) suşudur ve 3, 22, 38 ve 39 kod numaralı suşlar olarak Selçuk Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. Söz konusu mikroorganizmaların beslenme ve üremesi için kullanılan besiyerleri ise Merck firmasından sağlanmıştır.

Çalışmalarda kullanılan mikroorganizmaların adı, suş numaraları ve Amerikan tipi kültür koleksiyon kodları aşağıdaki tabloda özetlenmiştir.

Tablo 3.3. *İn-Vitro* Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar ve Besiyerleri

Mikroorganizmalar	
➢ *Staphylococcus aureus ATCC 25923*	➢ *Staphylococcus epidermidis ATTC 35984*
➢ *Staphylococcus aureus* (MRSA) *ATCC 43300*	➢ *Staphylococcus epidermidis ATTC 12228*
Besiyerleri	
➢ Mueller-Hinton Agar (MHA)	➢ Müeller Hinton Broth (MHB)
İndikatör	**Diğer Kimyasallar**
➢ 2,3,5 Triphenly-tetrazolium chloride (TTC)	➢ C_2H_6OS (Dimetil sülfoksit), DMSO

3.4. Kullanılan Yağlar

Deneylerde zeytinyağı numunesi olarak; Ülkemizdeki bazı yağ firmaları tarafından üretilen natural sızma ve riviera zeytinyağı çeşitleri kullanılmış, yağların temini Konya`daki yerel marketlerden sağlanmıştır. Yağ numuneleri, analizlerde kullanılıncaya kadar, +4 °C`de ve karanlıkta muhafaza edilmiştir.

Etik kurallar çerçevesinde, kullanılan yağ markalarının belirtilmesinin uygun olmayacağı düşünülerek, yağ markaları tez içerinde kodlandırılarak ifade edilmiştir. Kullanılan farklı marka zeytinyağı numunelerine ait kodlar şöyledir:

- *A Naturel Sızma*
- *B Naturel Sızma*
- *C Riviera*

3.5. Zeytinyağı Numuneleri Üzerinde Gerçekleştirilen Fizikokimyasal Analizler

Deneylerde kullanılan yağların genel özellikleri hakkında bilgi edinmek ve analizlerden elde edilen sonuçları daha iyi yorumlayabilmek amacıyla; AOCS, TSE gibi birimler tarafından standart olarak kabul edilen metotlar kullanılarak, zeytinyağı numuneleri üzerinde aşağıdaki analizler gerçekleştirilmiştir.

- *Serbest yağ asidi (FFA) tayini;* AOCS Ca-5a-40 (AOCS, 1998)
- *Peroksit sayısı (PV) tayini;* AOCS Cd 8b-90 (AOCS, 1998)
- *İyot sayısı (IV) tayini;* TS-894
- *Sabunlaşma sayısı tayini;* TS 4962
- *Yağ asit kompozisyonu tayini;* HKARA metodu (Kara ve ark. 2001).

3.5.1. Serbest yağ asidi (% FFA) tayini

Yağ numunelerinin serbest yağ asidi (% FFA) içeriği, standart AOCS Ca-5a-40 metodu kullanılarak, % OA cinsinden belirlenmiştir (AOCS, 1998).

Deneyin Yapılışı: 10 g yağ numunesi 0,01 g hassasiyetle tartılarak, üzerine 15 mL etil alkol ilave edilmiş ve kuvvetli bir karıştırma işlemi ile numunenin çözülmesi sağlanmıştır. Numune üzerine 2-3 damla fenolftalein indikatörü damlatılmış ve çözelti rengi pembe oluncaya kadar 0.01 N NaOH çözeltisi ile titre edilmiştir. Titrasyon sırasında harcanan NaOH sarfiyatı kaydedilmiş ve aşağıdaki formül yardımıyla yağ numunelerinde bulunan serbest yağ asitlerinin yüzde değerleri hesaplanmıştır.

$$\%FFA = \frac{VxNxM}{Gx10} \quad \text{(oleik asit cinsinden)}$$

V: Titrasyonda harcanan NaOH miktarı (mL)
N: Titrasyonda harcanan NaOH normalitesi (N)
M: Yağ asitleri molekül kütlesi (282 g)
G: Numune kütlesi (g)

3.5.2. Peroksit sayısı (PV) tayini

Yağ numunelerinin peroksit sayısı (PV); standart AOCS Cd-8b-90 metodu kullanılarak belirlenmiştir (AOCS, 1998). PV yağlarda bulunan aktif oksijen miktarının bir ölçüsü olup, 1 kg yağda bulunan peroksit oksijeninin milieşdeğer gram cinsinden miktarıdır.

Deneyin Yapılışı: 10 g yağ numunesi 0,001 g duyarlıkla tartılarak, üzerine 10 mL kloroform ve 15 mL asetik asit ilave edilmiş ve kuvvetli bir karıştırma işlemi ile

numunenin çözülmesi sağlanmıştır. Sonrasında, çözelti üzerine 0,5 mL doygun KI çözeltisi ilave edilmiş ve çözeltinin ağzı kapatılarak 3 dk boyunca karanlıkta bekletilmiştir (çözeltinin rengi kahverengiye dönünceye kadar). Bekletme işleminden sonra, çözeltiye 1 mL % 1`lik nişasta çözeltisi eklenmiş (oluşan kompleks sebebiyle çözelti rengi laciverte dönmüştür) ve çözeltinin rengi şeffaf oluncaya kadar 0,002 N ayarlı $Na_2S_2O_3$ çözeltisi ile titre edilmiştir. Titrasyon sırasında harcanan $Na_2S_2O_3$ sarfiyatı kaydedilmiş ve aşağıdaki formül, yağ numunelerinin PV değerlerinin hesaplanmasında kullanılmıştır.

$$\mathbf{PV} = \frac{\mathbf{N \times V \times 1000}}{\mathbf{G}} \ \mathbf{meg\ O2/kg\ yağ}$$

V: titrasyonda harcanan $Na_2S_2O_3$ miktarı (mL)
N: titrasyonda kullanılan $Na_2S_2O_3$ normalitesi (N)
G: numune kütlesi (g)

3.5.3. İyot sayısı (IV) tayini

Yağ numunelerinin iyot sayısı (IV), standart TS-894 metodu kullanılarak belirlenmiştir. IV, 100 kısım yağın bağlayabileceği iyot miktarını gösterir ve yağın doymamışlığı hakkında bilgi verir.

Deneyin Yapılışı: 0,2 g yağ numunesi 0,001 g duyarlıkla tartılarak, üzerine 15 mL CCI_4 ilave edilmiş ve kuvvetli bir karıştırma işlemi ile numunenin çözülmesi sağlanmıştır. Ardından, çözelti üzerine 25 mL Wijs reaktifi ilave edilmiş, çözeltinin ağzı kapatılarak 3 dk boyunca karanlıkta bekletilmiştir. Bekleme süresi tamamlanınca, çözelti üzerine 1,990 g KI ve 100 mL saf su ilavesi yapılmıştır. Sonrasında, çözeltiye 3-4 damla % 1`lik nişasta çözeltisi eklenerek (oluşan kompleks sebebiyle çözelti rengi laciverte dönmüştür) 0,1 N ayarlı $Na_2S_2O_3$ çözeltisi ile titre edilmiş (çözeltinin rengi şeffaf oluncaya kadar) ve titrasyon sırasında harcanan $Na_2S_2O_3$ sarfiyatı kaydedilmiştir (V_1). Aynı işlem şahit numune için de gerçekleştirilerek, harcanan $Na_2S_2O_3$ miktarı belirlenmiştir (V_2). Aşağıdaki formül, yağ numunelerinin IV değerlerinin hesaplanmasında kullanılmıştır.

$$\mathbf{İyot\ Sayısı\ (IV)} = \frac{\mathbf{(V_2 - V_1) \times 12,69 \times N}}{\mathbf{G}}$$

V_2: Şahit için harcanan $Na_2S_2O_3$ miktarı (mL)
V_1: Numune için harcanan $Na_2S_2O_3$ miktarı (mL)
N: $Na_2S_2O_3$ çözeltisinin normalitesi (N)
G: Numune kütlesi (g)

3.5.4. Sabunlaşma sayısı (SV) tayini

Yağ numunelerinin sabunlaşma sayısı (SV); standart TSE 4962 metodu kullanılarak belirlenmiştir. SV, 1 g yağın sabunlaşması için gerekli olan potasyum hidroksitin mg olarak ağırlığıdır.

Deneyin Yapılışı: 2 g yağ numunesi 0,001 g duyarlıkla bir balona tartılmış, üzerine 25 mL 0,5 N etanollü KOH çözeltisi ilave edilerek bir geri soğutucu düzeneğine bağlanmıştır. Geri soğutucu düzeneğinde 1 saat boyunca (sabunlaşması güç olan bazı yağlar için bu süre uzatılabilir) yavaş yavaş kaynatılan karışım, sıcak bir halde düzenekten alınmış, üzerine 4-5 damla fenolftalein indikatörü ilave edilerek, çözelti rengi şeffaf oluncaya kadar 0,5 N ayarlı H_2SO_4 çözeltisi ile titre edilmiştir. Titrasyon sırasında harcanan H_2SO_4 miktarı belirlendikten sonra (V), aynı işlem şahit numune için de tekrarlanmıştır (Vk). Titrasyon işlemlerinden elde edilen sarfiyatlar aşağıdaki formülde yerlerine konularak, yağ numunelerinin SV değerleri hesaplanmıştır.

Sabunlaşma Sayısı (SV)= (Vk - V) × 28,05 / m

Vk: Tanık deneyde harcanan H_2SO_4 miktarı (mL)
V: Örnek için harcanan H_2SO_4 miktarı (mL)
m: Örnek miktarı (g)

3.5.5. Yağ asit kompozisyonu tayini

Bitkisel yağlardaki 10 ile 24 karbon arası yağ asitlerinin tespit edilmesi esasına dayanmaktadır.

3.5.5.1. Yağ asitlerinin Metanol/KOH ile metil esterlerine (FAME) dönüştürülmesi

Gaz kromatografi (GC) tekniği ile yağ asit kompozisyonu analizinde; trigliserit yapısında yer alan ve uçucu özelliği bulunmayan yağ asitleri, gerek uçuculuklarının artırılması gerekse polaritelerinin düşürülmesi amacıyla, ester formuna dönüştürülmek suretiyle analiz öncesinde türevlendirme işlemine tabi tutulmaktadır. Birçok farklı esterleştirme prosedürü bulunmakla birlikte, sunulan bu tez çalışmasında KOH ve metanolün yer aldığı bazik ortamda esterleştirme prosedürü kullanılmıştır.

Deneyin Yapılışı: 1 g yağ numunesi 50 mL`lik balona alınarak, üzerine 1 mL 2 N metanollü KOH ilave edilmiş ve geri soğutucu altında 10 dk boyunca kaynatılmıştır. Kaynayan numune üzerine 7 mL n-hekzan ilave edilmiş, numune 2500 devirde 10 dk

boyunca santrifüjlenerek, esterleşen kısmın ayrılması sağlanmıştır. Bir tüpe alınan esterleşmiş kısım üzerine ~1 g Na_2SO_4 ilave edilerek, içerisinde bulunan nemin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Na_2SO_4 ile kurutma işlemi sonunda elde edilen berrak kısım bir viale alınmış ve GC-FID cihazında analiz edilmek üzere hazır hale getirilmiştir.

3.5.5.2. GC-FID yöntemi ile FAME tayini

Zeytinyağı numuneleri içerisindeki yağ asitlerinin % dağılımını belirlemek amacıyla yapılan yağ asit kompozisyonu analizleri, HKARA metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Söz konusu metoda ait deneysel parametreler **Tablo 3.4.**`de yer almaktadır.

Tablo 3.4. GC-FID yöntemi ile Yağ Asit Kompozisyonu Analizi için Metot Parametreleri

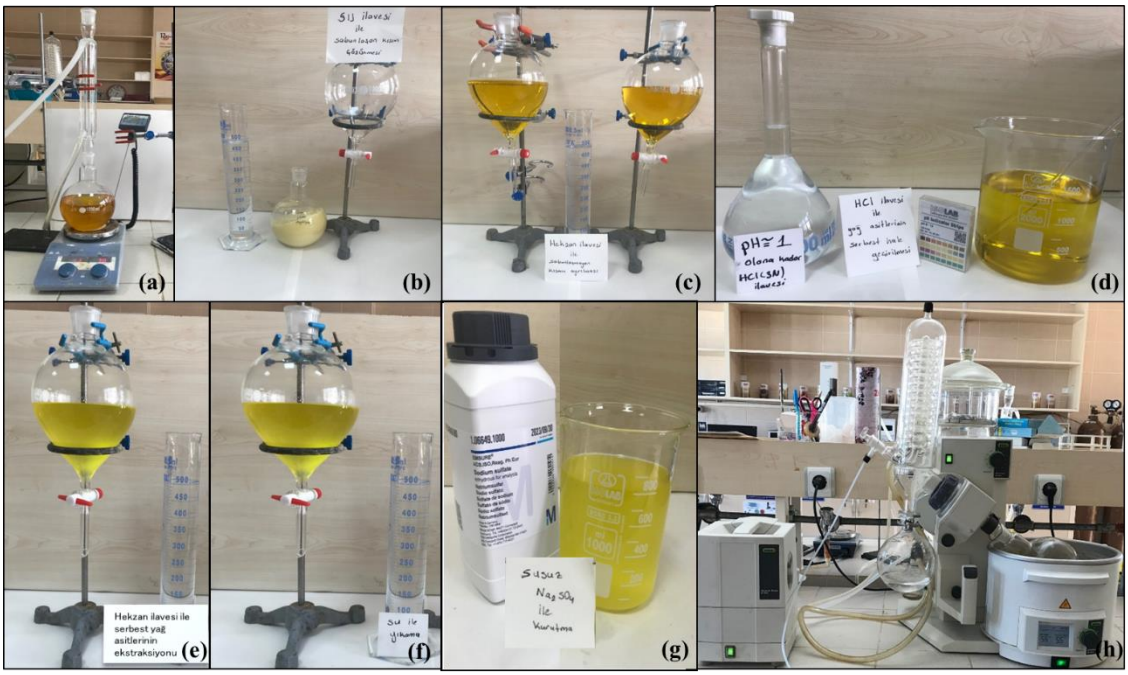
HKARA METODU	
Enjeksiyon Bloğu	
➢ Enjeksiyon Miktarı	➢ 1 µL
➢ Enjeksiyon Bloğu Sıcaklığı	➢ 250 °C
➢ Taşıyıcı Gaz	➢ Hidrojen
➢ Split Modu	➢ 1:100
Kolon Fırını	
➢ Kolon	➢ Agilent 112-88A7 HP-88 Kapiler, 100m x 250 µm x 0.20 µm nominal
➢ Taşıyıcı Gaz Akış Hızı	➢ 0,36 mL/dk
➢ Kolon Sıcaklık Programı	➢ 50 °C →→→ 10 dk ➢ 50 °C →→→ 240 °C (4 °C/dk) ➢ 240 °C →→→ 10 dk
Dedektör	
➢ Dedektör Sıcaklığı	➢ 250 °C
➢ Hidrojen Gazı Akış Hızı	➢ 40 mL/dk
➢ Kuru Hava Akış Hızı	➢ 400 mL/dk

3.6. Zeytinyağı Numunelerinden Serbest Yağ Asitlerinin Eldesi

Sunulan tez çalışmasının ilk basamağını oluşturan, zeytinyağı numunelerinden serbest yağ asitlerinin elde edilmesi aşaması; yağ numunelerinin etanollü KOH ile sabunlaştırılması esasına dayanmaktadır.

Deneyin Yapılışı: 120 g zeytinyağı numunesi 0,1 g hassasiyetle bir balon içerisine tartılmış, üzerine 1 N 600 mL etanollü KOH ilave edilerek, 40 °C`de geri soğutucu altında ~2,5-3 saat boyunca sabunlaşmaya bırakılmıştır. Sabunlaştırma işlemi

sonrasında elde edilen reaksiyon karışımına 600 mL saf su ve 600 mL hekzan ilave edilmiş, karışım ayırma hunisine alınarak sabunlaşan (su fazı) ve sabunlaşmayan (hekzan fazı) kısımların birbirinden ayrılması sağlanmıştır. Ayırma işlemi verimliliğini artırmak için, bir önceki basamaktan elde edilen sulu faz üzerine bir kez daha 600 mL hekzan ilavesi yapılmış ve sulu fazın tekrar organik fazdan ayrımı gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sulu faz üzerine pH= 1 olana kadar 3N HCl ilavesi yapılmış ve yağ asitlerinin serbest hale geçmesi sağlanmıştır. Bu karışımdaki serbest yağ asitleri 600 mL hekzan ilavesi ile ekstrakte edildikten sonra, elde edilen hekzan fazı üzerine 2×150 mL saf su ilavesi yapılarak, hekzan fazının daha saf bir hale gelmesi sağlanmıştır.



Şekil 3.1. Zeytinyağı Numunelerinden Serbest Yağ Asitlerinin Elde Edilmesinde Yer Alan Basamaklar **(a)** Sabunlaştırma Basamağı, **(b)** Sabunlaşan Kısmın Su Fazına Alınması, **(c)** Hekzan İlavesi ile Sabunlaşan ve Sabunlaşmayan Kısımların Birbirinden Ayrılması, **(d)** HCl İlavesi ile Yağ Asitlerinin Serbest Hale Geçirilmesi, **(e)** Serbest Yağ Asitlerinin Hekzan ile Ekstraksiyonu, **(f)** Hekzan Fazının Su ile Yıkanarak (2 Kez) Daha Saf Hale Getirilmesi, **(g)** Susuz Na_2SO_4 İle Serbest Yağ Asitleri İçindeki Nemin Uzaklaştırılması, **(h)** Serbest Yağ Asitleri İçerisinde Bulunan Çözücünün (Hekzan) Evaporatörde Uzaklaştırılması

Buradan elde edilen hekzan fazı susuz Na_2SO_4 ile kurutulmuş, kurutma işlemi sonrasında gerçekleştirilen santrifüjleme işlemi ile, katı kısmın berrak çözeltiden dekantasyon yoluyla ayrılması sağlanmıştır. Elde edilen serbest yağ asitleri içerisinde bulunan çözücünün (hekzan) evaporatörde uzaklaştırılmasından sonra ise, yalnızca serbest yağ asitlerini içeren bir karışım elde edilmiştir. Bahsedilen işlemler sonunda elde edilen serbest yağ asidi karışımları, daha sonraki deneysel çalışmalarda kullanılmak üzere ağzı kapatılarak buzdolabında saklanmıştır.

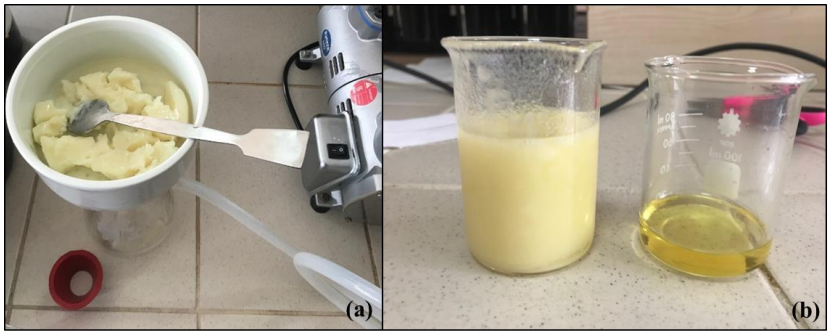
3.7. Serbest Yağ Asidi Karışımından Oleik Asit (OA) Eldesi ve Saflaştırılması

Sunulan tez çalışmasının ikinci basamağını oluşturan, serbest yağ asidi karışımlarından oleik asidin elde edilmesi aşamasında; kristallendirme ve fraksiyonlama gibi farklı ayırma metotları kullanılmış ve yüksek saflıkta/miktarda oleik asit eldesi amaçlanmıştır. Söz konusu metotlar; ***düşük sıcaklıkta direk kristalizasyon***, ***üre fraksiyonlama*** ve ***düşük sıcaklıkta çözücü kristalizasyonu*** olup, farklı çalışma prensiplerine sahiptirler. Oleik asidin eldesinde kullanılan bu metotların çalışma prensipleri aşağıda detaylı bir şekilde açıklanmıştır.

3.7.1. Düşük sıcaklıkta direk kristalizasyon metodu (DSDKM)

Yağ asitlerinin fraksiyonlanmasında kullanılan metotlardan biri olan düşük sıcaklıkta kristalizasyon metodu, farklı erime noktasına sahip olan yağ asitlerinin, sıcaklığa bağlı olarak farklı hallerde bulunmaları (katı ve sıvı) esasına dayanmaktadır. Şöyle ki; düşük sıcaklık değerlerinde; yüksek erime noktasına sahip olan yağ asitleri (tekli doymamış ve doymuş yağ asitleri gibi) katı formda bulunurken, düşük erime noktasına sahip olan yağ asitleri (çoklu doymamış yağ asitleri) sıvı formda kalmaktadır.

Deneyin Yapılışı: Zeytinyağı numunelerinden sabunlaştırma işlemi sonunda elde edilen ~100 g serbest yağ asidi karışımı, 15-30 saatlik uzun bir zaman dilimi boyunca 5-10 °C arasındaki bir sıcaklıkta yavaş yavaş soğumaya bırakılmış ***(1. kristalizasyon)***, soğutma işlemi sonrasında elde edilen katı ve sıvı kısmın filtre edilerek birbirinden ayrılması sağlanmıştır. Bu aşamadan sonraki işlemlere ise, elde edilen katı kısmın doymuş ve tekli doymamış yağ asitlerini, sıvı kısmın ise çoklu doymamış yağ asitlerini içerdiği varsayılarak devam edilmiştir (Rincón-Cervera ve Guil-Guerrero, 2010). 2. Kristalizasyon olarak nitelendirilen bu işlem basamağı, yüksek saflıkta OA kristalleri elde edebilmek amacıyla, *1. kristalizasyon* işleminden elde edilen katı kısmın 15-20 °C arasında 2. bir kristalizasyon işlemine tabi tutulmasını kapsamaktadır.

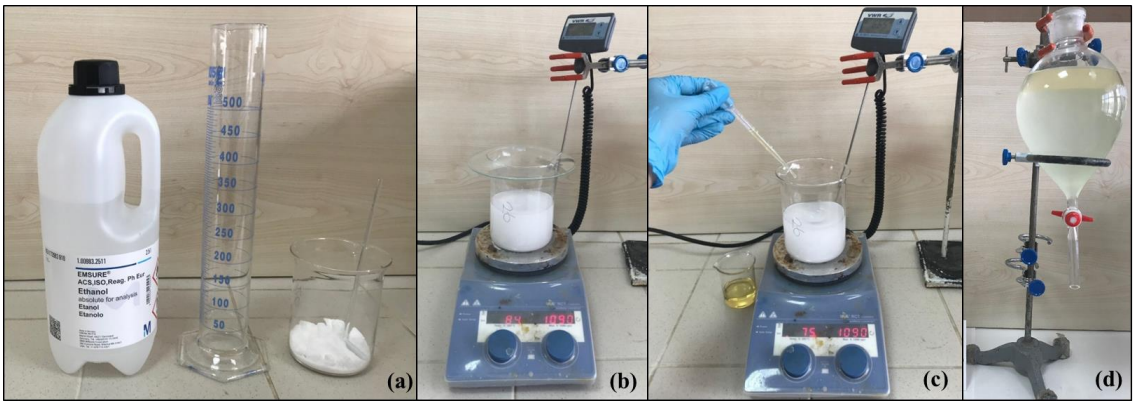


Şekil 3.2. Düşük Sıcaklıkta Direk Kristalizasyon Metodu ile OA Eldesi **(a)** 1. Kristalizasyon İşleminden Elde Edilen Katı ve Sıvı Kısmın Birbirinden Ayrılması, **(b)** 1. Kristalizasyon İşlemin Sonunda den Elde Edilen Doymuş ve Tekli Doymamış Yağ Asitleri (Katı) ile Çoklu Doymamış Yağ Asitlerinin (Sıvı) Görünümü

3.7.2. Üre fraksiyonlama metodu (ÜFM)

Üre fraksiyonlama yöntemi ile OA eldesi; ürenin, doymuş ve doymamış özelliğe sahip yağ asitleri ile farklı kararlılıkta kompleksler oluşturması esasına dayanmaktadır. Şöyle ki; yağ asitlerinin doymuşluk derecesi arttıkça, üre içinde tutunma olasılıkları artmakta ve üre ile tetragonal yapıda daha kararlı kompleks türleri meydana getirebilmektedirler.

Deneyin Yapılışı: 150 g üre 0,1 g hassasiyetle bir beher içerisine tartılmış, üzerine 400 mL metanol eklenerek, yüksek bir sıcaklıkta (~75 °C) tamamen çözülmesi sağlanmıştır. Ardından, önceki işlemlerden elde edilen ~100 g yağ asidi karışımı, üre çözeltisine 5-10 kısımlık eşit parçalar halinde ilave edilmiş ve elde edilen çözelti 0.3° C/dk`lık bir soğutma hızıyla oda sıcaklığına kadar soğutulduktan sonra, buzdolabında kristallenmeye bırakılmıştır (+4 °C). *1. fraksiyonlama* olarak adlandırılan bu kristallendirme işlemi sonrasında elde edilen katı kısım üzerinde, tekrar aynı prosedür uygulanmış, sonrasında oluşan kristallerin indirgenmiş basınç altında süzülerek sıvı kısımdan ayrılması sağlanmış (*2. fraksiyonlama*) ve bu aşamadan sonraki işlemler, elde edilen katı kısmın OA içerdiği düşünülerek sürdürülmüştür (Evans, 1958). Öncelikle, katı kısım içerisinde bulunabilecek üre ve metanolün uzaklaştırılması amacıyla; katı kısım üzerine 250 mL su ve pH= 2 oluncaya kadar 4N HCl ilavesi ile yapılmış, sonrasında ise bu karışım üzerine 250 mL hekzan ve az miktarda tuz ilave edilerek 1 saat boyunca karışmaya bırakılmıştır. İşlem sonunda elde edilen su ve hekzan fazı karışımı ayırma hunisine alınarak, fazların birbirinden ayrılması sağlanmış ve elde edilen hekzan fazı susuz sodyum sülfat ile kurutulduktan sonra, döner buharlaştırıcı yardımıyla çözücüsü uzaklaştırılmıştır. Bu aşamadan elde edilen katı kısmın, saf OA olması beklenmiştir.



Şekil 3.3. Üre Fraksiyonlama Metodu ile OA Eldesi **(a)** Üre Fraksiyonlama İşleminde Kullanılan Malzemeler, **(b)** Ürenin ~75 °C`de Metanol İçerisinde Çözülmesi, **(c)** Üre-Metanol Karışımına Serbest Yağ Asitlerinin Kısımlar Halinde Eklenmesi, **(d)** Gerekli Kimyasal İlavelerinden Sonra Oluşan Su ve Hekzan Fazının Birbirinden Ayrılması

3.7.3. Düşük sıcaklıkta çözücü kristalizasyonu metodu (DSÇKM)

Düşük sıcaklıkta çözücü kristalizasyonu metodu (DSÇKM), yağ asitlerinin farklı erime noktalarına sahip olması ve farklı çözücülerde farklı oranlarda çözünmesi esasına dayanılarak geliştirilmiş olup, yağ asitlerinin eldesinde çözücü kullanımının, bireysel kristal oluşumunu teşvik ettiği ve kristallerin verimini/saflığını arttırdığı bilinmektedir (Erinç ve ark., 2019).

Sunulan tez çalışmasında, DSÇKM ile OA eldesi için yürütülen deneyler; bitkisel yağlar içerinde yer alan yağ asitlerini farklı derecelerde çözme özelliğine sahip olan aseton, metanol gibi çözücüler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Söz konusu çözücülerin kullanımında farklı yaklaşımlar izlenmiş olup, çözücülerin farklı sayıda ve sırada kullanılmasıyla gerçekleştirilen deneyler ***çapraz*** ve ***çoklu çözücü kristalizasyonu*** olmak üzere kendi içerisinde sınıflandırılmıştır.

3.7.3.1. Çapraz çözücü kristalizasyonu metodu

% 100 aseton ve % 90 MeOH (suda)`ın kullanılması ile gerçekleştirilen deneyler; ***aseton sonrası metanol*** ve ***metanol sonrası aseton*** deneyleri olarak isimlendirilmiştir. Deneylerde, önceki basamaklarda elde edilen yağ asidi karışımından belli bir miktar alınmış ve üzerine yukarıda belirtilen çözücülerden bir tanesi ilave edilerek, karışım uygun şartlarda kristallenmeye bırakılmıştır. Kristallenme işlemi sonrası elde katı kısım indirgenmiş basınç altında süzülmüş ve katı üzerine çözücülerden diğeri ilave edilerek bir kez daha kristallendirme işlemi gerçekleştirilmiştir. Kristallendirme işlemlerinden elde edilen katı ve sıvı kısımların her biri, içeriğinde bulunan madde miktarlarının tespiti ve OA saflığının belirlenmesi için HPLC`de analiz edilmekle birlikte, yüksek miktarda OA içeriğinin beklendiği kısım, çapraz kristallendirme işlemlerinin sonunda elde edilen katı kısımdır.



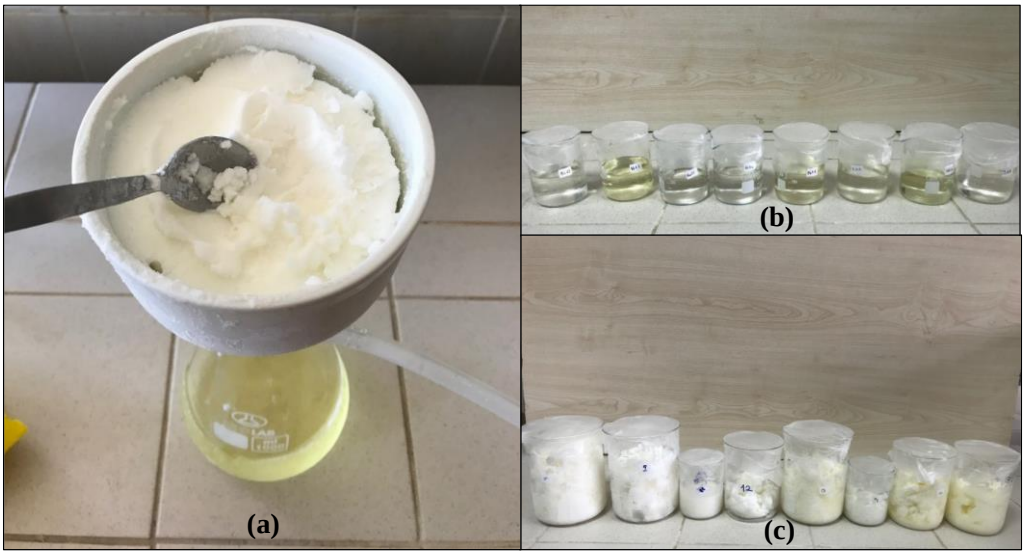
Şekil 3.4. Çapraz Çözücü Kristalizasyonu Metodu ile OA Eldesi **(a)** Metanol Sonrası Kristalizasyon İşleminden Elde Edilen Kristallerin Görünümü, **(b)** Aseton Sonrası Kristalizaasyon İşleminden Elde Edilen Kristallerin Görünümü

Aseton sonrası metanol: Elde edilen serbest yağ asidi karışımından belli bir miktar alınarak üzerine ~3,5 katı kadar % 100 aseton ilave edilmiş ve -80 °C'de bir gece kristallendirilmeye bırakılmıştır. Kristallendirme işleminden elde edilen katı kısım indirgenmiş basınç altında süzülmüş ve katı kısmın üzerine bu kez de ~3,5 katı kadar % 90 MeOH (suda) eklenerek, bir gece boyunca -20 °C'de kristallenmeye bırakılmıştır. Söz konusu kristallendirme işlemleri sonunda elde edilen katı kısmın OA olması beklenmiştir.

Metanol sonrası aseton: Elde edilen serbest yağ asidi karışımından belli bir miktar alınarak üzerine ~3,5 katı kadar % 90 MeOH (suda) ilave edilmiş ve -20 °C'de bir gece kristallendirilmeye bırakılmıştır. Kristallendirme işleminden elde edilen katı kısım indirgenmiş basınç altında süzülmüş ve katı kısmın üzerine bu kez de ~3,5 katı kadar % 100 aseton (suda) eklenerek, bir gece boyunca -80 °C'de kristallenmeye bırakılmıştır. Söz konusu kristallendirme işlemleri sonunda elde edilen katı kısmın OA olması beklenmiştir.

3.7.3.2. Çoklu çözücü kristalizasyon metodu

% 100 asetonun kullanılması ile gerçekleştirilen deneylerde; önceki basamaklarda elde edilen yağ asidi karışımından belli bir miktar alınmış ve üzerine ~3,5 katı kadar aseton ilave edilerek, -80 °C'de bir gece kristallendirilmeye bırakılmıştır. Kristallendirme işlemi sonrası elde edilen katı kısım indirgenmiş basınç altında süzülmüş ve katı üzerine bir kez daha aseton ilavesi yapılarak, kristalizasyon işlemi tekrarlanmıştır. Söz konusu kristalizasyon işlemi, aynı şartlarda, toplamda 4 kez gerçekleştirilmiş ve işlemler sonrasında elde edilen her biri katı kısım, OA içeriğinin ve saflığının tespit edilmesi için HPLC`de analiz edilmiştir.



Şekil 3.5. Aseton Kullanılarak Gerçekleştirilen Çoklu Çözücü Kristalizasyonu Metodu ile OA Eldesi **(a)** Oluşan Kristallerin Süzülmesi İşlemi, **(b)** Çözücü İlavesinden Sonra Kristallenmeye Bırakılan Karışımlar, **(b)** Kristalizasyon İşlemi sonunda Elde Edilen Kristaller

3.8. OA Miktarının ve Saflığının HPLC Yöntemi ile Belirlenmesi

OA eldesinde kullanılan *düşük sıcaklıkta direk kristalizasyon*, ***üre fraksiyonlama*** ve ***düşük sıcaklıkta çözücü kristalizasyonu*** metotlarında yer alan kristalizasyon işlemleri sonunda elde edilen katı ve/vaya sıvı kısımlar, içeriğinde bulunan madde miktarlarının tespiti ve OA saflığının belirlenmesi için RP-HPLC ile analiz edilmiştir. RP-HPLC analizlerinde kullanılan metot şartları **Tablo 3.5.**`da yer almaktadır (Al-Rimawi ve ark., 2015).

Tablo 3.5. Zeytinyağı Numunelerinden Elde Edilen Serbest Yağ Asidi Karışımlarının RP-HPLC ile Analizi için Metot Parametreleri

Kolon	ACE-5-C18 (25 cm x 4,6 mm ID), 100 Å
Kolon sıcaklığı	30 °C
Akış Hızı	1,5 mL/dk
Hareketli Faz	% 80:19,9:1 MeCN:H_2O:H_{AC}
Dedektör(DAD)	205 nm
Enjeksiyon Hacmi	20 µl.
Analiz Süresi	35 dk

3.9. OA`den AA Eldesi, Saflaştırılması ve *İn-Vitro* Koşullarda Gerçekleştirilen Çalışmalar

Sunulan tez çalışmasının üçüncü basamağını oluşturan, OA (ikinci aşamadan elde edilen) AA elde edilmesi aşamasında; ***(i)*** *ozon jeneratörü ile ozonizasyon ve* ***(ii)*** *bir*

oksidan varlığında parçalama olmak üzere iki faklı metodun kullanılması ile yüksek miktarda/saflıkta AA eldesi amaçlanmıştır. Söz konusu bu metotların çalışma prensipleri aşağıda detaylı bir şekilde açıklanmıştır. Ayrıca, elde edilen AA`nın antibakteriyel etkilerinin incelendiği *in-vitro* koşullarda gerçekleştirilen deneysel çalışmalar da bu bölümde yer almaktadır.

3.9.1. OA`nın V_2O_5 katalizörü varlığında ozon jeneratörü ile ozonilasyonu

Ozon jeneratörü ile OA`nın ozonilasyonu, AA eldesinde kullanılan yaygın metotlardan biri olup; ilk olarak OA`nın yapısında bulunan çift bağa ozon molekülünün bağlanması ile ozonid adı verilen türevlerin oluşması, sonrasında ise bu türevlerin indirgen koşullarda su ile hidrolize olarak parçalanması esasına dayanmaktadır.

Deneyin Yapılışı:

Ozonizasyon yöntemi ile OA`den (ikinci aşamadan elde edilen) AA eldesi, endüstriyel skalada kullanılabilir özelliği bulunan 0,2 L/dk akış hızına sahip Ozonoxi marka bir ozon jeneratörü kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ozonizasyon işleminin gerçekleştirilmesinde; 20-100 g OA 0,1 g hassasiyetle bir balon içerisine tartılmış, üzerine deneyde katalizör olarak davranan V_2O_5`den % 1`i oranında (~0.02-0.05 g) ilave edilerek sıcaklık 60 °C`ye sabitlenmiştir. Daha sonra, OA ve katalizör içeren karışım, ozon jeneratörü tarafından üretilen O_3 gazı ile cam bir difüzör vasıtasıyla etkileştirilmiştir. 36 saat boyunca devam ettirilen ozonlama işlemi sırasında, reaksiyon karışımından belli aralıklarla (10, 24, 36 saat) numuneler alınmış, içeriğinde bulunan AA ve diğer türlerin tespiti için GC-MS`de analiz edilmiştir.



Şekil 3.6. Ozonizasyon Yöntemi ile OA`den AA Eldesi

3.9.1.1. Ozonizasyondan elde edilen AA'nın fraksiyonlu distilasyon yöntemi ile saflaştırılması

Ozonizasyon işlemi ile elde edilen kompleks karışımdan AA`nın saflaştırılmasında kullanılan fraksiyonlu distilasyon yönteminde; karışım bir balona konularak, fraksiyonlu bir distilasyon düzeneğine adapte edilmiş ve sıcaklık AA`nın kaynama noktası olan 286 °C üzerindeki bir değere (295 °C) ayarlanarak, distilasyon işlemi ~5-6 saat boyunca sürdürülmüştür.

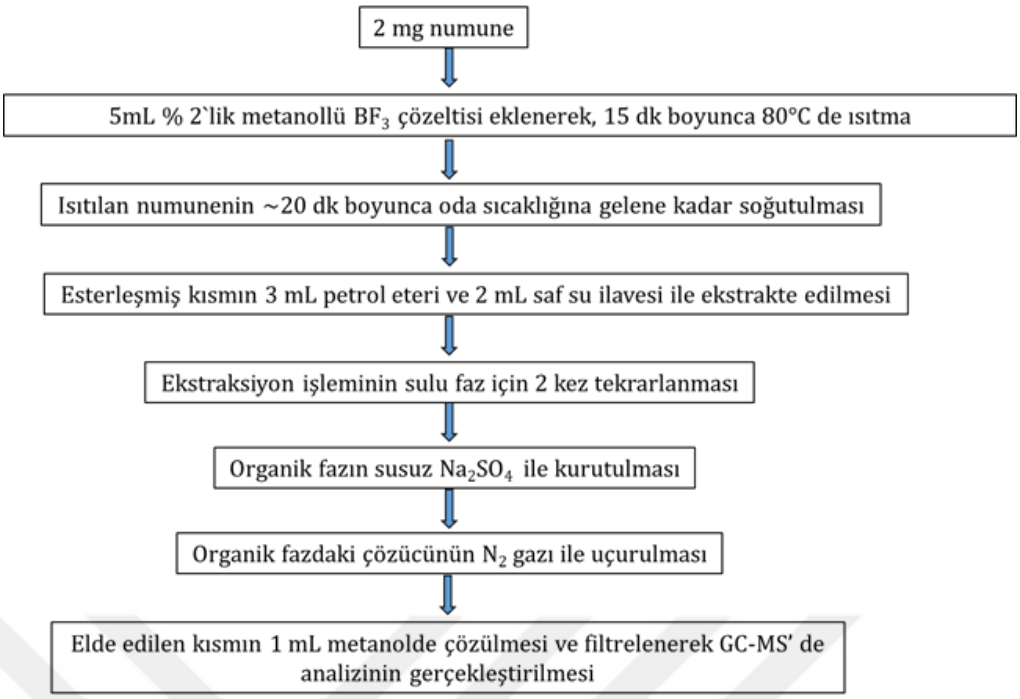


Şekil 3.7. Ozonizasyon İşleminden Elde Edilen Kompleks Karışımdan AA`nın Fraksiyonlu Distilasyon Yöntemi ile Saflaştırılması

3.9.1.2. Ozonizasyon karışımındaki yağ asitlerinin Metanol/BF_3 ile metil esterlerine (FAME) dönüştürülmesi

Ozonizasyon işleminden elde edilen karışım içerisindeki türlerin (özellikle AA`nın) GC-MS yöntemi ile tespiti öncesinde, asidik ortamda metanol/$BF_3$ kullanılarak metil esterlerine dönüştürme prosedürü uygulanmıştır. Söz konusu prosedür, yağ asitlerinin GC ile analizinde kullanılan ön işlem basamaklarından biri olup, sunulan tez çalışmasında ana bileşen olarak yer alan AA`nın de bir yağ asidi olması sebebiyle bu prosedür kullanılmıştır.

Ozonizasyon işleminden elde edilen karışım içerisindeki türlerden uygun olanların, metanol/BF_3 ile metil esterlerine (FAME) dönüştürülmesi prosedürü aşağıda yer almaktadır.



Şekil 3.8. AA İçeren Karışımlara GC-MS Analizi Öncesi Uygulanan Metanol/BF_3 ile Metil Esterlerine (FAME) Dönüştürme Prosedürü

3.9.1.3. Ozonizasyon karışımındaki AA`nın GC-MS yöntemi ile tayini Ozonizasyon işleminden elde edilen karışım içerisindeki türlerden uygun olanlar asidik ortamda metanol/BF_3 kullanılarak metil esterlerine (FAME) dönüştürüldükten sonra, GC-MS yöntemiyle analiz edilmiştir. Scan modunda gerçekleştirilen GC-MS analizleri için metot şartları **Tablo 3.6.**`da yer almaktadır.

Tablo 3.6. AA içeren Karışımların GC-MS Yöntemi ile Analizi için Metot Parametreleri

Taşıyıcı Gaz	
Taşıyıcı Gaz	Helyum
Taşıyıcı Gaz Akış Hızı	1 mL/dk
Enjeksiyon Bloğu	
Enjeksiyon Miktarı	1 µL
Enjeksiyon Bloğu Sıcaklığı	280 °C
Split Modu	1:15
Kolon Fırını	
Kolon	Agilent 19091S-433, HP-5MS kapiler kolon,
Kolon Sıcaklık Programı	50 °C →→→ 2 dk 50 °C →→→ 160 °C (10 °C/dk) 160°C →→→ 290 dk
Dedektör	
Kaynak Sıcaklığı	230 °C
Kuadropol	150 °C

3.9.2. OA`nın H_2O_2/WO_3 varlığında oksidasyonu/parçalanması

OA`den AA elde edilmesinde yaygın olarak kullanılan bir diğer metot; bir katalizör varlığında, yükseltgen özelliğe sahip maddelerin kullanılması ile OA`nın yapısında bulunan çift bağın oksidasyonu/parçalanmasıdır. OA`nın oksidasyon/parçalanma reaksiyonları *asit ilaveli* ve *asit ilavesiz* olmak üzere iki farklı şekilde gerçekleştirilmiştir.

**OA`nın $H_2O_2/WO_3$ varlığında Asit İlaveli Oksidasyonu/Parçalanması:** 30 g (106 mmol) OA 0,1 g hassasiyetle iki boyunlu bir balonda tartılarak, üzerine 0.25 g (1,2 mmol) tungsten VI oksit ($WO_3$) ilave edilmiş ve balon bir geri soğutucu düzeneğine bağlanmıştır. Daha sonra sıcaklık değeri 70 °C`ye ayarlanmış ve katı formdaki katalizörün çözülmesi için belli bir süre 500 rpm`de karıştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Ardından, balonun ikinci boyun kısmından 21 mL % 35'lik $H_2O_2$ çözeltisi, ~20 dk`lık bir süre içerisinde yavaş yavaş balon içerisine eklenmiş ve reaksiyon karışımı 5 saat boyunca karıştırılmıştır (70 °C ve 500 rpm). Süre sonunda oratamın pH~ 1 olana kadar 4N HCl ile asitlendirilmiştir.

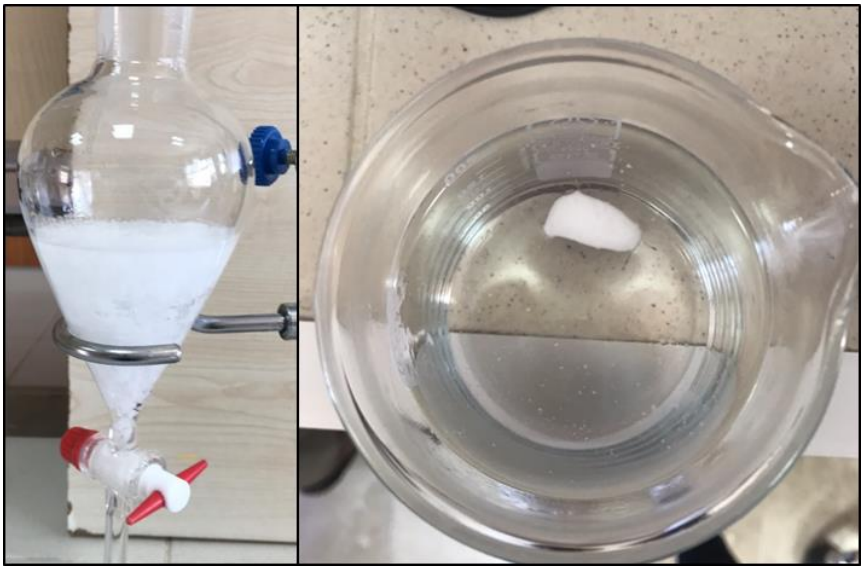
**OA`nın $H_2O_2/WO_3$ varlığında Asit İlavesiz Oksidasyonu/Parçalanması:** 30 g (106 mmol ) OA 0,1 g hassasiyetle iki boyunlu bir balonda tartılarak, üzerine 0.25 g (1,2 mmol) tungsten VI oksit ($WO_3$) ilave edilmiş ve balon bir geri soğutucu düzeneğine bağlanmıştır. Daha sonra sıcaklık değeri 70 °C`ye ayarlanmış ve katı formdaki katalizörün çözülmesi için belli bir süre 500 rpm`de karıştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Ardından, balonun ikinci boyun kısmından 21 mL % 35'lik $H_2O_2$ çözeltisi, ~20 dk`lık bir süre içerisinde yavaş yavaş balon içerisine eklenmiş ve reaksiyon karışımı 8 saat boyunca karıştırılmıştır (70 °C ve 500 rpm).

3.9.2.1. H_2O_2/WO_3 kullanılarak elde edilen AA'nın EtOAc/sıcak su ile saflaştırılması

H_2O_2/WO_3 ile oksidasyon/parçalanma işleminden elde edilen kompleks karışımdan AA`nın saflaştırılması, EtOAc ve sıcak suyun kullanıldığı sıvı-sıvı ekstraksiyonu yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. İki basamakta yürütülen saflaştırma işlemlerinin ilk basamağını, kompleks karışımdan AA ve PA içeren organik bir fazın elde edilmesi, ikinci basamağını ise söz konusu bu fazdan AA`nın saflaştırılması oluşturmaktadır.

Oksidasyon/Parçalanma İşleminden Elde Edilen Kompleks Karışımdan AA ve PA İçeren Organik Fazın Elde Edilmesi: Reaksiyon sonunda elde edilen karışım öncelikle oda sıcaklığına getirilmiş, daha sonra karışım, üzerine 100 mL buzlu su ve 100 mL EtOAc ilave edilerek bir ayırma hunisine alınmıştır. Organik ve sulu fazın ayrılması için belli bir süre beklenmiş ve iki fazın birbirinden ayrılması sağlanmıştır. Ekstraksiyon işleminden elde edilen sulu faz üzerine 50 mL EtOAc ilave edilmiş (2 kez), sulu ve organik fazların ayrılması için yine belli bir süre beklendikten sonra, fazlar birbirinden ayrılmıştır. Daha sonra, AA ve PA içeriğine sahip olduğu düşünülen, ekstraksiyon basamaklarından elde edilmiş organik fazlar (EtOAc fazları) birleştirilerek, içerisinde kalmış olabilecek suyun uzaklaştırılması amacı ile susuz Na_2SO_4 ile muamele edilmiştir. Bu prosedürün son işlem basamağı ise, AA+PA içeren suyu uzaklaştırılmış organik fazın, döner buharlaştırıcıda 40 mL'ye kadar konsantre edilmesidir ***(1. Saflaştırma İşlemi)***.

AA ve PA İçeren Organik Fazdan AA`nın Saflaştırılması: Oksidasyon/parçalama işlemininin 1. saflaştırma basamağından elde edilen konsantre AA ve PA karışımı üzerine 20 mL buzlu su ve 10 mL sıcak EtOAc (2 kez) ilave edilmiş, sulu ve organik fazların ayrılması için belli bir süre beklendikten sonra, fazlar birbirinden ayrılmıştır. Daha sonra ekstraksiyon işlemlerinden elde edilen organik fazlar (EtOAc fazları) birleştirilmiş ve içerisinde yer alan AA`nın ekstrakte edilebilmesi için 50 mL sıcak su ilavesi (3 kez) gerçekleştirilmiştir. İlave edilen sıcak suyun fazla soğumasına izin vermeyecek kadar bir süre bekledikten sonra ise, fazların birbirinden ayrılması sağlanmıştır. Sıcak su ile ekstraksiyon işlemlerinden elde edilen sulu fazlar birleştirilmiş ve AA`nın elde edilmesi için 1 gece boyunca +4 °C de kristallenmeye bırakılmıştır. Kristallendirme işlemi sonrasında, oldukça az miktarda elde edilebilen ve AA olduğu düşünülen kristaller çözeltiden ayrılarak, ~30 °C`de etüvde kurutulmuştur ***(2. Saflaştırma İşlemi)***.



Şekil 3.9. H_2O_2/WO_3 Kullanılarak Elde Edilen AA'nın EtOAc/Sıcak Su İle Saflaştırılması İşleminden Elde Edilen Kristallerin Görünümü

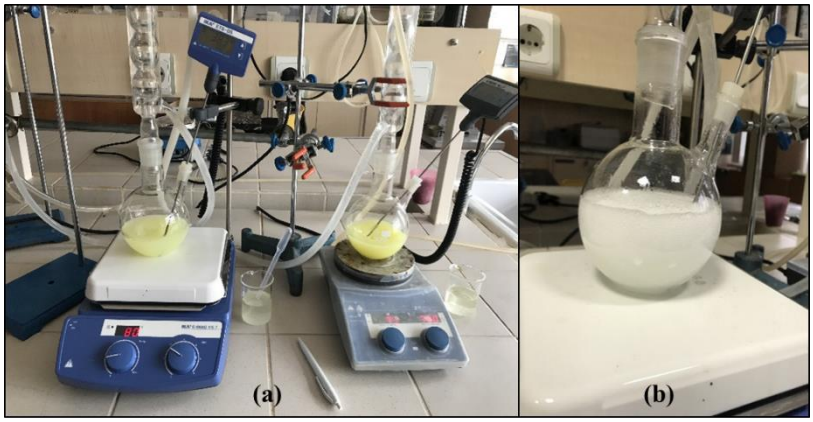
3.9.2.2. EtOAc kullanılarak saflaştırılan AA`nın NMR yöntemi ile karakterizasyonu

H_2O_2/WO_3 kullanılması ile OA`nın oksidasyonu/parçalanması ve EtOAc-sıcak su ile saflaştırılması sonucu elde edilen maddenin yapısı, Varian 400 MHz Nükleer Magnetik Rezonans cihazı kullanılarak, ^1H NMR spektrum analizi yardımıyla aydınlatılmaya çalışılmıştır.

3.9.3. OA`nın H_2O_2/H_2WO_4 varlığında oksidasyonu/parçalanması

H_2O_2 ve H_2WO_4 kullanılması ile OA`dan AA`nın elde edilmeye çalışıldığı çalışmalar da, **Bölüm 3.9.2.**`de olduğu gibi, OA`nın yapısında bulunan çift bağın oksidasyonu/parçalanması esasına dayanmaktadır.

**OA`nın $H_2O_2/H_2WO_4$ varlığında Oksidasyonu/Parçalanması:** 3 g (12 mmol) tungstik asit ($H_2WO_4$) 0,1 g hassasiyetle iki boyunlu bir balonda tartılarak, üzerine 350 mL % 35'lik $H_2O_2$ ilave edilmiş ve balon bir geri soğutucu düzeneğine bağlanmıştır. Daha sonra sıcaklık değeri 70 °C`ye ayarlanmış ve katı formdaki katalizörün çözülmesi için belli bir süre 800 rpm`de karıştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Ardından, balonun ikinci boyun kısmından, önceki işlem basamaklarında elde edilen 100 g OA (~0,354 mol) 4-5 parçalık kısımlar halinde, ~20 dk`lık bir süre içerisinde yavaş yavaş balon içerisine eklenmiş ve reaksiyon karışımı 1 saat boyunca 70 °C ve 800 rpm`de karıştırılmıştır. 1 saat sonunda sıcaklık değeri 92 °C`ye yükseltilmiş ve karışım ~16-17 saat boyunca da bu sıcaklıkta karıştırılmıştır.



Şekil 3.10. OA H_2O_2/H_2WO_4 Varlığında Oksidasyonu/Parçalanması ile AA Eldesi **(a)** Katalizör Olarak Kullanılan H_2WO_4`ün %35`lik H_2O_2 İçerisinde Çözülmesi, **(b)** H_2O_2/H_2WO_4/OA İçeren Reaksiyon Karışımının Görünümü

H_2O_2/H_2WO_4 ile oksidasyon/parçalanma işleminden elde edilen kompleks karışımdan AA`nın saflaştırılması, iki farklı çözücünün ($CHCl_3$ ve X) ayrı ayrı kullanıldığı sıvı-sıvı ekstraksiyonu yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

3.9.3.1. H_2O_2/H_2WO_4 kullanılarak elde edilen AA'nın $CHCl_3$/sıcak su ile saflaştırılması

H_2O_2/ H_2WO_4 varlığında OA`nın oksidasyonu/parçalanması reaksiyon sonunda elde edilen karışım üzerine 500 mL sıcak su ilavesi yapılmış ve karışım bekletilmeksizin sıcak süzme işlemine tabi tutulmuştur. Süzme işlemi sonrasında elde edilen, yağlı bir tabaka görüntüsüne sahip katı kısım kullanılmadan atılırken (içeriğinde kalmış olabilecek AA`nın tespiti için GC-MS`de analiz edilmiştir), berrak süzüntü kısmı ise AA eldesinde kullanılmıştır. Bunun için; süzme işlemi sırasında bir miktar soğumuş olan süzüntü kısmı ~70 °C`ye kadar ısıtılmış ve üzerine 500 mL $CHCl_3$ ilavesi yapıldıktan sonra, bir ayırma hunisinde ekstraksiyon işlemi uygulanmıştır. Ekstraksiyondan elde edilen $CHCl_3$ fazı, sıcak su ile tekrar ekstrakte edilmek üzere bir başka ayırma hunisine alınırken *(2. kademe AA eldesi için)*, su fazı ise 150-200 mL`ye kadar döner buharlaştırıcı yardımıyla konsantre edildikten sonra, 1 gece boyunca 4 °C`de kristallenmeye bırakılmıştır. Kristallendirme işlemi sonrasında elde edilen ve AA olduğu düşünülen kristaller beyaz bant süzgeç kağıdı ile süzülerek, ~30 °C`de etüvde kurutulmuştur *(1.kademe AA).* Elde edilen AA kristalleri karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilinceye kadar +4 °C`de muhafaza edilmiştir.

3.9.3.1.1. $CHCl_3$ kullanılarak saflaştırılan AA`nın GC-MS yöntemi ile tayini

OA`nın $H_2O_2$ ve $H_2WO_4$ ile oksidasyonu/parçalanması sonucu elde edilen kompleks karışımdan, $CHCl_3$ esaslı bir ekstraksiyon işlemi ile saflaştırılan ve AA olduğu düşünülen katı madde, saflığının (%) belirlenmesi için GC-MS`de analiz edilmiştir. Bunun için; katı madde öncelikle **Bölüm 3.9.1.2.**`de belirtildiği gibi, asidik ortamda metanol/$BF_3$ kullanılarak metil esterlerine (FAME) dönüştürülmüş, sonrasında ise **Bölüm 3.9.1.3.**`de yer alan şartlarda analiz edilmiştir.

3.9.3.1.2. $CHCl_3$ kullanılarak saflaştırılan AA`nın NMR yöntemi ile karakterizasyonu

OA`nın H_2O_2 ve H_2WO_4 ile oksidasyonu/parçalanması sonucu elde edilen kompleks karışımdan, $CHCl_3$ esaslı bir ekstraksiyon işlemi ile saflaştırılan ve AA olduğu düşünülen maddenin yapı aydınlatılmasında kullanılan ^{1}H-NMR spektrumları, Varian 400 MHz Nükleer Magnetik Rezonans cihazı kullanılarak elde edilmiş, analizlerde çözücü olarak dimetil sülfoksit (DMSO)`dan faydalanılmıştır. Elde edilen spektrumların yorumlanması, standart AA için elde edilen ^{1}H-NMR spektrumu dikkate alınarak gerçekleştirilmiştir.

3.9.3.1.3. $CHCl_3$ kullanılarak saflaştırılan AA`nın FT-IR yöntemi ile karakterizasyonu

OA`nın H_2O_2 ve H_2WO_4 ile oksidasyonu/parçalanması sonucu elde edilen kompleks karışımdan, $CHCl_3$ esaslı bir ekstraksiyon işlemi ile saflaştırılan ve AA olduğu düşünülen maddenin, yapı aydınlatılmasında kullanılan ve fonksiyonel grupların dağılımını gösteren FT-IR spektrumları, Bruker Vartex 70 model cihazın ATR probu kullanılarak elde edilmiştir. Elde edilen spektrumların yorumlanmasında, standart AA için elde edilen FT-IR spektrumu dikkate alınmıştır.

3.9.3.2. H_2O_2/H_2WO_4 kullanılarak elde edilen AA'nın X/sıcak su ile (patentlendirilecek metoda ait çözücü) saflaştırılması

Oleik asidin oksidasyonu/parçalanması işleminden sonra, kompleks karışım içerisindeki AA`nın izolasyonu amacıyla gerçekleştirilen saflaştırma basamağında yer alan çözücü/çözücü karışımı tarafımızdan ilk kez kullanılmış olup, literatürde kullanımı mevcut olmayan ve oldukça verimli sonuçlar elde edilmesini sağlayan bu metot için patent başvurusunda bulunulması düşünülmektedir. Bu sebeple, söz konusu bu

prosedürün saflaştırma basamağında kullanılan çözücü ve/veya çözücü karışımları **"X"** olarak ifade edilmiştir.

H_2O_2 ve H_2WO_4 varlığında OA`nın oksidasyonu/parçalanması reaksiyonu sonunda elde edilen karışım üzerine 500 mL sıcak su ilavesi yapılmış ve karışım bekletilmeksizin sıcak süzme işlemine tabi tutulmuştur. Süzme işlemi sonrasında elde edilen, yağlı bir tabaka görüntüsüne sahip katı kısım kullanılmadan atılırken (içeriğinde kalmış olabilecek AA`nın tespiti için GC-MS`de analiz edilmiştir), berrak süzüntü kısmı ise AA eldesinde kullanılmıştır. Bunun için; süzme işlemi sırasında bir miktar soğumuş olan süzüntü kısmı ~70 °C`ye kadar ısıtılmış ve üzerine 500 mL X ilavesi yapıldıktan sonra, bir ayırma hunisinde ekstraksiyon işlemi uygulanmıştır. Ekstraksiyondan elde edilen su fazı 150-200 mL`ye kadar döner buharlaştırıcı yardımıyla konsantre edildikten sonra, 1 gece boyunca 4 °C`de kristallenmeye bırakılmıştır. Kristallendirme işlemi sonrasında elde edilen ve AA olduğu düşünülen kristaller beyaz bant süzgeç kağıdı ile süzülerek, ~30 °C`de etüvde kurutulmuştur. Elde edilen AA kristalleri karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilinceye kadar 4 °C`de muhafaza edilmiştir.

3.9.3.2.1. X/sıcak su (patentlendirilecek metoda ait çözücü) kullanılarak saflaştırılan AA`nın GC-MS yöntemi ile tayini

OA`nın $H_2O_2$ ve $H_2WO_4$ ile oksidasyonu/parçalanması sonucu elde edilen kompleks karışımdan, X esaslı bir ekstraksiyon işlemi ile saflaştırılan ve AA olduğu düşünülen katı madde, saflığının (%) belirlenmesi için GC-MS`de analiz edilmiştir. Bunun için; katı madde öncelikle **Bölüm 3.9.1.2.**`de belirtildiği gibi, asidik ortamda metanol/$BF_3$ kullanılarak metil esterlerine (FAME) dönüştürülmüş, sonrasında ise **Bölüm 3.9.1.3.**`de yer alan şartlarda analiz edilmiştir.

3.9.3.2.2. X/sıcak su (patentlendirilecek metoda ait çözücü) kullanılarak saflaştırılan AA`nın NMR yöntemi ile karakterizasyonu

OA`nın H_2O_2 ve H_2WO_4 ile oksidasyonu/parçalanması sonucu elde edilen kompleks karışımdan, X esaslı bir ekstraksiyon işlemi ile saflaştırılan ve AA olduğu düşünülen maddenin yapı aydınlatılmasında kullanılan ^{1}H-NMR spektrumları, Varian 400 MHz Nükleer Magnetik Rezonans cihazı kullanılarak elde edilmiş, analizlerde çözücü olarak dimetil sülfoksit (DMSO)`dan faydalanılmıştır. Elde edilen spektrumların yorumlanması, standart AA için elde edilen ^{1}H-NMR spektrumu dikkate alınarak gerçekleştirilmiştir.

3.9.3.2.3. X/sıcak su (patentlendirilecek metoda ait çözücü) kullanılarak saflaştırılan AA`nın FT-IR yöntemi ile karakterizasyonu

OA`nın H_2O_2 ve H_2WO_4 ile oksidasyonu/parçalanması sonucu elde edilen kompleks karışımdan, X esaslı bir ekstraksiyon işlemi ile saflaştırılan ve AA olduğu düşünülen maddenin, yapı aydınlatılmasında kullanılan ve fonksiyonel grupların dağılımını gösteren FT-IR spektrumları, Bruker Vartex 70 model cihazın ATR probu kullanılarak elde edilmiştir. Elde edilen spektrumların yorumlanmasında, standart AA için elde edilen FT-IR spektrumu dikkate alınmıştır.

3.9.4. X/sıcak su (patentlendirilecek metoda ait çözücü) kullanılarak saflaştırılan AA`nın *in-vitro* koşullarda incelenmesi

OA`nın $H_2O_2$ ve $H_2WO_4$ ile oksidasyonu/parçalanması sonucu elde edilen kompleks karışımdan, X esaslı bir ekstraksiyon işlemi ile saflaştırılan ve $^1$H-NMR, FT-IR ve GC-MS yöntemleri kullanılarak yapısal saflığı belirlenen AA`nın antibakteriyel aktivite özellikleri *in-vitro* koşullarda incelenmiştir.

Söz konusu aktivite çalışmalarının gerçekleştirilme gerekçesi; literatür kaynaklarında AA`nın *antioksidan, antimikrobiyal* ve *antitümöral* etkilere sahip bir madde olarak yer almasıdır. Gerçekleştirilen antibakteriyel çalışmalar sayesinde, tez kapsamında elde edilen AA`nın literatürde belirtildiği gibi bir etkiye sahip olup/olmadığı tespit edilmiştir.

3.9.4.1. AA`nın disk difüzyon yöntemi ile antibakteriyel aktivite tayini

Disk difüzyon yöntemi ile antibakteriyel aktivite tayini; aktivitesi incelenen maddenin, bir diske emdirildikten sonra bakterilerin büyümesi için önceden hazırlanan bir besiyeri ortamına yerleştirilmesi ve duyarlılığı araştırılan organizmanın inoküle edildiği bu besiyerine difüze olması temeline dayanmaktadır. Söz konusu prosedür şu basamaklardan oluşmaktadır: ***(i)*** uygun şartlarda bir besiyeri ortamının hazırlanması ve bakteri süspansiyonunun bu besiyeri ortamına ekilmesi, ***(ii)*** çözücü madde (negatif kontrol), antibiyotik (pozitif kontrol) ve farklı içerik/konsantrasyona sahip numunelerin boş disklere emdirilerek, araştırılan organizmanın (bakterinin) inoküle edildiği besiyeri ortamına yerleştirilmesi, ***(iii)*** farklı madde gruplarını içeren disklerin yer aldığı besiyerinin 37˚C`de belli bir süre (~24 saat) inkübe edilmesi, ***(iv)*** inkübasyon sonunda, inhibisyonun gerçekleştiği bölge (Lezcano ve ark.) çapının (bakteri üremesinin görülmediği kısım), mm cinsinden kumpas/cetvel yardımıyla ölçülmesi ile incelenen maddenin antibakteriyel etkisisinin değerlendirilmesi.

Deneyin Yapılışı: Bölüm 3.9.3.2.`den elde edilen ve spektroskopik & kromatografik yöntemler ile yapısal saflığı belirlenen AA`nın antibakteriyel aktivitesinin belirlenmesinde; Bauer ve ark. tarafından geliştirilen disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır (Bauer ve ark., 1966). Yöntemde, standart AA ve deneylerden elde edilen AA`ların steril şartlarda, 500 mg/mL konsantrasyonda DMSO ile stok çözeltisi hazırlanmış, mikroorganizma olarak ise; ciltte yaygın olarak bulunan 2 adet gram pozitif bakterinin 4 farklı suşu olan *Staphylococcus aureus ATCC 25923*, MRSA *Staphylococcus aureus ATCC 43300, Staphylococcus epidermidis ATTC 35984, Staphylococcus epidermidis ATTC 12228* bakterileri kullanılmıştır. Bakterilerin büyümesi/üremesini sağlayacak besiyeri olarak ise; su ve fosfat tamponunun kullanılmasıyla iki farklı pH`da hazırlanmış (pH= 7,3 ve pH= 5,6) Mueller-Hinton Agar (MHA) süspansiyonu kullanılmıştır. Hazırlanan besiyerleri sterilize edilmiş ve sonrasında 4 mm kalınlık oluşturacak şekilde steril petri kaplarına dökülmüştür. Agarın katılaşması için yaklaşık 1 gün kadar beklenmiş ve katılaşan agar üzerine Mc. Farland No: 0,5 (10^8 cfu/mL) yoğunluğuna ayarlanmış bakteri kültürlerinden 100 µL eklenerek steril eküvyonla homojen bir şekilde yayılmaları sağlanmıştır. Bakterilerin besiyerlerine ekilmesi işlemi sonrasında; 6 mm çaplı boş steril disklere (Oxoid^{TM}) standart ve stok AA çözeltilerinden 20 µL emdirilmiş ve her bir diskte 10 mg maddenin bulunması sağlanmıştır. Ardından agar yüzeyine, pozitif kontrol olarak Klaritromisin antibiyotiği içeren (CLR, 15 mcg, Bioanalyse), negatif kontrol olarak ise bu deneyde çözücü olarak kullanılan DMSO`nun emdirildiği bir disk, steril bir pens yardımıyla yerleştirilmiştir. Son olarak, besiyerleri 37˚C`de 24 saat süreyle inkübe edilmiş ve bu süre sonunda gözlenen inhibisyon bölgelerinin çapı (mm) bir kumpas veya cetvel yardımıyla ölçülerek, AA`nın antibakteriyel etkisi değerlendirilmeye çalışılmıştır.

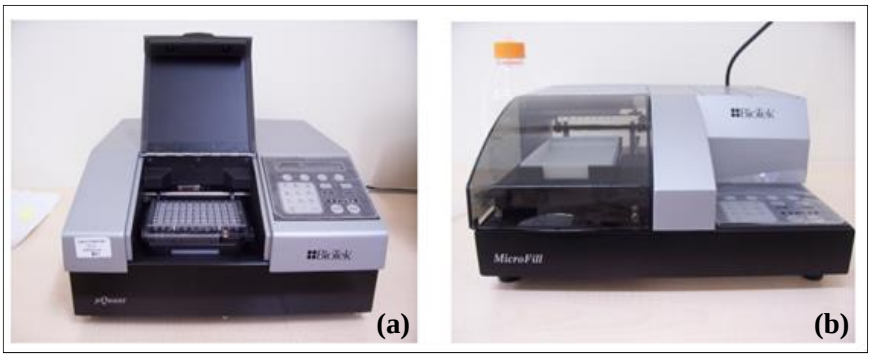
3.9.4.2. AA`nın Mikrodilüsyon Broth yöntemi ile antibakteriyel aktivite tayini

Mikrodilüsyon broth yöntemi ile antibakteriyel aktivite tayini; aktivitesi incelenen farklı içerik/konsantrasyona sahip madde dilüsyonlarının, belirli konsantrasyondaki mikroorganizmalara karşı etkisinin, 96 kuyucuklu mikroplakalar kullanılarak bir seri seyreltme yöntemi ile incelenmesi ve bakteriyostatik etki gücünün göstergesi olan minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerlerinin tespit edilmesi esasına dayanmaktadır. Söz konusu prosedür şu basamaklardan oluşmaktadır: ***(i)*** uygun şartlarda bir besiyeri ortamının (Müeller Hinton Broth solüsyonu, MHB) hazırlanması ve bakteri süspansiyonunun bu besiyeri ortamına ekilmesi, ***(ii)*** bakteri içeren

besiyerlerinin 37˚C`de 24 saat süreyle inkübe edilmesi ile bakterilerin üremesinin sağlanması, ***(iii)*** pozitif kontrol olarak kullanılacak antibiyotik ve aktivitesi incelenecek maddeye ait stok çözeltilerin hazırlanması, ***(iv)*** sıvı besiyerinin (MHB), 96 kuyucuklu mikroplaka içerisine otomatik dispenser cihazı yardımıyla dağıtılması, ***(v)*** mikroplaka üzerindeki ilk kuyucuklara, aktivitesi incelenecek madde/maddelerin stok çözeltilerinden, pozitif ve negatif kontrol amacıyla kullanılacak maddelerden belli miktarda ilave edilmesi, ***(vi)*** ilk kuyucukta bulunan maddelerin çok kanallı bir mikropipet yardımı ile ½ oranında bir seri dilüsyon işlemine tabi tutulması ve plakanın inhibisyon öncesi (0. dk ölçümü, OD) 600 nm dalga boyunda bir mikroplaka okuyucu (elisa okuyucu) ile absorbans değerlerinin ölçülmesi, ***(vii)*** plakaların belli bir süre (18-48 sa) 37 °C`de inkübe edildikten sonra, yine 600 nm dalga boyunda mikroplaka okuyucu ile absorbans değerlerinin ölçülmesi, ***(viii)*** elde edilen absorbans değerleri yardımıyla, incelenen madde için MİK değerinin hesaplanması, ***(ix)*** bir boyar madde yardımıyla plaka kuyucuklarında bulunabilecek bakterilerin renklendirilmesi ve aktivitesi incelenen madde için hesaplanan MİK değerinin görsel olarak doğrulanması.

Deneyin Yapılışı: Bölüm 3.9.3.2.`den elde edilen ve spektroskopik & kromatografik yöntemler ile yapısal saflığı belirlenen AA`nın antibakteriyel aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan bir diğer yöntem; ABD'de CLSI ve Avrupa'da EUCAST (European Confederation of Antifungal Susceptibility Testing) komiteleri tarafından *in-vitro* koşullar için geliştirilen Mikrodilüsyon Broth yöntemidir. Yöntemde, standart AA ve elde edilen AA bileşikleri için DMSO ile hazırlanmış 128 mg/mL konsantrasyondaki stok çözeltileri, pozitif kontrol olarak ise Klaritromisin antibiyotiğinin saf su içinde hazırlanmış 512 µg/mL konsantrasyondaki çözeltisi kullanılmıştır. Ciltte yaygın olarak bulunan 2 adet gram pozitif bakterinin 4 farklı suşu olan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, MRSA *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Staphylococcus epidermidis* ATTC 35984, *Staphylococcus epidermidis* ATTC 12228 bakterilerinin mikroorganizma olarak kullanıldığı deneylerde, bakterilerin büyümesi/üremesini sağlayacak besiyeri olarak ise; su ve fosfat tamponunun kullanılmasıyla iki farklı pH`da hazırlanmış (pH= 7,3 ve pH= 5,6) Müeller Hinton Broth (MHB) süspansiyonu kullanılmıştır. Hazırlanan besiyeri sterilize edildikten sonra içerisine steril bir mikropipet yardımı ile Mc. Farland 0,5 bulanıklık değeri elde edilinceye kadar bakteri ekimi gerçekleştirilmiş ve bakteri içeren besiyerleri 37 °C`de 24 saat süreyle inkübe edilerek, bakterilerin üremesi sağlanmıştır. İnkübasyon süresi tamamlanınca, bakteri ortamından 0,5 mL alınarak

MHB ile 1/100 oranında seyreltilmiş ve ~10^6 cfu mL^{-1} bulanıklığa sahip bakteri stok kültürleri elde edilmiştir. MİK tayini için ise; 96 kuyucuklu steril mikrotitrasyon plakalarının bütün kuyucuklarına otomatik bir dispenser cihazı (BioTek, MicroFill) ile 100 µL MHB besiyeri eklenmiş, daha sonra plakaların ilk sütunundaki kuyucuklara standart AA, elde edilen saf AA ve pozitif kontrol olarak kullanılan Klaritromisin antibiyotiğinin stok çözeltilerinden 100`er µL ilave edilmiştir. Ardından, 8 kanallı bir mikropipet yardımı ile ilk kuyucuklardaki numunelerden 100'er µL alınmış ve 10. kuyucuğa kadar bir seri dilüsyon işlemi gerçekleştirilmiştir (seyrelmeler ½ oranındadır). Bununla birlikte, mikroplakanın 11. sütunu üreme kontrol, 12. sütunu ise negatif kontrol işlemi için ayrılmıştır. Gerçekleştirilen seri dilüsyon işlemi sonrasında, plakalarının 12. sütunu haricindeki tüm kuyucuklara bir otomatik dispenser yardımıyla stok bakteri kültüründen 100`er µL eklenmiş (herbir kuyucukta 5x$10^5$ cfu $mL^{-1}$ bulanıklığa sahip bakteri olacak şekilde) ve 0. dk ölçümü olarak 600 nm dalgaboyunda absorbans ölçümü gerçekleştirilmiştir. Daha sonra, mikroplakalar ağzı kapatılarak 24 saat süreyle 37 °C`de inkübe edilmiş, inkübasyondan sonra ise 600 nm dalga boyunda tekrar absorbans değerleri okunmuştur. Absorbans ölçümleri sonunda, üremenin görülmediği en düşük konsantrasyonu temsil eden kuyucuklar MİK değerleri olarak kabul edilmiştir. MİK değerleri ayrıca TTC yöntemiyle de doğrulanmıştır. Bunun için; mikroplakaların her bir kuyucuğuna steril distile su ile hazırlanan % 0,5 konsantrasyona sahip TTC boyasından 20 µL ilave edilmiş ve karanlıkta gerçekleştirilen yarım saat bekletme işlemi sonrasında kuyucuklarda meydana gelen renk değişimleri izlenmiştir. Bakteri üremesinin olduğu kuyucuklarda kırmızı renk gözlenirken, üremenin olmadığı kuyucuklarda ise herhangi bir renk değişimi olmamıştır. Gözle yapılan değerlendirmeler sonunda, renklenmenin olmadığı ilk kuyucuklar MİK değeri olarak kabul edilmiştir.



Şekil 3.11. AA`nın Mikrodilüsyon Broth Yöntemi ile Antibakteriyel Aktivite Tayininde Kullanılan **(a)** Mikroplaka Okuyucu, **(b)** Otomatik Dispenser

3.10. AA İçeren Farklı Topikal krem Formülasyonlarının Geliştirilmesi

Antimikrobiyal, antienflamatuar ve antitümöral etkilere sahip olduğu literatür bilgileriyle kanıtlanmış olan ve teratojenik & mutajenik olmayan özellikler sergilemesi bakımından güvenli ve tereddütsüz bir kullanımı bulunan AA`nın; cilt rengini açıcı, akne, rozasea ve deride leke (malezma) gibi cilt rahatsızlıklarını tedavi edici/iyileştirici özelliklerinin bulunması sebebiyle kozmesötik ürünlerde ve topikal krem/jellerde genellikle % 15-20 konsantrasyonda bulunduğu bilinmektedir. Söz konusu bu hususlar göz önünde bulundurularak, sunulan tez çalışmasında, önceki işlem basamaklarında saf olarak elde edilen AA kullanılarak farklı içeriğe sahip krem formülasyonları geliştirilmiş ve geliştirilen topikal krem formülasyonlarının, akne başta olmak üzere diğer bazı cilt rahatsızlıkları için de kullanılabilirliğinin belirlenebilmesi için antibakteriyel etkinlikleri araştırılmıştır.

Krem formülasyonlarının geliştirilmesinde; etkin madde olarak sadece AA`dan faydalanılmamış, onun gibi renk açıcı özelliği bulunan SA de krem formülasyonlarına dahil edilmiştir. Böylece AA`nın tek başına gösterdiği etkinin yanı sıra, farklı etkin maddeler ile birlikte olan etkisi de (sinerjik veya antagonist etki) ortaya çıkarılmaya çalışılmıştır. Bu doğrultuda, sunulan tez çalışması kapsamında hazırlanan topikal krem formülasyonları etkin madde içeriği bakımından; ***(i)*** sadece AA içeren ***(ii)*** sadece SA içeren ***(iii)*** AA ve SA kombinasyonunu içeren formülasyonlar olmak üzere 3 şekilde sınıflandırılabilir. Buna göre; hazırlanan 6 farklı krem formülasyonunun geliştirilmesinde kullanılan etkin ve yardımcı maddelerin % ağırlık cinsinden miktarları **Tablo 3.7.**`de verilmiştir (geliştirilen krem formülasyonlarının patentlendirilmesi düşünüldüğü için hazırlık sürecinde yer alan basamaklar detaylı olarak verilmemiştir).

Tablo 3.7. Krem Formülasyonlarının Geliştirilmesinde Kullanılan Etkin ve Yardımcı Maddelerin Miktarları (% w/w)

Kimyasal Maddeler	Formül-1	Formül-2	Formül-3	Formül-4	Formül-5	Formül-6
Azelaik Asit	0,00	0,50	0,00	0,50	1,00	10,00
Salisilik Asit	0,00	0,00	0,50	0,50	0,00	0,00
Gliserin	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50
Setil Alkol	3,50	3,50	3,50	3,50	3,50	3,50
Karbomer	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
Dimetikon100	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Gliserol Monostearat	3,50	3,50	3,50	3,50	3,50	3,50
Kaprik Trigliserit	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
Polisorbat-20	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
E vitamini	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Triethanolamin (TEA)	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.
Ultra saf su	85,00	84,50	84,50	84,00	84,00	75,00

* Krem formülasyonlarındaki etkin madde içerikleri ***Formül-1:*** Etkin madde içermeyen krem, ***Formül-2:*** % 0,5 AA içeren Krem, ***Formül-3:*** % 0,5 SA içeren Krem, ***Formül-4:*** % 0,5 AA +% 0,5 SA içeren Krem, ***Formül-5:*** % 1 AA içeren Krem, ***Formül-6:*** % 10 AA içeren Krem



Şekil 3.12. Tez Kapsamında Elde Edilen AA`nın Kullanılmasıyla Geliştirilen Farklı Krem Formülasyonlarının Görünümü

3.10.1. Geliştirilen topikal krem formülasyonlarının organoleptik ve fiziksel/kimyasal özellikleri

3.10.2. Geliştirilen topikal krem formülasyonlarının *in-vitro* koşullarda incelenmesi

Tez kapsamında yer alan çalışmalardan elde edilen saf AA`nın kullanılması ile hazırlanan 6 farklı topikal krem fromülasyonunun *in-vitro* koşullardaki etkinliği, antibakteriyel aktivite özellikleri tespit edilerek belirlenmeye çalışılmıştır.

3.10.2.1. Krem formülasyonlarının disk difüzyon yöntemi ile antibakteriyel aktivite tayini

Geliştirilen krem formülasyonlarının disk difüzyon yöntemi ile antibakteriyel aktivite tayinleri, önceki işlem basamaklarında elde edilen AA için de uygulanmış olan ve **Bölüm 3.9.4.1.**`de işlem prosedürü detaylı şekilde açıklanan yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.10.2.2. Krem formülasyonlarının mikrodilüsyon broth yöntemi ile antibakteriyel aktivite tayini

Geliştirilen krem formülasyonlarının mikrodilüsyon broth yöntemi ile antibakteriyel aktivite tayinleri, önceki işlem basamaklarında elde edilen AA için de uygulanmış olan ve **Bölüm 3.9.4.2.**`de işlem prosedürü detaylı şekilde açıklanan yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. Zeytinyağı Numuneleri Üzerinde Gerçekleştirilen Fizikokimyasal Analizler

Deneylerde kullanılmış olan zeytinyağları içerisinde oluşabilecek fiziksel ve kimyasal değişimlerin incelenmesi amacıyla serbest yağ asidi (FFA), peroksit sayısı (PV), iyot sayısı (IV), sabunlaşma sayısı (SV) ve yağ asit kompozisyonu tayinleri gerçekleştirilmiş ve sonuçlara ilişkin bilgiler ilgili bölümlerde yer almıştır.

4.1.1. Serbest yağ asidi (%FFA) tayini

Deneylerde kullanılan zeytinyağı numunelerinin % FFA tayini için standart bir metot olan AOCS Ca-5a-40 kullanılmış olup; % OA cinsinden hesaplanan sonuçlar, **Türk Gıda Kodeksi'nce** belirlenen limit değerler ile birlikte **Tablo 4.1**`de verilmiştir.

Tablo 4.1. Deneylerde Kulalnılan Zeytinyağı Numunelerinin % FFA Miktarları

Zeytinyağı Numuneleri	% FFA	Türk Gıda Kodeksi'ne göre % FFA Değerleri
A Naturel Sızma Zeytinyağı	0,5139	Naturel Sızma Zeytinyağı FFA ≤ 0,8
B Naturel Sızma Zeytinyağı	0,7046	
C Riviera Zeytinyağı	0,3293	Riviera Zeytinyağı % FFA ≤ 1,0

Tablo 4.1.`de yer alan veriler, deneylerde kullanılan zeytinyağı numunelerine ait % FFA değerlerinin, **Türk Gıda Kodeksi Yemeklik Zeytinyağı ve Yemeklik Prina Yağı Tebliği**`nde belirtilen sınırlar içerisinde olduğunu göstermiştir.

4.1.2. Peroksit sayısı (PV) tayini

Zeytinyağı numunelerinin PV tayini için standart bir metot olan AOCS Cd-8b-90 kullanılmış olup; mg O_2/kg yağ cinsinden hesaplanan sonuçlar, Türk Gıda **Kodeksi'nce** belirlenen limit değerler ile birlikte **Tablo 4.2**`de verilmiştir.

Tablo 4.2. Deneylerde Kulalnılan Zeytinyağı Numunelerinin PV Miktarları (mg O_2/kg yağ)

Zeytinyağı Numuneleri	PV (mg O_2/kg yağ)	Türk Gıda Kodeksi'ne göre PV Değerleri
A Naturel Sızma Zeytinyağı	13,9420	Naturel Sızma Zeytinyağı ≤ 20
B Naturel Sızma Zeytinyağı	12,920	
C Riviera Zeytinyağı	10,8920	Riviera Zeytinyağı ≤ 15

Tablo 4.2.`de yer alan veriler, deneylerde kullanılan zeytinyağı numunelerine ait PV değerlerinin, **Türk Gıda Kodeksi Yemeklik Zeytinyağı ve Yemeklik Prina Yağı Tebliği**`nde belirtilen sınırlar içerisinde olduğunu göstermiştir.

4.1.3. İyot sayısı (IV) tayini

Zeytinyağı numunelerinin IV tayini için standart bir metot olan TS-894 metodu kullanılmış olup; g I_2/100 g yağ cinsinden hesaplanan sonuçlar, Türk Gıda **Kodeksi'nce** belirlenen limit değerler ile birlikte **Tablo 4.3**`de verilmiştir.

Tablo 4.3. Zeytinyağı Numunelerinin IV Miktarları (g I_2/100 g yağ)

Zeytinyağı Numuneleri	IV (g I_2/100 g yağ)	Türk Gıda Kodeksi'ne göre IV Değerleri
A Naturel Sızma Zeytinyağı	80,0097	78-88
B Naturel Sızma Zeytinyağı	83,7566	
C Riviera Zeytinyağı	81,6585	75-92

Tablo 4.3.`de yer alan veriler, deneylerde kullanılan zeytinyağı numunelerine ait IV değerlerinin, **Türk Gıda Kodeksi Yemeklik Zeytinyağı ve Yemeklik Prina Yağı Tebliği**`nde belirtilen sınırlar içerisinde olduğunu göstermiştir.

4.1.4. Sabunlaşma sayısı (SV) tayini

Zeytinyağı numunelerinin SV tayini için standart bir metot olan TSE 4962 metodu kullanılmış olup; mg KOH/kg yağ cinsinden hesaplanan sonuçlar, Türk Gıda **Kodeksi'nce** belirlenen limit değerler ile birlikte **Tablo 4.4**`de verilmiştir.

Tablo 4.4. Zeytinyağı Numunelerinin SV Miktarları (mg KOH/kg yağ)

Zeytinyağı Numuneleri	SV (mg KOH/kg yağ)	Türk Gıda Kodeksi'ne göre SV Değerleri
A Naturel Sızma Zeytinyağı	190,7123	184-196 mg KOH/kg
B Naturel Sızma Zeytinyağı	187,4568	
C Riviera Zeytinyağı	185,9674	182-193 mg KOH/kg

Tablo 4.4.`de yer alan veriler, deneylerde kullanılan zeytinyağı numunelerine ait SV değerlerinin, **Türk Gıda Kodeksi Yemeklik Zeytinyağı ve Yemeklik Prina Yağı Tebliği**`nde belirtilen sınırlar içerisinde olduğunu göstermiştir.

4.1.5. GC-FID ile yağ asit kompozisyonu tayini

Deneylerde kullanılan zeytinyağı numunelerinin yağ asit kompozisyonları, GC-FID yöntemi ile HKARA metodu kullanılarak gerçekleştirilmiş olup; % cinsinden hesaplanan sonuçlar, yağ asitleri için Türk Gıda **Kodeksi'nce** belirlenen limit değerler ile birlikte **Tablo 4.5**`de verilmiştir.

Tablo 4.5. Çalışmada Kullanılan Zeytinyağları İçin HKARA Metodu ile Gerçekleştirilen Yağ Asit Kompozisyonu Çalışmalarından Elde Edilen Yağ Asit Dağılımları (%)

Yağ Asitleri	Alıkonma Zamanı	A Natural Sızma Zeytinyağı	B Naturel Sızma Zeytinyağı	C Riviera Zeytinyağı	Türk Gıda Kodeksi'ne göre
C 16:0	*40.186*	12.6112	13.2935	12.3905	7.5-20
C 16:1	*41.160*	1.1858	1.2537	1.0245	0.3-3.5
C 17:0	*41.825*	-	-	-	≤ 0.3
C 17:1	*42.719*	-	-	-	≤ 0.3
C 18:0	*43.536*	3.05598	2.7219	2.5479	0.5-5.0
C 18:1	*44.455*	70.4849	69.4111	71.7384	55.0-83.0
C 18:2	*45.564*	9.8811	10.4010	9.8645	3.5-21.0
C 18:3 n3	*46.387*	0.7842	0.7442	0.8339	≤ 0.9
C 20:1	*46.985*	0.53816	0.61459	0.56658	-
C22:0 + C20:3n6	*47.150*	0.41738	0.42628	0.44036	-
C24:0	*49.919*	0.65591	0.68818	0.40432	-

Yağ asit kompozisyonları incelenen zeytinyağları için elde edilen verileri standart değerlerle karşılaştırmak amacıyla, Türk Gıda Kodeksi (TGK) Yönetmeliği`nde yer alan değerler de tabloya ilave edilmiştir (yönetmelikte, ≤ 0.3 olan değerler tespit edilemeyen değer olarak verilmiştir).

Tablo 4.5. dikkate alındığında kullanılan bütün zeytinyağlarının % dağılım sonuçları T**ürk Gıda Kodeksi Yemeklik Zeytinyağı ve Yemeklik Prina Yağı Tebliği**`nce belirlenen değerler arasında yer aldığı görülmektedir.

4.2. Zeytinyağı Numunelerinden Sabunlaştırma Yöntemi ile Serbest Yağ Asitlerinin Eldesi

4.2.1. Sabunlaştırma İşleminin Verimi

A Naturel Sızma, B Naturel Sızma ve *C Riviera* şeklinde kodlandırılan zeytinyağı numunelerinden serbest yağ asidi eldesinde kullanılan etanollü KOH ile sabunlaştırma işleminin verimi, elde edilen serbest yağ asidi miktarı dikkate alınarak hesaplanmıştır. ~120 g zeytinyağı numunesinden yola çıkılarak yürütülen deneyler sonunda, zeytinyağı türüne bağlı olmaksızın ~95-103 g serbest yağ asidi elde edilmiş olup, sabunlaştırma işlemi verimi ~% 79-86 olarak tespit edilmiştir.

4.2.2. Serbest Yağ Asidi Miktarlarının RP-HPLC Yöntemi ile Belirlenmesi

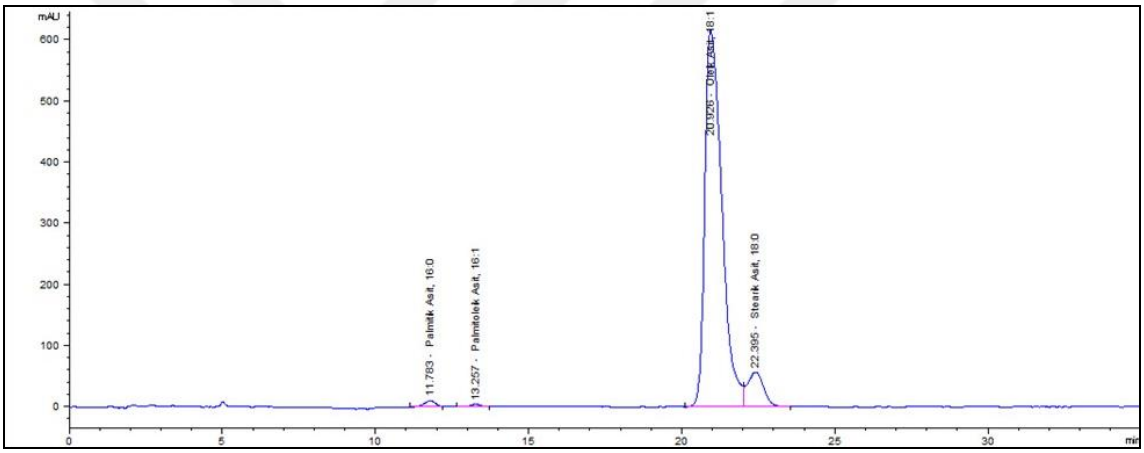
Zeytinyağı numunelerinden elde edilen serbest yağ asidi karışımlarında bulunan türlerin tayini, **Bölüm 3.8.**`de belirtilen RP-HPLC metot şartları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Türlerinin çıkış zamanlarını (t_R) belirlemede; *standart OA* (~% 90 civarında OA ve diğer doymuş & tekli doymamış yağ asitlerini içeren numune) için elde edilen kromatogram başta olmak üzere **(Şekil 4.1.),** *zeytinyağında bulunan serbest yağ*

asidi türlerinin % dağılımları ve konu ile ilgili *literatür verileri* (Christie; Al-Rimawi ve ark., 2015) dikkate alınmış olup, 35 dk süren kromatografik analizler sonunda, serbest yağ asidi türleri için belirlenen alıkonma zamanları **Tablo 4.6.**`da verilmiştir.

Tablo 4.6. Zeytinyağı Numunelerinden Elde Edilen Serbest Yağ Asidi Karışımlarındaki Yağ Asidi Türleri için RP-HPLC Yöntemi ile Belirlenen Alıkonma Zamanları

Serbest Yağ Asidi Türleri	Alıkonma Zamanları, t_R*
Linolenik Asit (C18:3)	2,03-4,18-4,31
Linoleik Asit (C18:2)	8,26-9,47-9,55
Palmitik Asit (C16:0)	11,87-14,08-14,24
Palmitoleik Asit (C16:1)	13,20-15,95-14,81
Araşidik Asit (C20:0)	14,73-17,62-18,23
Oleik Asit (C18:1)	20,62-24,77-27,83
Stearik Asit (C18:0)	22,20-27,02-28,20

* Farklı zamanlarda gerçekleştirilen RP-HPLC deneylerine ait alıkonma zamanlarını göstermektedir.

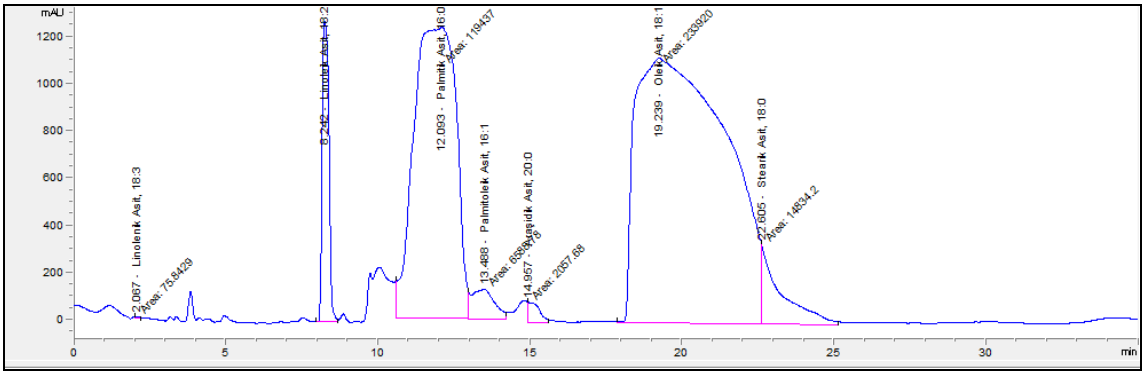


Şekil 4.1. Standart Oleik Aside Ait RP-HPLC Kromatogramı

Tablo 4.7. Standart OA`nın Ait RP-HPLC Kromatogramı Verileri

Yağ Asidi Türü	Çıkış zamanı	Alan	Yükseklik	Yarı pik genişliği	% Alan	Pik simetrisi
Palmitik Asit	11,783	249,1	9,8	0,3886	0,947	1,406
Palmitoleik Asit	13,257	94,6	3,9	0,3573	0,360	1,217
Oleik Asit	20,926	23888,1	616,7	1,6199	90,852	0,482
Stearik Asit	22,395	2061,7	56,5	0,5497	7,841	0,926

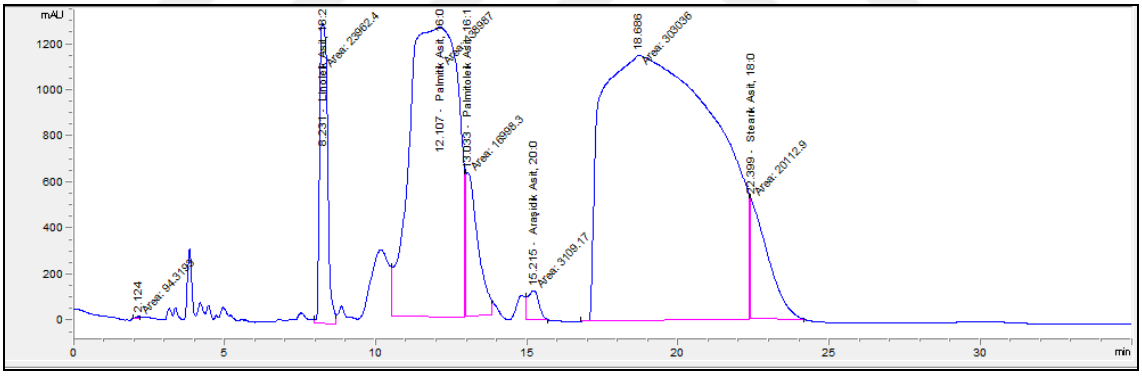
A Naturel Sızma, *B Naturel Sızma* ve *C Riviera* şeklinde kodlandırılan zeytinyağı numunelerinin sabunlaştırılması ile elde edilen serbest yağ asidi karışımlarının, RP-HPLC analizleri sonunda gözlenen kromatogramlar ise aşağıda yer almaktadır.



Şekil 4.2. *A Naturel Sızma* Zeytinyağı Numunesinden Elde Edilen Serbest Yağ Asitlerine Ait RP-HPLC Kromatogramı

Tablo 4.8. *A Naturel Sızma* Zeytinyağı Numunesinden Elde Edilen Serbest Yağ Asitlerine Ait RP-HPLC Kromatogram Verileri

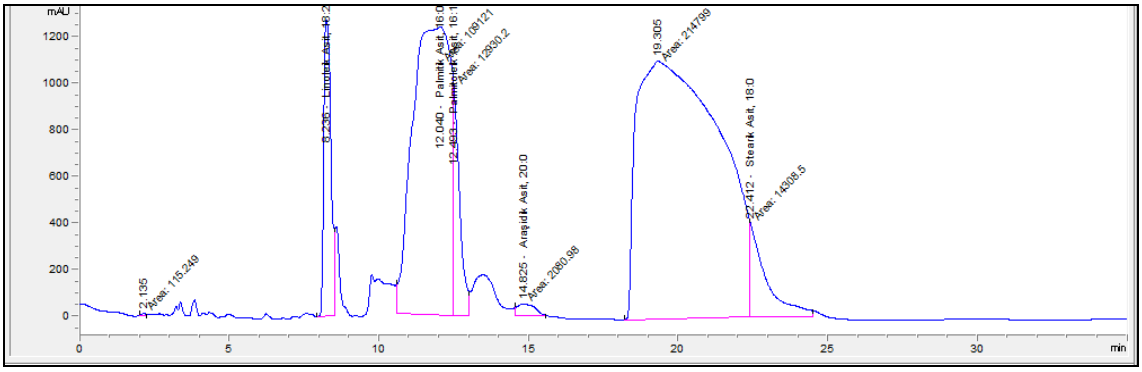
Yağ Asidi Türü	Çıkış zamanı	Alan	Yükseklik	Yarı pik genişliği	% Alan	Pik simetri
Linolenik Asit	2,067	75,8	8,2	0,1546	0,019	0,473
Linoleik Asit	8,242	19973,6	1274,7	0,2588	5,033	0,64
Palmitik Asit	12,093	119437	1236,8	1,6094	30,093	1,789
Palmitoleik Asit	13,488	6588,8	126,5	0,8679	1,66	1,096
Araşidik Asit	14,957	2057,7	86,6	0,3079	0,518	0
Oleik Asit	19,239	233920,5	1122,6	3,4729	58,939	0,346
Stearik Asit	22,605	14834,2	339,3	0,7287	3,738	0



Şekil 4.3. *B Naturel Sızma* Zeytinyağı Numunesinden Elde Edilen Serbest Yağ Asitlerine Ait RP-HPLC Kromatogramı

Tablo 4.9. *B Naturel Sızma* Zeytinyağı Numunesinden Elde Edilen Serbest Yağ Asitlerine Ait RP-HPLC Kromatogram Verileri

Yağ Asidi Türü	Çıkış zamanı	Alan	Yükseklik	Yarı pik genişliği	% Alan	Pik simetri
Linolenik Asit	2,124	94,3	9,2	0,1717	0,019	1,015
Linoleik Asit	8,231	23962,4	1300,4	0,3071	4,733	0,614
Palmitik Asit	12,107	138986,7	1259	1,84	27,451	1,47
Palmitoleik Asit	13,033	16998,3	625,6	0,3918	3,357	0,162
Araşidik Asit	15,215	3109,2	127,3	0,4072	0,614	1,038
Oleik Asit	18,686	303036,3	1152,4	4,3826	59,853	0,458
Stearik Asit	22,399	20112,9	523,1	0,6408	3,973	0



Şekil 4.4. *C Riviera* Zeytinyağı Numunesinden Elde Edilen Serbest Yağ Asitlerine Ait RP-HPLC Kromatogramı

Tablo 4.10. *C Naturel Sızma* Zeytinyağı Numunesinden Elde Edilen Serbest Yağ Asitlerine Ait RP-HPLC Kromatogram Verileri

Yağ Asidi Türü	Çıkış zamanı	Alan	Yükseklik	Yarı pik genişliği	% Alan	Pik simetri
Linolenik Asit	2,135	115,2	11,1	0,1724	0,031	0,984
Linoleik Asit	8,236	21666,4	1272,5	0,2706	5,777	0,557
Palmitik Asit	12,04	109121,2	1241,5	1,4649	29,097	2,409
Palmitoleik Asit	12,493	12930,2	986,2	0,2185	3,448	0
Araşidik Asit	14,825	2081	51	0,68	0,555	0,5
Oleik Asit	19,305	214798,6	1110,1	3,225	57,276	0,33
Stearik Asit	22,412	14308,5	401,6	0,4169	3,815	0

Farklı türde zeytinyağı numunelerinden elde edilen serbest yağ asidi karışımlarına ait RP-HPLC kromatogramı verilerinden de görüleceği üzere; numunelerde bulunan yağ asidi türlerine ilişkin yüzde dağılım değerlerinin, kullanılan zeytinyağının türüne bağlı olmaksızın hemen hemen aynı oldukları görülmüştür. Buna göre; zeytinyağının temel yağ asitlerinden linoleik asidin % 4,73-5,78 ; palmitik asidin % 27,45-30,09 ; OA`nın % 57,28-59,85 ve stearik asidin % 3,74-3,97 aralığında bir dağılım sergilediği tespit edilmiş, palmitik asit miktarı biraz fazla bulunmakla birlikte, diğer yağ asidi değerlerinin Türk Gıda Kodeksi Zeytinyağı ve Pirina Yağı Tebliği`nde yer alan veriler ile örtüştüğü görülmüştür (Tebliğ, 2017).

4.3. Serbest Yağ Asidi Karışımından Farklı Metotlarla OA Eldesi ve Saflaştırılması

Tez kapsamında elde edilen serbest yağ asidi karışımlarından OA`nın elde edilmesinde üç farklı metot *(düşük sıcaklıkta kristalizasyon, üre fraksiyonlama, çözücü kristalizasyonu)* kullanılmış olup, herbir metottan elde edilen yan ve ana ürünlerin RP-HPLC yöntemi ile analizi sonunda elde edilen verilerin değerlendirilmesi ile, OA eldesi için en etkili ve verimli metot tespit edilmeye çalışılmıştır.

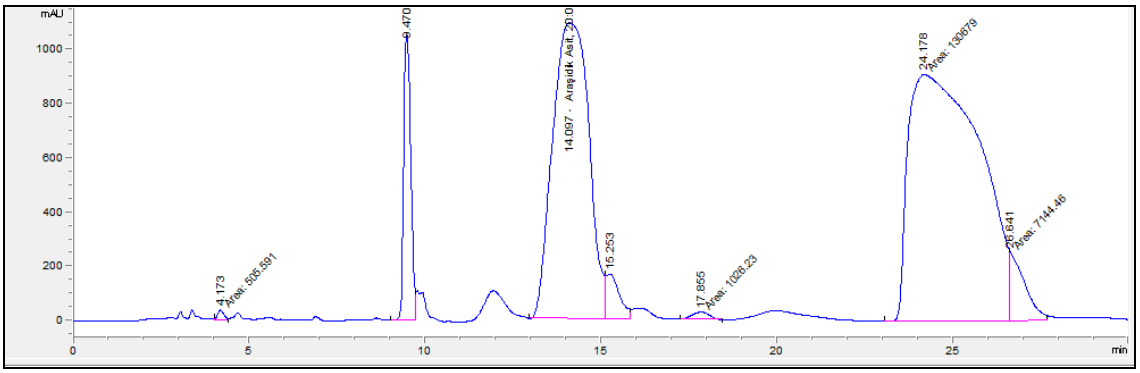
A Naturel Sızma, *B Naturel Sızma* ve *C Riviera* şeklinde kodlandırılan zeytinyağı numunelerinden elde edilen serbest yağ asitleri üzerinde gerçekleştirilen OA eldesi deneyleri sonunda yapılan analizlerden çok sayıda veri elde edilmiş olduğundan, burada sadece *C Riviera*`dan elde edilen serbest yağ asitleri üzerinden OA eldesine ilişkin sonuçlara yer verilmiş, diğer yağlar için elde edilen veriler ise, herbir metotlara ilişkin sonuçlar kısmında ayrı tablolar halinde sunulmuştur.

4.3.1. Düşük sıcaklıkta direkt kristalizasyon metodu (DSDKM) ile OA eldesi

Düşük sıcaklıkta direkt kristalizasyon metodu (DSDKM) ile OA eldesinde; öncelikle doymuş ve tekli doymamış yağ asitlerinin çoklu doymamış yağ asitlerinden ayrılması ***(1. kademe kristallendirme işlemi)***, sonrasında ise bu kademeden elde edilen katı kısımdaki OA`nın (doymuş yağ asitleri ile birlikte bulunan), doymuş yağ asitlerinden ayrılması işlemlerinin ***(2. kademe kristallendirme işlemi)*** gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. Kristallendirme işlemlerinin gerçekleştirilmesinde, yağ asitlerinin erime noktaları (stearik asit (18:0) için 70,1 °C; OA (18:1) için 16,3 °C; linoleik asit (18:2) için -6,5 °C; linolenik asit (18:3) için -12,8 °C) dikkate alınmıştır (Dağlıoğlu ve Taşan; Wanasundara ve Shahidi, 1998).

Söz konusu işlemlerden; 5-10 °C arasındaki bir sıcaklıkta ve 15-30 saatlik bir periyotta gerçekleştirilen ve ***2. kristallendirme işlemi***nin gerçekleştirip/gerçekleştirilmeyeceğine dair kararın verilmesinde etkin rol oynayan ***1. kademe kristallendirme işlemi*** sonunda elde edilen katı ve sıvı kısımlar, içerisinde bulunan OA miktarlarının belirlenmesi amacıyla RP-HPLC yöntemi ile analiz edilmiş ve DSDKM metodunun verimliliği değerlendirilmeye çalışılmıştır. Numunelerdeki OA miktarının ve saflığının belirlenmesinde, **Bölüm 3.8.`de** yer alan kromatografik metot şartları kullanılmıştır.

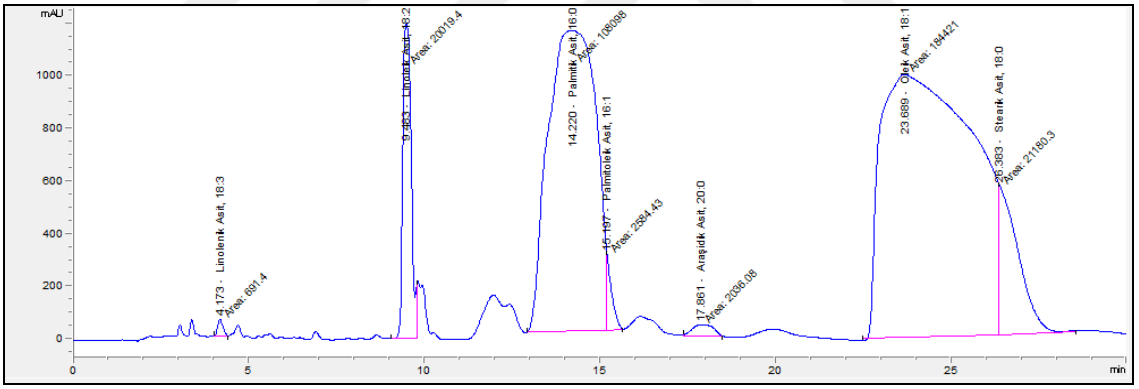
C Riviera zeytinyağı numunesinden elde edilen, % 55,14 OA içeriğine sahip serbest yağ asidi karışımının **(bkz. Şekil 4.5. ve Tablo 4.11.)** kullanılması ile gerçekleştirilen DSDKM ile OA eldesi çalışmalarında; ***1. kademe kristallendirme işlemi*** sonunda elde edilen katı ve sıvı kısımların RP-HPLC yöntemi ile analizlerinden elde edilen kromatogramlar **Şekil 4.6. ve Şekil 4.7.**`de, analiz sonuçlarını gösterir veriler ise **Tablo 4.12. ve Tablo 4.13.**`de verilmiştir. Diğer yağ numunelerinden yola çıkılarak, DSDKM ile OA eldesi çalışmalarından elde edilen sonuçlar ise **Tablo 4.14.**`de yer almaktadır.



Şekil 4.5. DSDKM ile OA Eldesinde Kullanılan *C Riviera* Zeytinyağı Numunesinden Elde Edilmiş Serbest Yağ Asitlerine Ait RP-HPLC Kromatogramı

Tablo 4.11. DSDKM ile OA Eldesinde Kullanılan *C Riviera* Zeytinyağı Numunesinden Elde Edilmiş Serbest Yağ Asitlerine Ait RP-HPLC Kromatogramı Verileri

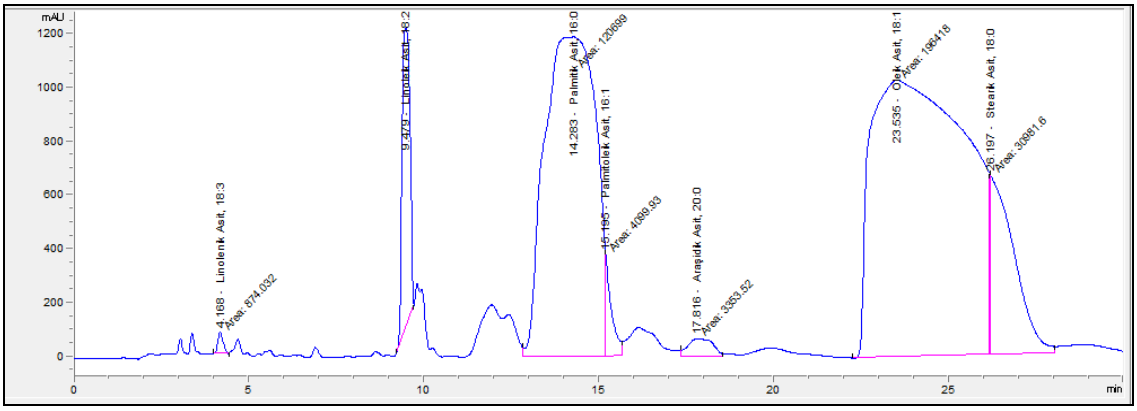
Yağ Asidi Türü	Çıkış zamanı	Alan	Yükseklik	Yarı pik genişliği	% Alan	Pik simetri
Linolenik Asit	4,173	505,6	38,6	0,2183	0,213	0,719
Linoleik Asit	9,47	14820,3	1055,8	0,2278	6,253	0,692
Palmitik Asit	14,097	78528,1	1092,3	1,1507	33,134	0,847
Palmitoleik Asit	15,253	4297,5	164,3	0,3811	1,813	0,333
Araşidik Asit	17,855	1026,2	28,3	0,6044	0,433	1,233
Oleik Asit	24,178	130679,3	912,5	2,3869	55,139	0,281
Stearik Asit	26,641	7144,5	256,2	0,344	3,015	0



Şekil 4.6. DSDKM Yöntemi ile OA Eldesinde 1. Kristalizasyon İşlemi Sonunda Elde Edilen Katı Kısma Ait RP-HPLC Kromatogramı (*C Riviera* zeytinyağı numunesinden elde edilen serbest yağ asitleri kullanılmıştır)

Tablo 4.12. DSKM Yöntemi ile OA Eldesinde 1. Kristalizasyon İşlemi Sonunda Elde Edilen Katı Kısma Ait RP-HPLC Kromatogramı Verileri

Yağ Asidi Türü	Çıkış zamanı	Alan	Yükseklik	Yarı pik genişliği	% Alan	Pik simetri
Linolenik Asit	4,173	691,4	64,4	0,1789	0,204	0,784
Linoleik Asit	9,483	20019,4	1199,7	0,2781	5,905	0,733
Palmitik Asit	14,22	108098,2	1143,1	1,5762	31,884	1,034
Palmitoleik Asit	15,197	2584,4	287,5	0,1498	0,762	0
Araşidik Asit	17,861	2036,1	45,1	0,7528	0,601	0,7
Oleik Asit	23,689	184421	1001	3,0706	54,397	0,357
Stearik Asit	26,383	21180,3	566	0,6237	6,247	0



Şekil 4.7. DSDKM Yöntemi ile OA Eldesinde 1. Kristalizasyon İşlemi Sonunda Elde Edilen Sıvı Kısma Ait RP-HPLC Kromatogramı (*C Riviera* zeytinyağı numunesinden elde edilen serbest yağ asitleri kullanılmıştır)

Tablo 4.13. DSDKM Yöntemi ile OA Eldesinde 1. Kristalizasyon İşlemi Sonunda Elde Edilen Sıvı Kısma Ait RP-HPLC Kromatogramı Verileri

Yağ Asidi Türü	Çıkış zamanı	Alan	Yükseklik	Yarı pik genişliği	% Alan	Pik simetri
Linolenik Asit	4,168	874	80	0,1822	0,234	0,759
Linoleik Asit	9,479	17421,4	1116,9	0,266	4,66	0,883
Palmitik Asit	14,283	120698,6	1188,3	1,6929	32,286	1,27
Palmitoleik Asit	15,195	4099,9	377,3	0,1811	1,097	0
Araşidik Asit	17,816	3353,5	68,1	0,821	0,897	0,625
Oleik Asit	23,535	196418	1029,8	3,179	52,54	0,381
Stearik Asit	26,197	30981,6	666,8	0,7744	8,287	0

Elde edilen kromatogramlardan ve analiz sonuçlarının yer aldığı tablolardan da görüleceği üzere; serbest yağ asidi karışımı içerisinde sırasıyla % 33,13 ; % 55,14 ; % 3,02 olarak bulunan *palmitik*, *oleik* ve *stearik* asit miktarları, ***1. kristallendirme işlemi*** sonunda elde edilen katı kısımda % 31,88 ; % 54,40 ; % 6,25, sıvı kısımda ise % 32,29 ; % 52,54 ; % 8,28 olarak tespit edilmiştir. Doymuş ve tekli doymamış yağ asidi miktarlarının, kristallendirme işlemi sonunda elde edilen katı kısımda artması, sıvı kısımda ise azalması beklenirken; katı ve sıvı kısımdaki yağ asidi dağılımlarının birbirine oldukça yakın oldukları görülmüş, özellikle de OA`nın sıvı kısımda yüksek miktarda bulunması istenmeyen bir durum oluşturmuştur. Söz konusu durum sebebiyle, OA`nın doymuş yağ asitlerinden ayrılması için gerçekleştirilecek olan ***2. kristallendirme işlemi***ne devam edilmemiş ve DSDKM yönteminin yüksek verimde ve saflıkta OA eldesi için uygun bir yöntem olmadığı sonucuna varılmıştır.

Tablo 4.14. *A Naturel Sızma*, *B Naturel Sızma* ve *C Riviera* Zeytinyağı Numunelerinden Elde Edilen Serbest Yağ Asidi Karışımlarından DSDKM Yöntemi ile OA Eldesi için Toplu RP-HPLC Analiz Sonuçları

DENEYLER	Yağ Miktarı (g)	Elde Edilen FFAs Miktarı	Deney Kodlamaları	YAĞ ASİTLERİ (%)						
				Linoleik Asit (18:2)	Palmitik Asit (16:0)	Oleik Asit (18:1)	Stearik asit (18.0)	Araşidik (20.0)	Palmitoleik (16.1)	Linolenik (18.3)
Deney No: 21 Numune: A Naturel Sızma Zeytinyağı	**120 g**	**~100 g**	**21.0**	6.278	33.351	54.648	3.486	1.501	1.501	0.223
			21.D(K)	5.193	31.101	53.050	8.613	0.744	0.962	0.338
			21.D(S)	6.045	32.113	51.052	6.875	0.651	1.501	0.260
			21.D(K)A(K)	5.523	32.806	49.595	8.045	0.324	3.549	0.158
			21.D(K)A(S)	6.337	32.595	48.719	7.452	0.378	4.187	0.332
Deney No: 23 Numune: B Naturel Sızma Zeytinyağı	**120 g**	**~100 g**	**23.0**	5.825	36.220	52.574	3.501	0.512	0.880	0.488
			23.D(K)	5.212	34.167	50.111	8.203	0.694	0.977	0.636
			23.D(S)	5.287	34.768	49.467	8.047	0.188	1.018	0.725
			23.D(K)A(K)	5.367	35.244	49.116	4.484	0.409	5.115	0.265
			23.D(K)A(S)	4.896	37.692	45.974	3.446	1.710	3.221	0.233
Deney No: 27 Numune C Riviera Zeytinyağı	**120 g**	**~100 g**	**27.0**	6.253	33.134	55.139	3.015	0.433	1.813	0.213
			27.D(K)	5.905	31.884	54.397	6.247	0.601	0.762	0.204
			27.D(S)	4.660	32.286	52.540	8.287	0.897	1.097	0.234
			27.D(K)A(K)	6.332	31.986	51.586	6.008	0.387	3.510	0.191
			27.D(K)A(S)	6.652	33.759	51.950	3.903	0.290	3.204	0.241

Deney Kodlamaları

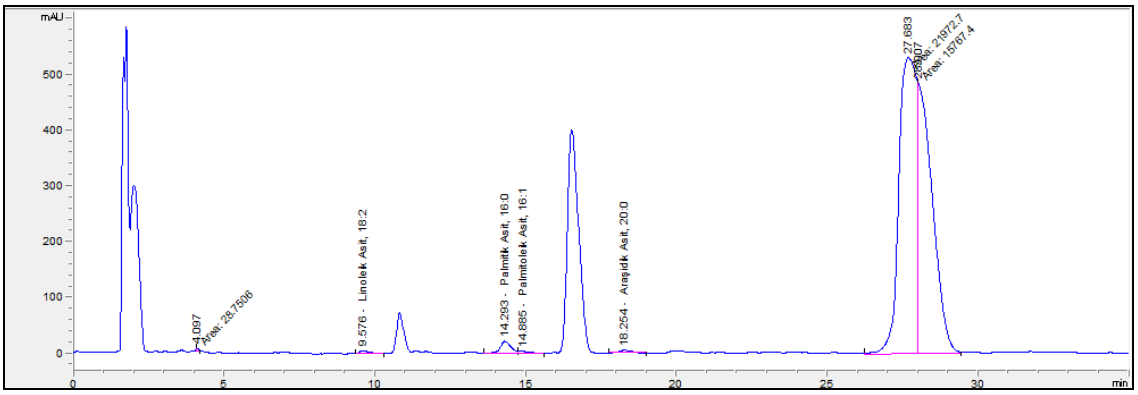
0:Serbest yağ asitleri
D(K): Düşük sıcaklıkta direkt kristalizasyon sonucu elde edilen katı kısım
D(S): Düşük sıcaklıkta direkt kristalasyon sonucu elde edilen sıvı kısım
D(K)A(K): Düşük sıcaklıkta direkt kristalizasyon sonucu elde edilen katı kısımın aseton ile kristalize işleminden elde edilen katı kısım
D(K)A(S): Düşük sıcaklıkta direkt kristalizasyon sonucu elde edilen katı kısımın aseton ile kristalize işleminden elde edilen sıvı kısım

4.3.2. Üre fraksiyonlama metodu (ÜFM) ile OA eldesi

Üre fraksiyonlama metodu (ÜFM) ile OA eldesi çalışmalarında; tekli doymamış yağ asitlerinin, çoklu doymamış yağ asitlerine kıyasla üre ile daha kararlı kompleksler oluşturduğu bilgisinden yola çıkılarak (Wu ve ark., 2008; Özmen, 2013; Setyawardhani ve ark., 2018) OA ile üre arasında tetragonal yapıda kararlı bir kristal yapının oluşturulması ile diğer yağ asitlerinden ayrılması amaçlanmıştır. Bu amaca istinaden, ilk olarak doymuş ve tekli doymamış yağ asitlerinin çoklu doymamış yağ asitlerinden ayrılması ***(üre ile 1. fraksiyonlama)***, sonrasında ise bu kademeden elde edilen katı kısımdaki OA`nın (doymuş yağ asitleri ile birlikte bulunan), doymuş yağ asitlerinden ayrılması işlemlerinin ***(üre ile 2. fraksiyonlama)*** gerçekleştirilmesi planlanmıştır. Üre fraksiyonlama çalışmalarında, zeytinyağı numunelerindeki sabunlaşmayan bileşenlerin uzaklaştırılmasından sonra elde edilen serbest yağ asidi karışımlarının kullanılmış olmasının, yağ asitleri ile üre arasında oluşan kompleksin kararlılığına katkı sağladığı düşünülmektedir.

ÜFM ile OA eldesi çalışmalarının ilk basamağını oluşturan; ***üre ile 1. fraksiyonlama*** basamağı sonunda elde edilen katı (kompleks yapı) ve sıvı kısımlar, içerisinde bulunan OA miktarlarının belirlenmesi amacıyla RP-HPLC yöntemi ile analiz edilmiş, elde edilen sonuçlar ikinci basamağın gerçekleştirip/gerçekleştirilmeyeceğine dair kararın verilmesinde yol gösterici olmuştur. Numunelerdeki OA miktarının ve saflığının belirlenmesinde, **Bölüm 3.8.`de** yer alan kromatografik metot şartları kullanılmıştır.

C Riviera zeytinyağı numunesinden elde edilen, % 55,14 OA içeriğine sahip serbest yağ asidi karışımının **(bkz. Şekil 4.5. ve Tablo 4.11.)** kullanılması ile gerçekleştirilen ÜFM ile OA eldesi çalışmalarında; ***üre ile 1. fraksiyonlama*** işlemi sonunda elde edilen katı ve sıvı kısımların RP-HPLC yöntemi ile analizlerinden elde edilen kromatogramlar **Şekil 4.8. ve Şekil 4.10`de**, analiz sonuçlarını gösterir veriler ise **Tablo 4.15. ve Tablo 4.17.`**de verilmiştir. Diğer yağ numunelerinden yola çıkılarak, ÜFM ile OA eldesi çalışmalarından elde edilen sonuçlar ise **Tablo 4.18`**de yer almaktadır.



Şekil 4.8. ÜFM Yöntemi ile OA Eldesinde 1. Fraksiyonlama İşlemi Sonunda Elde Edilen Katı Kısma Ait RP-HPLC Kromatogramı (*C Riviera* zeytinyağı numunesinden elde edilen serbest yağ asitleri kullanılmıştır)

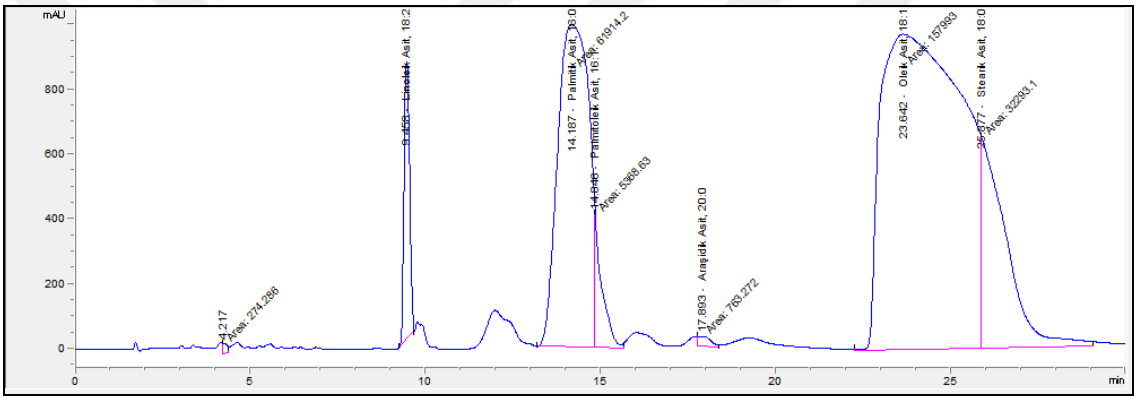
Tablo 4.15. ÜFM Yöntemi ile OA Eldesinde 1. Fraksiyonlama İşlemi Sonunda Elde Edilen Katı Kısma Ait RP-HPLC Kromatogramı Verileri

Yağ Asidi Türü	Çıkış zamanı	Alan	Yükseklik	Yarı pik genişliği	% Alan	Pik simetri
Linolenik Asit	4,097	28,8	6,6	0,0725	0,074	0
Linoleik Asit	9,576	126,6	5,7	0,3036	0,327	0,38
Palmitik Asit	14,293	539,4	21,6	0,3707	1,395	0,752
Palmitoleik Asit	14,885	87,3	4	0,2953	0,226	0,468
Araşidik Asit	18,254	155,6	5,1	0,3936	0,402	0,739
Oleik Asit	27,683	21972,7	531,6	0,6889	56,81	1,158
Stearik Asit	28,007	15767,4	486,5	0,5402	40,766	0

Üre ile 1. fraksiyonlama işleminden elde edilen katı kısmın metanolde çözülmesinden sonra gerçekleştirilen RP-HPLC analizinden elde edilen kromatogramda yer alan pikler ve kromatografik analiz verileri **(Şekil 4.8. ve Tablo 4.15)**; beklenildiği gibi ürenin, doymamış yağ asitlerine kıyasla, doymuş ve tekli doymamış yağ asitleri ile çok daha kararlı kompleksler oluşturduğunu göstermektedir. Şöyle ki; ***üre ile 1. fraksiyonlama*** işleminden elde edilen katı kısma ait kromatogramda, en fazla yüzdeye sahip pikler OA (% 56,81) ve stearik asit (% 40,77) pikleridir. Bu durum, ürenin, doymuşluğu yüksek olan bu yağ asitleri ile diğer yağ asitlerine kıyasla daha fazla etkileştiğini ve kompleks oluşturarak katı kısımda yer almalarını sağladığını göstermektedir. Kromatogramda gözlenen beklenmedik durum ise; doğrusal yapısı ve yüksek derecede doymuşluğu sebebiyle, diğer yağ asitlerine kıyasla üre ile çok daha hızlı ve kararlı kompleks yapması beklenen palmitik asit için (Setyawardhani ve ark., 2015) elde edilen pikin oldukça küçük oluşudur (% 1,39)[2]. Söz konusu bu durumun, üre

[2] Üre, uzun ve içi boş tüpler oluşacak şekilde kristalleşir. Doymuş yağ asitleri, doğrusal molekül yapısı sebebiyle bu boşluğa uyum sağlarken, yapısında bulunan çift bağlar sebebiyle zincirde bir açı oluşturan doymamış yağ asitleri boşluğa uyum sağlayamamakta ve kararlı kompleks oluşturma ihtimalleri azalmaktadır.

ile palmitik arasında oluşması beklenen kararlı kompleks yapının form değiştirerek, çözünür özellikte yeni bir kompleks yapı oluşturmasından kaynaklı olabileceği düşünülmekte, kromatogramda gözlenen yeni pik oluşumları da bu fikri desteklemektedir *(ortamda bulunan üre ve/veya farklı kompleks oluşumları sebebiyle ortaya çıkmış olabileceği düşünülen 10,748 dk ve 16,411 dk`lardaki bu piklerin ortaya çıkış sebepleri, ilerki çalışmalarda tespit edilmeye çalışılacaktır).* Bununla birlikte, ***üre ile 1. fraksiyonlama*** işleminden elde edilen katı kısım içinde yer alan yağ asitlerinin değerlendirilmesinde sadece bu verilerle sınırlı kalınmamış, fraksiyonlama basamağından sonra katı kısım için yürütülen hekzan ile muamele işlemi sonunda elde edilen ürüne ait RP-HPLC analiz sonuçları da dikkate alınmıştır **(bkz. Şekil 4.9. ve Tablo 4.16).**



Şekil 4.9. ÜFM Yöntemi ile OA Eldesinde 1. Fraksiyonlama İşlemi Sonunda Elde Edilen Katı Kısmın Hekzan ile Etkileştirilmesi Sonrası Elde Edilen Ürüne Ait RP-HPLC Kromatogramı

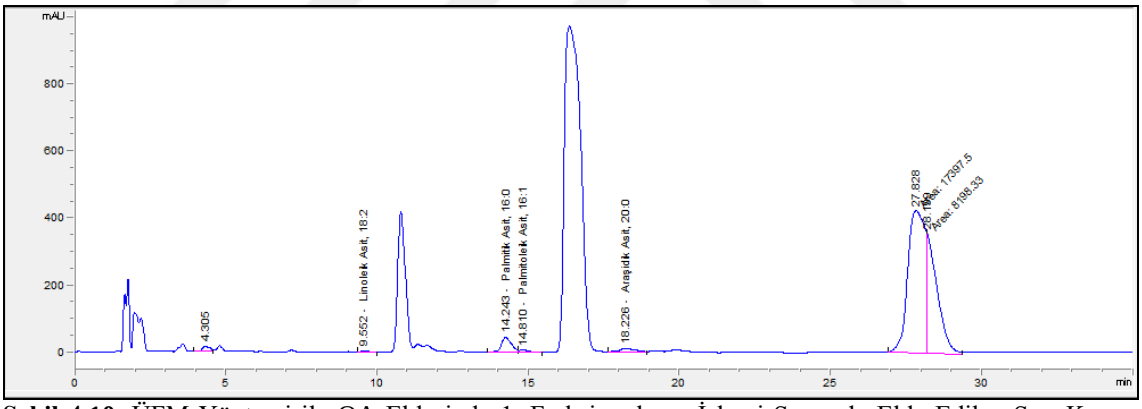
Tablo 4.16. ÜFM Yöntemi ile OA Eldesinde 1. Fraksiyonlama İşlemi Sonunda Elde Edilen Katı Kısmın Hekzan ile Etkileştitilmesi Sonrası Elde Edilen Ürüne Ait RP-HPLC Kromatogramı Verileri

Yağ Asidi Türü	Çıkış zamanı	Alan	Yükseklik	Yarı pik genişliği	% Alan	Pik simetri
Linolenik Asit	4,217	274,3	32,2	0,1235	0,102	0
Linoleik Asit	9,458	9471,9	859	0,1807	3,533	0,818
Palmitik Asit	14,187	61914,2	992,7	1,0394	23,096	0,841
Palmitoleik Asit	14,846	5368,6	412,4	0,2169	2,003	0
Araşidik Asit	17,893	763,3	31,9	0,3982	0,285	0,313
Oleik Asit	23,642	157992,6	974,5	2,7021	58,935	0,38
Stearik Asit	25,877	32293,1	653,8	0,8232	12,046	0

Katı kısmın hekzan ile etkileştirilmesinden sonra elde edilen ürüne ait kromatogramdan ve analiz verilerinden de görüleceği üzere; ***üre ile 1. fraksiyonlama*** basamağından elde edilen katı kısımda yer alması beklenirken görülememiş olan palmitik asit piki, olması gerektiği gibi, bu ürün içerisinde oldukça yüksek bir miktarda (% 23,10) tespit edilmiştir. Söz konusu durumun, hekzanın palmitik asidi çözmedeki gücü ile ilgili olduğu, katı kısmın analizi öncesinde gerçekleştirilen metanol ile çözme

işleminin ise (metanol yağ asitlerinden ziyade, ürenin çözülmesi amacıyla kullanılmıştır) bunu tam olarak sağlayamadığı sonucuna varılmıştır. Bununla birlikte, ***üre ile 1. fraksiyonlama*** basamağından elde edilen katı kısımda % 0,33 civarında tespit edilen linoleik asit miktarının, hekzan ile etkileştirme sonrası artmış olması da (% 3,53), yine beklenmeyen bir sonuç olarak değerlendirilmiştir.

Üre ile 1. fraksiyonlama işleminden elde edilen sıvı kısmın, metanol ile seyreltilmesi sonrası gerçekleştirilen RP-HPLC analizi sonunda ise, katı kısım için elde edilen sonuca oldukça benzer bir sonuç elde edilmiş; sıvı kısımda kalması beklenen çoklu doymamış yağ asitlerinin miktarının oldukça az (linolenik asit: % 0,94; linoleik asit: % 0,30), palmitik asit haricindeki doymuşluğu yüksek olan yağ asitlerinin miktarının ise çok fazla (OA: % 62,97 ; stearik asit: % 29,67) olduğu tespit edilmiştir **(bkz. Şekil 4.10. ve Tablo 4.17.).** Elde edilen bu sonuç, üre ile gerçekleştirilen ***1. fraksiyonlama*** işleminin, doymuşluğu yüksek yağ asitleri ile çoklu doymamış yağ asitlerini ayırmada yeterince verimli olmadığını göstermiştir. Söz konusu durumun bir sonraki işlem basamağının verimini önemli ölçüde etkileyeceği düşünülerek, ***üre ile 2. fraksiyonlama*** işlemine devam edilmemiştir.



Şekil 4.10. ÜFM Yöntemi ile OA Eldesinde 1. Fraksiyonlama İşlemi Sonunda Elde Edilen Sıvı Kısma Ait RP-HPLC Kromatogramı (*C Riviera* zeytinyağı numunesinden elde edilen serbest yağ asitleri kullanılmıştır)

Tablo 4.17. ÜFM Yöntemi ile OA Eldesinde 1. Fraksiyonlama İşlemi Sonunda Elde Edilen Sıvı Kısma Ait RP-HPLC Kromatogramı Verileri

Yağ Asidi Türü	Çıkış zamanı	Alan	Yükseklik	Yarı pik genişliği	% Alan	Pik simetri
Linolenik Asit	4,305	259,9	15,8	0,2324	0,941	0,565
Linoleik Asit	9,552	84,1	4,8	0,2598	0,304	0,64
Palmitik Asit	14,243	1036,6	45,6	0,3334	3,752	0,685
Palmitoleik Asit	14,81	136,9	6,8	0,3073	0,496	0,449
Araşidik Asit	18,226	515,9	13	0,5433	1,867	0,711
Oleik Asit	27,828	17397,5	427	0,6791	62,968	0,931
Stearik Asit	28,199	8198,3	357,9	0,3817	29,673	0

Elde edilen sonuçlar ışığında, OA eldesinde kullanılan ÜFM`nin; ***fazla miktarda üre ve çözücü sarfiyatına gereksinim duyulması***, ***muamele sonrası ortamdaki üreyi uzaklaştırmada güçlükler yaşanması*** ve ***OA izolasyonu için düşük bir verime sahip olması*** gibi sebeplerle, OA eldesi için etkin bir metot olmadığı sonucuna varılmıştır. Bununla birlikte, daha önce de belirtildiği gibi, ***üre ile 1. fraksiyonlama*** işlemi sonunda elde edilen katı ve sıvı kısımlar için verilen kromatogramlarda (**Şekil 4.8. ve Şekil 4.10.)**, 10,748 dk ve 16,411 dk`larda, üre varlığından kaynaklandığı düşünülen farklı pik oluşumları da gözlenmiştir.

Tablo 4.18. *A Naturel Sızma*, *B Naturel Sızma* ve *C Riviera* Zeytinyağı Numunelerinden Elde Edilen Serbest Yağ Asidi Karışımlarından ÜFM Yöntemi ile OA Eldesi için Toplu RP-HPLC Analiz Sonuçları

DENEYLER	**Yağ Miktarı (g)**	**Elde Edilen FFAs Miktarı**	**Deney Kodlamaları**	**YAĞ ASİTLERİ (%)**						
				Linoleik Asit (18:2)	**Palmitik Asit (16:0)**	**Oleik Asit (18:1)**	**Stearik asit (18.0)**	**Araşidik (20.0)**	**Palmitoleik (16.1)**	**Linolenik (18.3)**
Deney No: 22 Numune: A Naturel Sızma Zeytinyağı	**120 g**	**~100 g**	**22.Ü(K)**	0.394	0.888	57.103	23.287	18.030	0.116	0.182
			22.Ü(S)	0.350	5.019	60.736	31.796	0.816	0.640	0.644
			22.Ü(K).H	3.839	24.455	59.411	10.169	0.604	1.424	0.097
Deney No: 24 Numune: B Naturel Sızma	**60 g**	**~45 g**	**24.Ü(K)**	0.311	0.878	61.343	36.727	0.387	0.214	0.139
			24.Ü(S)	1.498	4.142	62.898	27.430	2.290	0.655	1.087
			24.Ü(K).H	3.695	26.550	57.004	10.768	0.423	1.384	0.175
Deney No: 26 Numune :C Riviera Zeytinyağı	**120 g**	**~100 g**	**26.Ü(K)**	0.327	1.395	56.810	40.76	0.402	0.226	0.074
			26.Ü(S)	0.304	3.752	62.968	29.673	1.867	0.496	0.941
			26.Ü(K).H	3.533	23.096	58.935	12.046	0.285	2.003	0.102

Deney Kodlamaları

Ü(K): Serbest yağ asidinin üre ile fraksiyonlama sonucu oluşan katı kısım
Ü(S): Serbest yağ asidinin üre ile fraksiyonlama sonucu oluşan sıvı kısım
Ü(K).H: Serbest yağ asidinin üre ile fraksiyonlama sonucu oluşan katı kısımın hekzan ile ekstraksiyonu

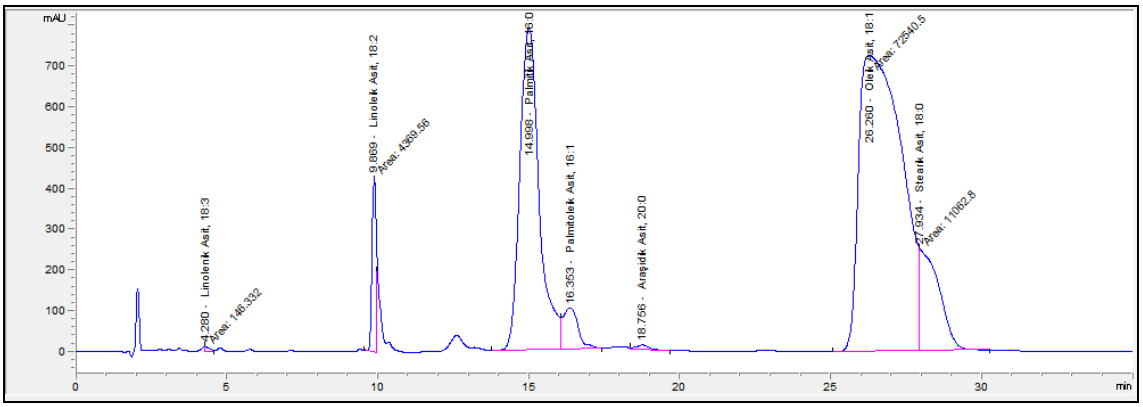
4.3.3. Düşük sıcaklıkta çözücü kristalizasyonu metodu (DSÇKM) ile OA eldesi

Düşük sıcaklıkta çözücü kristalizasyonu metodu (DSÇKM) ile OA eldesi çalışmalarında; yağ asitlerinin farklı çözücülerdeki çözünme dereceleri dikkate alınmış ve çözücü ile etkileştirildikten sonra uygun sıcaklıkta kristallendirme işlemine tabi tutulan yağ asidi karışımlarından OA izolasyonu gerçekleştirilmeye çalışılmıştır. Yağ asitlerini farklı derecelerde çözme gücüne sahip olan ve literatürde çeşitli yağ asitlerinin izolasyonuna yönelik uygulamaları bulunan (Setyawardhani ve ark., 2015) *aseton* ve *metanol* çözücülerinin ayrı ayrı ve ard arda kullanılmaları ile gerçekleştirilen deneylerde, uygulanan prosedürlerin niteliğini belirtmek amacıyla ***çapraz*** ve ***çoklu çözücü kristalizasyonu*** şeklinde bir sınıflandırma yapılmıştır. Söz konusu prosedürlerden elde edilen veriler ve yapılan değerlendirmeler aşağıda ayrıntılı olarak yer almaktadır.

4.3.3.1. Çapraz çözücü kristalizasyonu metodu ile OA eldesi

% 100 aseton ve *% 90 MeOH (suda)*`ın ard arda kullanılması ile gerçekleştirilen çapraz çözücü kristalizasyonu deneyleri; ***aseton sonrası metanol*** ve ***metanol sonrası aseton*** olmak üzere iki farklı şeklinde isimlendirilmiştir. Yağ asidi karışımlarının öncelikle, ***ilk kullanılan çözücü*** içinde çözülmesini ve sonrasında uygun bir sıcaklıkta kristallenmeye bırakılmasını, ardından da, söz konusu kristallendirme işleminden elde edilen katı kısımların ***ikinci kullanılacak çözücü*** ile etkileştirildikten sonra kristallendirilmesini içeren deneyler sonunda, herbir basamaktan elde edilen katı ve sıvı kısımlar RP-HPLC yöntemi ile analiz edilmiş ve içeriklerinde bulunan yağ asidi miktarları tespit edilmeye çalışılmıştır. Kromatografik analizler sonunda elde edilen veriler, çapraz çözücü kristalizasyonu metodunun, yüksek miktarda ve saflıkta OA eldesi için uygun olup/olmadığı kararının verilmesinde kullanılmıştır.

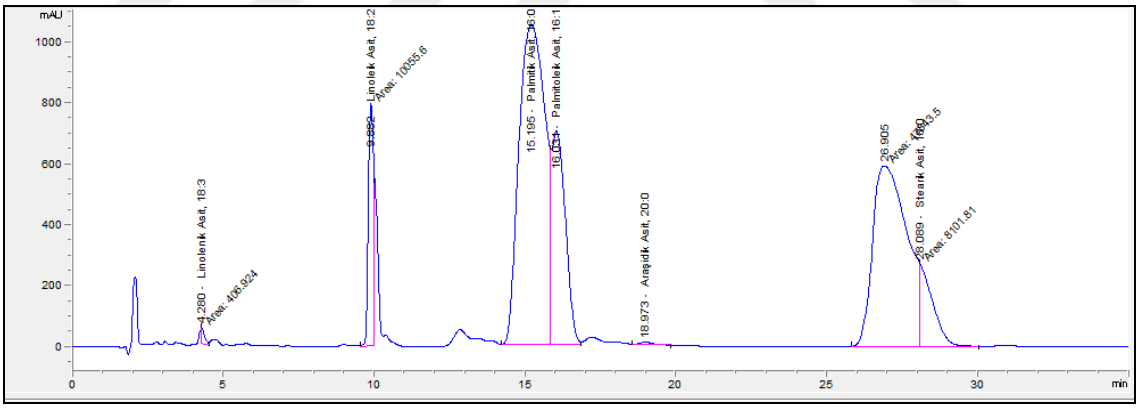
Aseton sonrası metanol: *C Riviera* zeytinyağı numunesinden elde edilen, % 55,14 OA içeriğine sahip serbest yağ asidi karışımının **(bkz. Şekil 4.5. ve Tablo 4.11.),** *aseton* ilave edilerek -80 °C'de bir gece boyunca kristallendirilmesi sonucu elde edilen katı (kristaller) ve sıvı kısımların RP-HPLC yöntemi ile analizleri sonunda gözlenen kromatogramlar **Şekil 4.11. ve Şekil 4.12**`de verilmiştir. Kromatografik analiz sonuçlarını gösterir veriler ise **Tablo 4.19. ve Tablo 4.20.`de** yer almaktadır. Diğer yağ numunelerinden yola çıkılarak, *aseton sonrası metanol* şeklinde gerçekleştirilen çapraz kristalizasyon metodu ile OA eldesi çalışmalarından elde edilen sonuçlar ise **Tablo 4.23.**`de yer almaktadır.



Şekil 4.11. Çapraz Çözücü Kristalizasyonu Metodu ile OA Eldesinde, Aseton İlavesi Sonrası Gerçekleştirilen Kristallendirme İşleminden Elde Edilen Katı Kısma Ait RP-HPLC Kromatogramı (*C Riviera* zeytinyağı numunesinden elde edilen serbest yağ asitleri kullanılmıştır)

Tablo 4.19. Çapraz Çözücü Kristalizasyonu Metodu ile OA Eldesinde, Aseton İlavesi Sonrası Gerçekleştirilen Kristallendirme İşleminden Elde Edilen Katı Kısma Ait RP-HPLC Kromatogramı Verileri

Yağ Asidi Türü	Çıkış zamanı	Alan	Yükseklik	Yarı pik genişliği	% Alan	Pik simetri
Linolenik Asit	4,28	146,3	12,9	0,1889	0,115	0
Linoleik Asit	9,869	4369,6	432,5	0,1684	3,433	0,896
Palmitik Asit	14,998	35267	788,4	0,6939	27,707	0,822
Palmitoleik Asit	16,353	3540,8	100,4	0,5393	2,782	0,764
Araşidik Asit	18,756	356,6	11,7	0,4466	0,28	0,918
Oleik Asit	26,26	72540,5	726,5	1,6643	56,991	0,318
Stearik Asit	27,934	11062,8	252,1	0,7313	8,691	0



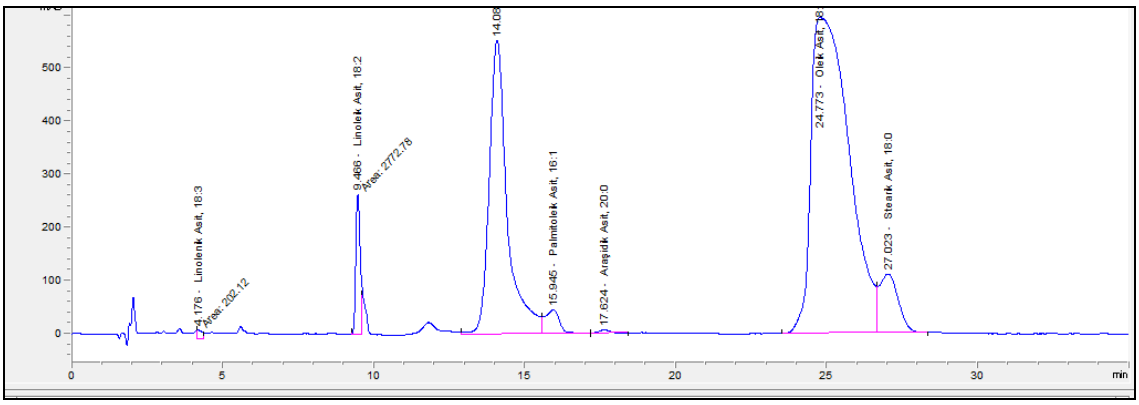
Şekil 4.12. Çapraz Çözücü Kristalizasyonu Metodu ile OA Eldesinde, Aseton İlavesi Sonrası Gerçekleştirilen Kristallendirme İşleminden Elde Edilen Sıvı Kısma Ait RP-HPLC Kromatogramı (*C Riviera* zeytinyağı numunesinden elde edilen serbest yağ asitleri kullanılmıştır)

Tablo 4.20. Çapraz Çözücü Kristalizasyonu Metodu ile OA Eldesinde, Aseton İlavesi Sonrası Gerçekleştirilen Kristallendirme İşleminden Elde Edilen Sıvı Kısma Ait RP-HPLC Kromatogramı Verileri

Yağ Asidi Türü	Çıkış zamanı	Alan	Yükseklik	Yarı pik genişliği	% Alan	Pik simetri
Linolenik Asit	4,28	406,9	52,6	0,1288	0,268	0
Linoleik Asit	9,882	10055,6	796	0,2106	6,612	0,854
Palmitik Asit	15,195	63846,4	1047,5	0,9791	41,981	0,879
Palmitoleik Asit	16,031	21574	699,7	0,4837	14,186	0,44
Araşidik Asit	18,973	254,3	8,4	0,4661	0,167	0,58
Oleik Asit	26,905	47843,5	596,6	1,3367	31,459	0,523
Stearik Asit	28,089	8101,8	275,2	0,4906	5,327	0

Aseton ilavesi sonrası gerçekleştirilen kristallendirme işleminden elde edilen katı ve sıvı kısımlar üzerinde gerçekleştirilen kromatografik analiz verilerinin ve uygulanan prosedürün etkisinin değerlendirilmesinde; söz serbest yağ asidi karışımı için elde edilen kromatografik analiz verilerinden faydalanılmıştır. Temel yağ asitleri bakımından % 55,14 OA, % 33,13 palmitik asit ve % 6,25 linoleik asit içeren serbest yağ asidi karışımındaki bu yağ asitleri, aseton ilavesinden sonra gerçekleştirilen kristallendirme işlemi sonunda elde edilen katı kısımda % 56,99 OA, % 27,71 palmitik asit ve % 3,43 linoleik asit şeklinde bulunurken, sıvı kısımdaki miktarları ise % 31,46 OA, % 41,98 palmitik asit ve % 6,61 linoleik asit olarak tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar, kristallendirme sonrası elde katı kısımdaki OA miktarının, serbest yağ asidi karışımına kıyasla ~% 2 oranında arttığını, palmitik ve linoleik asit miktarlarının ise sırasıyla ~% 5,5 ve ~ % 3 oranında azaldığını göstermiştir.

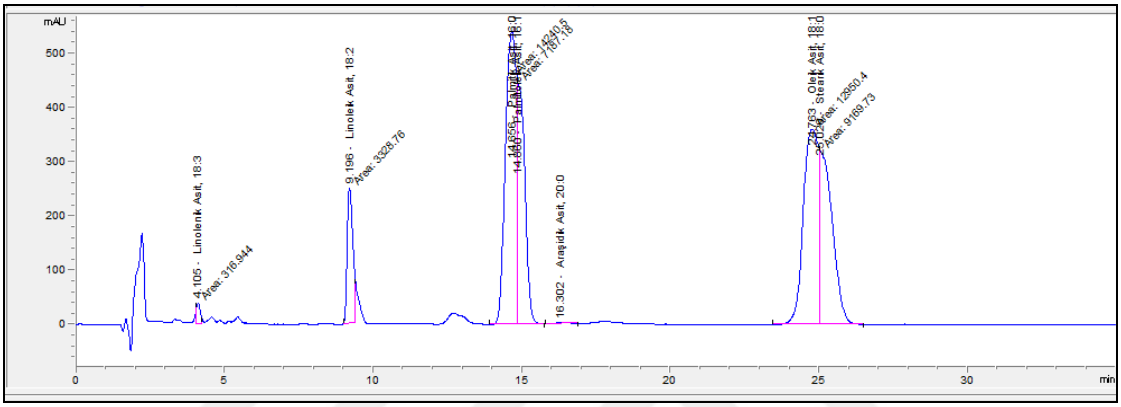
Prosedürün ikinci basamağını oluşturan *ve aseton* ile kristallendirme işlemi sonrasında elde edilen katı kısım içerisindeki yağ asitlerinin, üzerlerine % 90 *metanol* çözeltisi (suda) ilave edildikten sonra, -20 °C'de bir gece boyunca kristallenmeye bırakılmasını içeren işlem basamağından elde edilen katı (kristaller) ve sıvı kısımların RP-HPLC yöntemi ile analizleri sonunda gözlenen kromatogramlar ise **Şekil 4.13. ve Şekil 4.14.**`de yer almaktadır. Kromatografik analiz sonuçlarını gösterir veriler de **Tablo 4.21. ve Tablo 4.22.** de verilmiştir.



Şekil 4.13. Çapraz Çözücü Kristalizasyonu Metodu ile OA Eldesinde, Aseton ile 1. Kristallendirme Basamağından Elde Edilen Katı Kısım Üzerine Metanol İlave Edilmesi Sonrası Gerçekleştirilen 2. Kristallendirme İşleminden Elde Edilen Katı Kısma Ait RP-HPLC Kromatogramı

Tablo 4.21. Çapraz Çözücü Kristalizasyonu Metodu ile OA Eldesinde, Aseton ile 1. Kristallendirme Basamağından Elde Edilen Katı Kısım Üzerine Metanol İlave Edilmesi Sonrası Gerçekleştirilen 2. Kristallendirme İşleminden Elde Edilen Katı Kısma Ait RP-HPLC Kromatogramı Verileri

Yağ Asidi Türü	Çıkış zamanı	Alan	Yükseklik	Yarı pik genişliği	% Alan	Pik simetri
Linolenik Asit	4,176	202,1	17,5	0,1928	0,238	0,163
Linoleik Asit	9,466	2772,8	265,4	0,1741	3,271	0,751
Palmitik Asit	14,082	23114,9	554,2	0,6226	27,271	0,712
Palmitoleik Asit	15,945	1456,6	44,4	0,4707	1,718	1,263
Araşidik Asit	17,624	150,6	5,9	0,3957	0,178	0,844
Oleik Asit	24,773	52339,3	595,4	1,1376	61,749	0,308
Stearik Asit	27,023	4725,3	110,4	0,6352	5,575	0,784



Şekil 4.14. Çapraz Çözücü Kristalizasyonu Metodu ile OA Eldesinde, Aseton ile 1. Kristallendirme basamağından elde edilen katı kısım üzerine Metanol İlave Edilmesi Sonrası Gerçekleştirilen 2. Kristallendirme İşleminden Elde Edilen Sıvı Kısma Ait RP-HPLC Kromatogramı

Tablo 4.22. Çapraz Çözücü Kristalizasyonu Metodu ile OA Eldesinde, Aseton ile 1. Kristallendirme basamağından elde edilen katı kısım üzerine Metanol İlave Edilmesi Sonrası Gerçekleştirilen 2. Kristallendirme İşleminden Elde Edilen Sıvı Kısma Ait RP-HPLC Kromatogramı Verileri

Yağ Asidi Türü	Çıkış zamanı	Alan	Yükseklik	Yarı pik genişliği	% Alan	Pik simetri
Linolenik Asit	4,105	316,9	38,9	0,1357	0,671	0,49
Linoleik Asit	9,196	3328,8	249,7	0,2222	7,046	0,645
Palmitik Asit	14,656	14240,5	539,8	0,4397	30,142	1,279
Palmitoleik Asit	14,86	7187,2	445,4	0,2689	15,213	0
Araşidik Asit	16,302	51,8	1,5	0,4457	0,11	0,703
Oleik Asit	24,763	12950,4	359,9	0,5998	27,411	1,334
Stearik Asit	25,026	9169,7	321,7	0,4751	19,409	0

% 90 *metanol* çözeltisi (suda) ilavesinden sonra gerçekleştirilen ***2. kristallendirme işlemi***nden elde edilen katı ve sıvı kısımlar üzerinde gerçekleştirilen kromatografik analizler sonunda elde edilen veriler; ***1. kristallendirme*** işlemi sonunda elde edilen katı kısımda % 56,99 OA, % 27,71 palmitik asit ve % 3,43 linoleik asit şeklinde şeklinde olan yağ asidi değerlerinin, ***2. kristallendirme*** işleminden elde edilen katı kısımda % 61,75 OA, % 27,27 palmitik asit ve % 3,27 linoleik asit, sıvı kısımda ise % 27,41 OA, % 30,14 palmitik asit ve % 0,64 linoleik asit şeklinde olduğunu

göstermiştir. Elde edilen sonuçlardan da görüleceği üzere; *aseton sonrası metanol* ilavesinden sonra gerçekleştirilen ***2. kristallendirme*** işleminden elde edilen katı kısımdaki OA yüzdesi % 61,75 gibi bir değere ulaşmış (~% 5 oranında artış), diğer yağ asitlerinin miktarında ise dikkate değer ölçüde bir azalma kaydedilmiştir. Bununla birlikte, ***2. kristallendirme işlemi***nden elde edilen sıvı kısımda hala belli bir miktar (~% 27,41) OA bulunmaktadır.

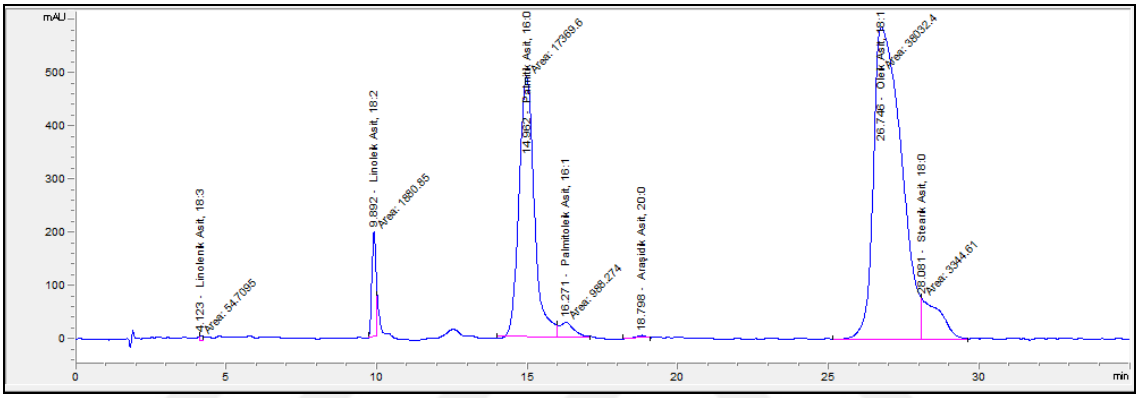
Tablo 4.23. *A Naturel Sızma*, *B Naturel Sızma* ve *C Riviera* Zeytinyağı Numunelerinden Elde Edilen Serbest Yağ Asidi Karışımlarından Çapraz Çözücü Kristalizasyonu Metodu ile (Aseton Sonrası Metanol) OA Eldesi için Toplu RP-HPLC Analiz Sonuçları

DENEYLER	Yağ Miktarı (g)	Elde Edilen FFAs Miktarı	Deney Kodlamaları	YAĞ ASİTLERİ (%)						
				Linoleik Asit (18:2)	Palmitik Asit (16:0)	Oleik Asit (18:1)	Stearik asit (18.0)	Araşidik (20.0)	Palmitoleik (16.1)	Linolenik (18.3)
Deney No: 22 Numune: ANaturel Sızma Zeytinyağı	**120 g**	**~100 g**	**22.A(K)**	3.576	29.155	54.615	7.439	2.181	2.968	0.066
			22.A(S)	7.633	32.932	35.344	8.819	0.284	14.582	0.406
			22.A(K)M(K)	2.061	15.285	70.692	9.336	0.507	1.145	0.974
			22.A(K)M(S)	5.700	31.979	35.217	13.218	0.257	12.975	0.654
Deney No: 25 Numune: B Naturel Sızma Zeytinyağı	**60 g**	**~45 g**	**25.A(K)**	4.077	32.831	49.421	8.808	0.331	4.262	0.270
			25.A(S)	7.640	32.963	35.377	8.827	0.284	14.596	0.312
			25.A(K)M(K)	3.915	24.648	35.079	23.903	0.184	11.651	0.621
			25.A(K)M(S)	4.551	35.575	39.501	10.450	0.134	9.556	0.233
Deney No: 26 Numune: C Riviera Zeytinyağı	**120 g**	**~100 g**	**26.A(K)**	3,433	27.707	56,991	8,691	0.280	2.782	0.115
			26.A(S)	6.612	41.981	31.459	5.327	0.167	14.186	0.268
			26.A(K)M(K)	3,271	27,271	61,749	5,575	0,178	1,718	0,238
			26.A(K)M(S)	7,046	30,142	27,411	19,409	0,11	15,213	0,671

Deney Kodlamaları

A(K): Serbest yağ asidinin aseton ile kristalizasyonu sonu elde edilen katı kısım
A(S): Serbest yağ asidinin aseton ile kristalizasyonu sonu elde edilen sıvı kısım
A(K)M(K): Serbest yağ asidinin aseton ile kristalizasyonu sonu elde edilen katı kısım % 90 metanol ile kristalize işlemi sonrası elde edilen katı kısım
A(K)M(S): Serbest yağ asidinin aseton ile kristalizasyonu sonu elde edilen katı kısım % 90 metanol ile kristalize işlemi sonrası elde edilen sıvı kısım

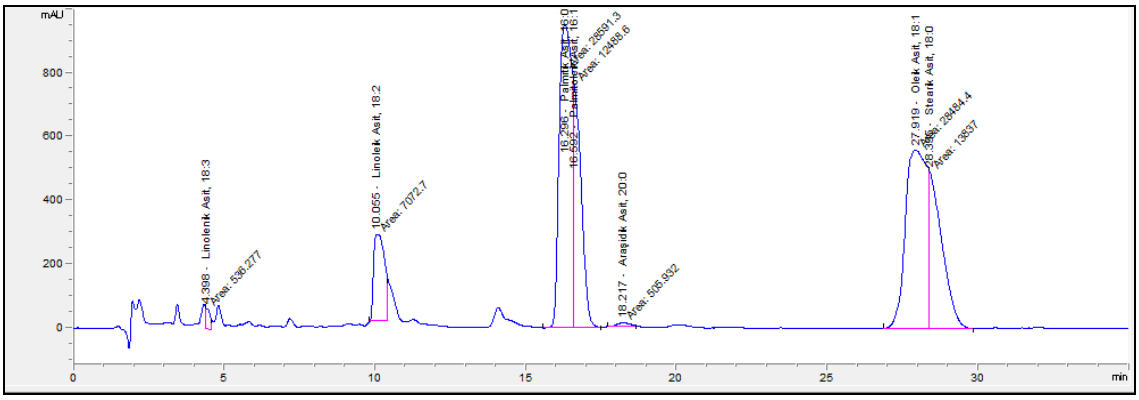
Metanol sonrası aseton: *C Riviera* zeytinyağı numunesinden elde edilen, % 55,14 OA içeriğine sahip serbest yağ asidi karışımının **(bkz. Şekil 4.5. ve Tablo 4.11.),** % 90 *metanol* ilave edilerek -20 °C'de bir gece boyunca kristallendirilmesi sonucu elde edilen katı (kristaller) ve sıvı kısımların RP-HPLC yöntemi ile analizleri sonunda gözlenen kromatogramlar **Şekil 4.15.ve Şekil 4.16.** `de verilmiştir. Kromatografik analiz sonuçlarını gösterir veriler ise **Tablo 4.24. ve Tablo 4.25.** `de yer almaktadır. Diğer yağ numunelerinden yola çıkılarak, *metanol sonrası aseton* şeklinde gerçekleştirilen çapraz kristalizasyon metodu ile OA eldesi çalışmalarından elde edilen sonuçlar ise **Tablo 4.28** de yer almaktadır.



Şekil 4.15. Çapraz Çözücü Kristalizasyonu Metodu ile OA Eldesinde, Metanol İlavesi Sonrası Gerçekleştirilen Kristallendirme İşleminden Elde Edilen Katı Kısma Ait RP-HPLC Kromatogramı (*C Riviera* zeytinyağı numunesinden elde edilen serbest yağ asitleri kullanılmıştır)

Tablo 4.24. Çapraz Çözücü Kristalizasyonu Metodu ile OA Eldesinde, Metanol İlavesi Sonrası Gerçekleştirilen Kristallendirme İşleminden Elde Edilen Katı Kısma Ait RP-HPLC Kromatogramı Verileri

Yağ Asidi Türü	Çıkış zamanı	Alan	Yükseklik	Yarı pik genişliği	% Alan	Pik simetri
Linolenik Asit	4,123	54,7	9,9	0,0924	0,089	0
Linoleik Asit	9,892	1880,8	197,1	0,1591	3,044	0,888
Palmitik Asit	14,962	17369,6	490,4	0,5903	28,112	0,907
Palmitoleik Asit	16,271	988,3	28,2	0,5839	1,599	0,733
Araşidik Asit	18,798	116,7	5,1	0,311	0,189	1,908
Oleik Asit	26,746	38032,4	587,7	1,0785	61,554	0,411
Stearik Asit	28,081	3344,6	77,6	0,7182	5,413	0



Şekil 4.16. Çapraz Çözücü Kristalizasyonu Metodu ile OA Eldesinde, Metanol İlavesi Sonrası Gerçekleştirilen Kristallendirme İşleminden Elde Edilen Sıvı Kısma Ait RP-HPLC Kromatogramı (*C Riviera* zeytinyağı numunesinden elde edilen serbest yağ asitleri kullanılmıştır)

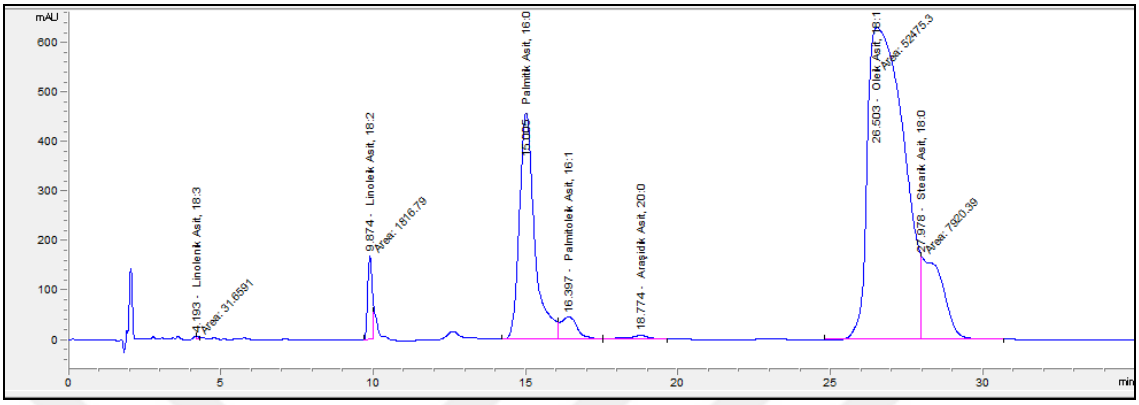
Tablo 4.25. Çapraz Çözücü Kristalizasyonu Metodu ile OA Eldesinde, Metanol İlavesi Sonrası Gerçekleştirilen Kristallendirme İşleminden Elde Edilen Sıvı Kısma Ait RP-HPLC Kromatogramı Verileri

Yağ Asidi Türü	Çıkış zamanı	Alan	Yükseklik	Yarı pik genişliği	% Alan	Pik simetri
Linolenik Asit	4,398	536,3	64,1	0,1047	0,586	0
Linoleik Asit	10,055	7072,7	271,4	0,4343	7,728	0,412
Palmitik Asit	16,296	28591,3	949,8	0,5017	31,242	0,805
Palmitoleik Asit	16,592	12488,6	766,5	0,2715	13,646	0
Araşidik Asit	18,217	505,9	14,3	0,5878	0,553	0,771
Oleik Asit	27,919	28484,4	560,4	0,8471	31,125	0,851
Stearik Asit	28,395	13837	492,7	0,4681	15,12	0

% 90 *metanol* ilavesi sonrası gerçekleştirilen kristallendirme işleminden elde edilen katı kısım üzerinde gerçekleştirilen kromatografik analiz verilerinin ve uygulanan prosedürün etkisinin değerlendirilmesinde; deneylerde kullanılan serbest yağ asidi karışımı için elde edilen kromatografik analiz verilerinden faydalanılmıştır. Temel yağ asitleri bakımından % 55,14 OA, % 33,13 palmitik asit ve % 6,25 linoleik asit içeren serbest yağ asidi karışımındaki bu yağ asitleri, aseton ilavesinden sonra gerçekleştirilen kristallendirme işlemi sonunda elde edilen katı kısımda % 61,55 OA, % 28,11 palmitik asit ve % 3,04 linoleik asit şeklinde bulunurken, sıvı kısımdaki miktarları ise % 31,12 OA, % 31,24 palmitik asit ve % 7,73 linoleik asit olarak tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar, kristallendirme sonrası elde katı kısımdaki OA miktarının, serbest yağ asidi karışımına kıyasla ~% 6,5 oranında arttığını, palmitik ve linoleik asit miktarlarının ise sırasıyla ~% 5 ve ~% 3 oranında azaldığını göstermiştir.

Prosedürün ikinci basamağını oluşturan *ve* % 90 *metanol* ile kristallendirme işlemi sonrasında elde edilen katı kısım içerisindeki yağ asitlerinin, üzerlerine *aseton* ilave edildikten sonra, -80 °C'de bir gece boyunca kristallenmeye bırakılmasını içeren

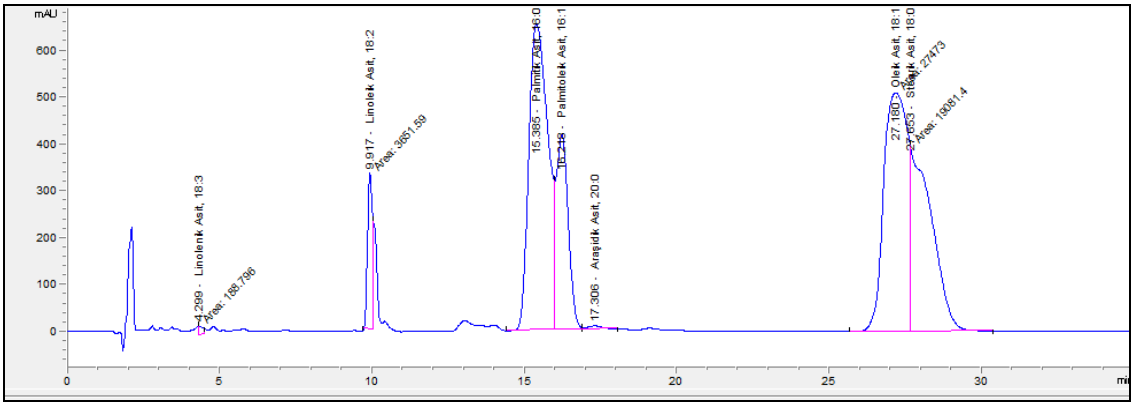
işlem basamağından elde edilen katı (kristaller) ve sıvı kısımların RP-HPLC yöntemi ile analizleri sonunda gözlenen kromatogramlar ise **Şekil 4.17.** ve **Şekil 4.18.**`de yer almaktadır. Kromatografik analiz sonuçlarını gösterir veriler de **Tablo 4.26.** ve **Tablo 4.27.`de** verilmiştir.



Şekil 4.17. Çapraz Çözücü Kristalizasyonu Metodu ile OA Eldesinde, Metanol ile 1. Kristallendirme Basamağından Elde Edilen Katı Kısım Üzerine Aseton İlave Edilmesi Sonrası Gerçekleştirilen 2. Kristallendirme İşleminden Elde Edilen Katı Kısma Ait RP-HPLC Kromatogramı

Tablo 4.26. Çapraz Çözücü Kristalizasyonu Metodu ile OA Eldesinde, Metanol ile 1. Kristallendirme Basamağından Elde Edilen Katı Kısım Üzerine Aseton İlave Edilmesi Sonrası Gerçekleştirilen 2. Kristallendirme İşleminden Elde Edilen Katı Kısma Ait RP-HPLC Kromatogramı Verileri

Yağ Asidi Türü	Çıkış zamanı	Alan	Yükseklik	Yarı pik genişliği	% Alan	Pik simetri
Linolenik Asit	4,193	31,7	4,9	0,0914	0,039	0
Linoleik Asit	9,874	1816,8	171,1	0,177	2,266	0,78
Palmitik Asit	15,005	15980,3	456,8	0,5241	19,928	0,711
Palmitoleik Asit	16,397	1642,9	44,5	0,5624	2,049	0,786
Araşidik Asit	18,774	322,1	7,3	0,59	0,402	1,808
Oleik Asit	26,503	52475,3	630,6	1,3868	65,439	0,344
Stearik Asit	27,978	7920,4	168,6	0,7831	9,877	0



Şekil 4.18. Çapraz Çözücü Kristalizasyonu Metodu ile OA Eldesinde, Metanol ile 1. Kristallendirme Basamağından Elde Edilen Katı Kısım Üzerine Aseton İlave Edilmesi Sonrası Gerçekleştirilen 2. Kristallendirme İşleminden Elde Edilen Sıvı Kısma Ait RP-HPLC Kromatogramı

Tablo 4.27. Çapraz Çözücü Kristalizasyonu Metodu ile OA Eldesinde, Metanol ile 1. Kristallendirme basamağından elde edilen katı kısım üzerine Aseton İlave Edilmesi Sonrası Gerçekleştirilen 2. Kristallendirme İşleminden Elde Edilen Sıvı Kısma Ait RP-HPLC Kromatogramı Verileri

Yağ Asidi Türü	Çıkış zamanı	Alan	Yükseklik	Yarı pik genişliği	% Alan	Pik simetri
Linolenik Asit	4,299	188,8	19,6	0,1603	0,208	0
Linoleik Asit	9,917	3651,6	332,5	0,183	4,025	0,894
Palmitik Asit	15,385	28728,9	653,8	0,6806	31,664	0,643
Palmitoleik Asit	16,218	11354,1	417,6	0,4012	12,514	0,785
Araşidik Asit	17,306	252,5	7,2	0,5057	0,278	0,988
Oleik Asit	27,18	27473	509,1	0,8994	30,28	1,041
Stearik Asit	27,653	19081,4	397,5	0,8001	21,031	0

Aseton ilavesinden sonra gerçekleştirilen ***2. kristallendirme işlemi***nden elde edilen katı ve sıvı kısımlar üzerinde gerçekleştirilen kromatografik analizler sonunda elde edilen veriler; ***1. kristallendirme işlemi*** sonunda elde edilen katı kısımda % 61,55 OA, % 28,11 palmitik asit ve % 3,04 linoleik asit şeklinde olan yağ asidi değerlerinin, ***2. kristallendirme işlemi***nden elde edilen katı kısımda % 65,44 OA, % 19,92 palmitik asit ve % 2,26 linoleik asit, sıvı kısımda ise % 30,28 OA, % 31,66 palmitik asit ve % 4,025 linoleik asit şeklinde olduğunu göstermiştir. Elde edilen sonuçlardan da görüleceği üzere; *metanol sonrası aseton* ilavesinden sonra gerçekleştirilen ***2. kristallendirme işlemi***nden elde edilen katı kısımdaki OA yüzdesi % 65,44 gibi bir değere ulaşmış (~% 4 oranında artış), diğer yağ asitlerinin miktarında ise dikkate değer ölçüde bir azalma kaydedilmiştir. Bununla birlikte, ***2. kristallendirme işlemi***nden elde edilen sıvı kısımda hala yüksek miktarda (~% 30,28) OA bulunmaktadır.

M*etanol sonrası aseton* ve *aseton sonrası metanol* sıralaması ile gerçekleştirilen çapraz çözücü kristalizasyonu deneyleri sonunda; gerek ***1. kristalizasyon*** gerekse ***2. kristalizasyon*** işlemlerinde çözücü olarak metanol kullanıldığı zaman, elde edilen katı kısımdaki OA yüzdesinin (saflığının), aseton kullanıldığı zamana kıyasla % 3-5 birim daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte, deneylerde çözücü olarak % 90 metanol kullanıldığı zaman; ***su varlığı sebebiyle düşük sıcaklık değerlerinde çalışılamaması***, ***süzmede güçlük yaşanması*** ve ***elde edilen katı madde miktarının oldukça az olması*** gibi dezavantajlarla karşılaşılmıştır. Bu sebeple, saf OA eldesinin yanı sıra madde veriminin de artırılabilmesi açısından, kristallendirme işlemlerinde çözücü olarak ***aseton*** kullanılmasının daha avantajlı olduğu kararına varılmıştır.

Tablo 4.28. *A Naturel Sızma*, *B Naturel Sızma* ve *C Riviera* Zeytinyağı Numunelerinden Elde Edilen Serbest Yağ Asidi Karışımlarından Çapraz Çözücü Kristalizasyonu Metodu ile (Metanol Sonrası Aseton) OA Eldesi için Toplu RP-HPLC Analiz Sonuçları

DENEYLER	Yağ Miktarı (g)	Elde Edilen FFAs Miktarı	Deney Kodlamaları	YAĞ ASİTLERİ (%)						
				Linoleik Asit (18:2)	Palmitik Asit (16:0)	Oleik Asit (18:1)	Stearik asit (18.0)	Araşidik (20.0)	Palmitoleik (16.1)	Linolenik (18.3)
Deney No: 22 Numune: A Naturel Sızma Zeytinyağı	**120 g**	**~100 g**	**22.M(K)**	4.169	31.970	56.909	4.507	0.270	1.945	0.231
			22.M(S)	8.409	36.354	29.666	15.671	1.220	8.100	0.580
			22.M(K)A(K)	1.969	17.803	71.756	5.898	0.957	1.345	0.273
			22.M(K)A(S)	4.552	36.442	37.160	10.179	0.161	11.412	0.094
Deney No: 25 Numune: B Naturel Sızma Zeytinyağı	**120 g**	**~45g**	**25.M(K)**	3.221	30.392	59.168	4.872	0.303	1.944	0.100
			25.M(S)	7.020	47.920	28.676	7.353	0.890	6.804	1.337
			25.M(K)A(K)	2.529	24.714	63.990	5.990	0.149	2.449	0.179
			25.M(K)A(S)	4.661	34.923	24.514	16.636	0.098	18.957	0.209
Deney No: 26 Numune C Riviera Zeytinyağı	**120 g**	**~100 g**	**26.M(K)**	3.044	28.112	61.554	5.413	0.189	1.599	0.089
			26.M(S)	7.728	31.242	31.125	15.120	0.553	13.646	0.586
			26.M(K)A(K)	2.266	19.928	65.439	9.877	0.402	2.049	0.039
			26.M(K)A(S)	4.025	31.664	30.280	21.031	0.278	12.514	0.208

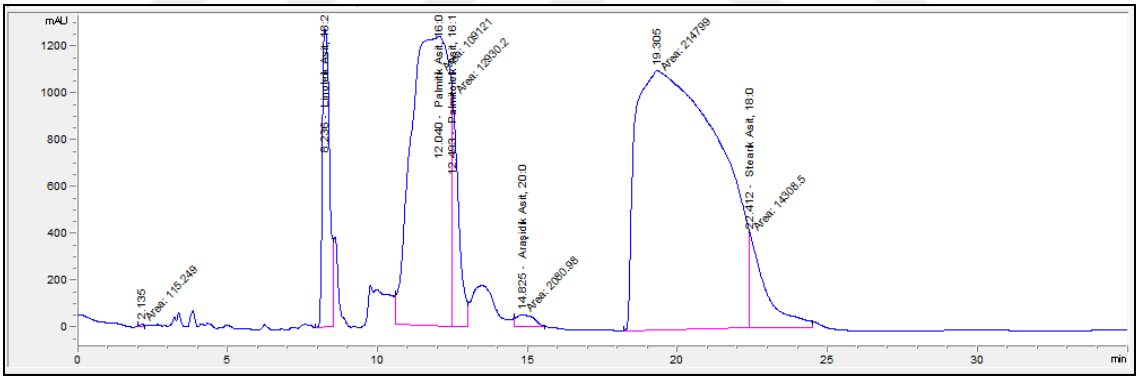
Deney Kodlamaları

M(K): Serbest yağ asidinin % 90 metanol ile kristalizasyonu sonu elde edilen katı kısım
M(S): Serbest yağ asidinin % 90 metanol ile kristalizasyonu sonu elde edilen sıvı kısım
M(K)A(K): Serbest yağ asidinin % 90 metanol ile kristalizasyonu sonu elde edilen katı kısmın aseton ile kristalize işlemi sonrası elde edilen katı kısım
M(K)A(S): Serbest yağ asidinin % 90 metanol ile kristalizasyonu sonu elde edilen katı kısmın aseton ile kristalize işlemi sonrası elde edilen sıvı kısım

4.3.3.2. Çoklu çözücü kristalizasyonu metodu ile OA eldesi

% 100 asetonun kullanılması ile gerçekleştirilen çoklu çözücü kristalizasyonu deneylerinde; serbest yağ asidi karışımları *aseton* ile bir seri kristalizasyon işlemine tabi tutulmuş ve literatürde de benzer uygulamaları bulunan yöntem ile (Earle ve Milner, 1940; Brown, 1941) yüksek miktarda ve saflıkta OA elde elde edilmeye çalışılmıştır. -80 °C'de 4 kez ard arda gerçekleştirilen kristallendirme işlemlerinden elde edilen katı kısımlar, hekzan içinde çözüldükten sonra, OA içeriğinin tespit edilmesi için RP-HPLC yöntemi ile analiz edilmiş ve elde edilen sonuçlar, çoklu çözücü kristalizasyonu metodunun yüksek miktarda ve saflıkta OA eldesi için uygun olup/olmadığı kararının verilmesinde kullanılmıştır.

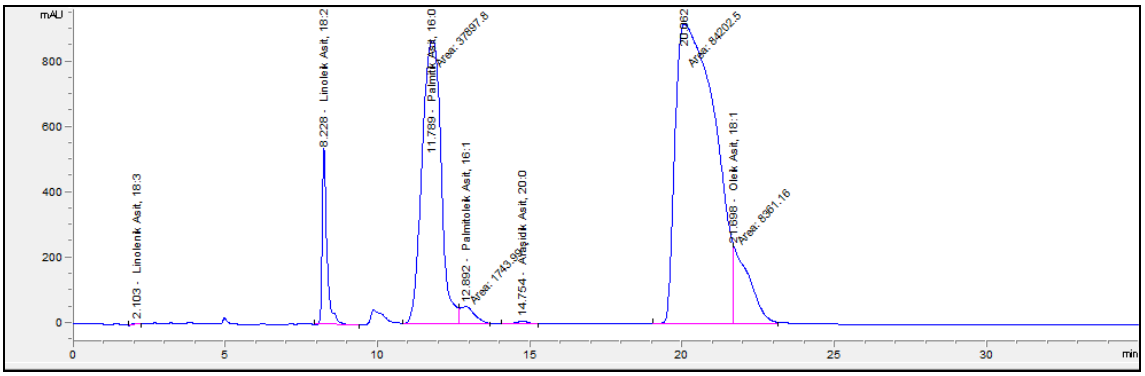
C Riviera zeytinyağı numunesinden elde edilen, % 57,28 OA içeriğine sahip serbest yağ asidi karışımının **(bkz. Şekil 4.19. ve Tablo 4.29),** *aseton* ilave edilerek -80 °C'de bir gece boyunca bekletilmesi ile gerçekleştirilen ***1. kristalizasyon*** işleminden elde edilen katı (kristaller) kısmın RP-HPLC yöntemi ile analizleri sonunda gözlenen kromatogram **Şekil 4.20**`de, kromatografik analiz sonuçlarını gösterir veriler ise **Tablo 4.30.**`de yer almaktadır.



Şekil 4.19. Çoklu DSÇKM ile OA Eldesinde Kullanılan *C Riviera* Zeytinyağı Numunesinden Elde Edilmiş Serbest Yağ Asitlerine Ait RP-HPLC Kromatogramı

Tablo 4.29. Çoklu DSÇKM ile OA Eldesinde Kullanılan *C Riviera* Zeytinyağı Numunesinden Elde Edilmiş Serbest Yağ Asitlerine Ait RP-HPLC Kromatogramı Verileri

Yağ Asidi Türü	Çıkış zamanı	Alan	Yükseklik	Yarı pik genişliği	% Alan	Pik simetri
Linolenik Asit	2,135	115,2	11,1	0,1724	0,031	0,984
Linoleik Asit	8,236	21666,4	1272,5	0,2706	5,777	0,557
Palmitik Asit	12,04	109121,2	1241,5	1,4649	29,097	2,409
Palmitoleik Asit	12,493	12930,2	986,2	0,2185	3,448	0
Araşidik Asit	14,825	2081	51	0,68	0,555	0,5
Oleik Asit	19,305	214798,6	1110,1	3,225	57,276	0,33
Stearik Asit	22,412	14308,5	401,6	0,4169	3,815	0

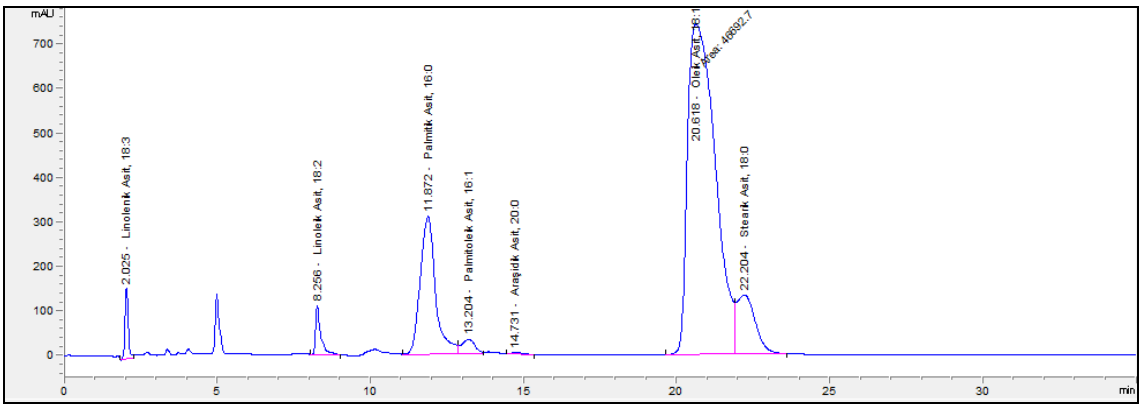


Şekil 4.20. Çoklu Çözücü Kristalizasyonu Metodu ile OA Eldesinde, Aseton İlavesi Sonrası Gerçekleştirilen 1. Kristallendirme İşleminden Elde Edilen Katı Kısma Ait RP-HPLC Kromatogramı

Tablo 4.30. Çoklu Çözücü Kristalizasyonu Metodu ile OA Eldesinde, Aseton İlavesi Sonrası Gerçekleştirilen 1. Kristallendirme İşleminden Elde Edilen Katı Kısma Ait RP-HPLC Kromatogramı Verileri

Yağ Asidi Türü	Çıkış zamanı	Alan	Yükseklik	Yarı pik genişliği	% Alan	Pik simetri
Linolenik Asit	2,103	54,8	2,5	0,2933	0,04	4,104
Linoleik Asit	8,228	5929,8	539,2	0,1643	4,283	0,539
Palmitik Asit	11,789	37897,8	868,8	0,727	27,374	1,131
Palmitoleik Asit	12,892	1744	53,9	0,5395	1,26	0,591
Araşidik Asit	14,754	252,5	8,6	0,4223	0,182	1,301
Oleik Asit	20,062	84202,5	921	1,5238	60,821	0,299
Stearik Asit	21,698	8361,2	237,4	0,4975	6,039	0

1. kristalizasyon işleminden elde edilen ve % 60,82 OA içeriğine sahip olduğu bulunan katı kısım (serbest yağ asitleri karışımına kıyasla OA içeriği ~% 3,5 birim artmıştır) üzerine *aseton* ilave edilerek, -80 °C'de bir gece boyunca bekletilmesi ile gerçekleştirilen ***2. kristalizasyon*** işleminden elde edilen katı (kristaller) kısmın RP-HPLC yöntemi ile analizleri sonunda gözlenen kromatogram **Şekil 4.21.**`de, kromatografik analiz sonuçlarını gösterir veriler ise **Tablo 4.31.**`de yer almaktadır.

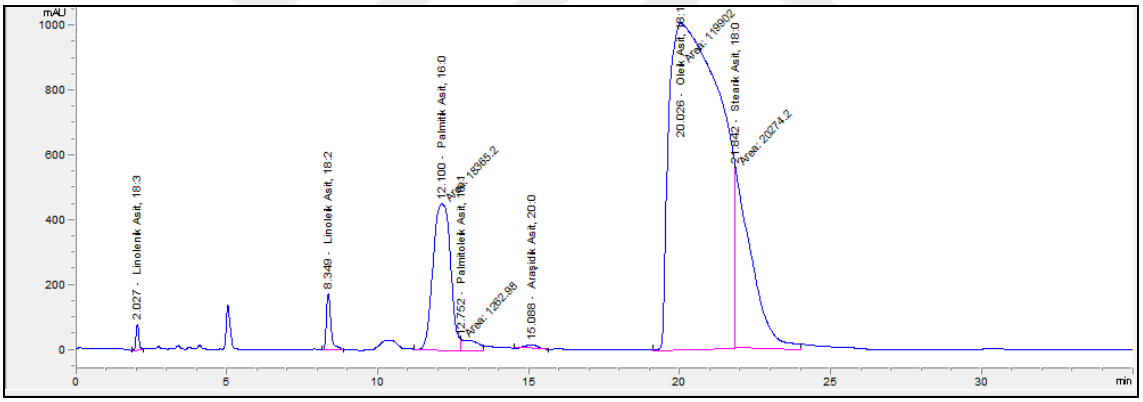


Şekil 4.21. Çoklu Çözücü Kristalizasyonu Metodu ile OA Eldesinde, 1. Kristalizasyondan Elde Edilen Katı Üzerine Aseton İlavesi Sonrası Gerçekleştirilen 2. Kristallendirme İşleminden Elde Edilen Katı Kısma Ait RP-HPLC Kromatogramı

Tablo 4.31. Çoklu Çözücü Kristalizasyonu Metodu ile OA Eldesinde, 1. Kristalizasyondan Elde Edilen Katı Üzerine Aseton İlavesi Sonrası Gerçekleştirilen 2. Kristallendirme İşleminden Elde Edilen Katı Kısma Ait RP-HPLC Kromatogramı Verileri

Yağ Asidi Türü	Çıkış zamanı	Alan	Yükseklik	Yarı pik genişliği	% Alan	Pik simetri
Linolenik Asit	2,025	1170,7	159,2	0,1138	1,753	0,828
Linoleik Asit	8,256	1328,6	111,8	0,1666	1,99	0,461
Palmitik Asit	11,872	10948,7	311,6	0,5419	16,395	0,931
Palmitoleik Asit	13,204	1026,2	34,4	0,4485	1,537	1,001
Araşidik Asit	14,731	100,3	3,1	0,4627	0,15	0,485
Oleik Asit	20,618	46692,7	743	1,0475	69,918	0,429
Stearik Asit	22,204	5515,1	132,8	0,6247	8,258	0,623

2. kristalizasyon işleminden elde edilen ve % 69,92 OA içeriğine sahip olduğu bulunan katı kısım (1. kristalizasyon işlemine kıyasla OA içeriği ~% 9 birim artmıştır) üzerine *aseton* ilave edilerek, -80 °C'de bir gece boyunca bekletilmesi ile gerçekleştirilen ***3. kristalizasyon*** işleminden elde edilen katı (kristaller) kısmın RP-HPLC yöntemi ile analizleri sonunda gözlenen kromatogram **Şekil 4.22.**`de, kromatografik analiz sonuçlarını gösterir veriler ise **Tablo 4.32.**`de yer almaktadır.

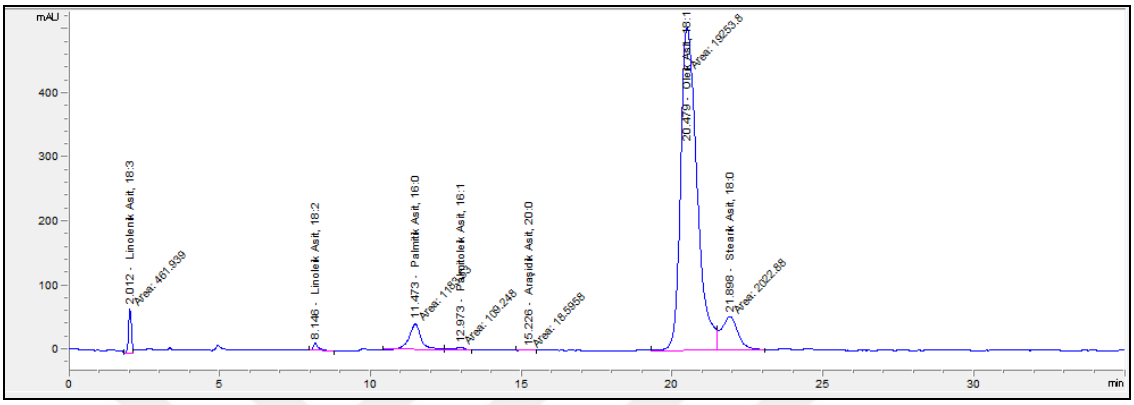


Şekil 4.22. Çoklu Çözücü Kristalizasyonu Metodu ile OA Eldesinde, 2. Kristalizasyondan Elde Edilen Katı Üzerine Aseton İlavesi Sonrası Gerçekleştirilen 3. Kristallendirme İşleminden Elde Edilen Katı Kısma Ait RP-HPLC Kromatogramı

Tablo 4.32. Çoklu Çözücü Kristalizasyonu Metodu ile OA Eldesinde, 2. Kristalizasyondan Elde Edilen Katı Üzerine Aseton İlavesi Sonrası Gerçekleştirilen 3. Kristallendirme İşleminden Elde Edilen Katı Kısma Ait RP-HPLC Kromatogramı Verileri

Yağ Asidi Türü	Çıkış zamanı	Alan	Yükseklik	Yarı pik genişliği	% Alan	Pik simetri
Linolenik Asit	2,027	592,7	83,3	0,107	0,365	0,836
Linoleik Asit	8,349	1799,8	174,5	0,1563	1,107	0,599
Palmitik Asit	12,1	18365,2	452,1	0,677	11,297	0,927
Palmitoleik Asit	12,752	1263	35,4	0,5118	0,777	0
Araşidik Asit	15,088	363,8	11,5	0,53	0,224	1,249
Oleik Asit	20,026	119901,9	1010,7	1,9773	73,758	0,294
Stearik Asit	21,842	20274,2	556,4	0,6073	12,472	0

3. kristalizasyon işleminden elde edilen ve % 73,76 OA içeriğine sahip olduğu bulunan katı kısım (2. kristalizasyon işlemine kıyasla OA içeriği ~% 4 birim artmıştır) üzerine *aseton* ilave edilerek, -80 °C'de bir gece boyunca bekletilmesi ile gerçekleştirilen ***4. kristalizasyon*** işleminden elde edilen katı (kristaller) kısmın RP-HPLC yöntemi ile analizleri sonunda gözlenen kromatogram **Şekil 4.23.**`de, kromatografik analiz sonuçlarını gösterir veriler ise **Tablo 4.33.**`de yer almaktadır.

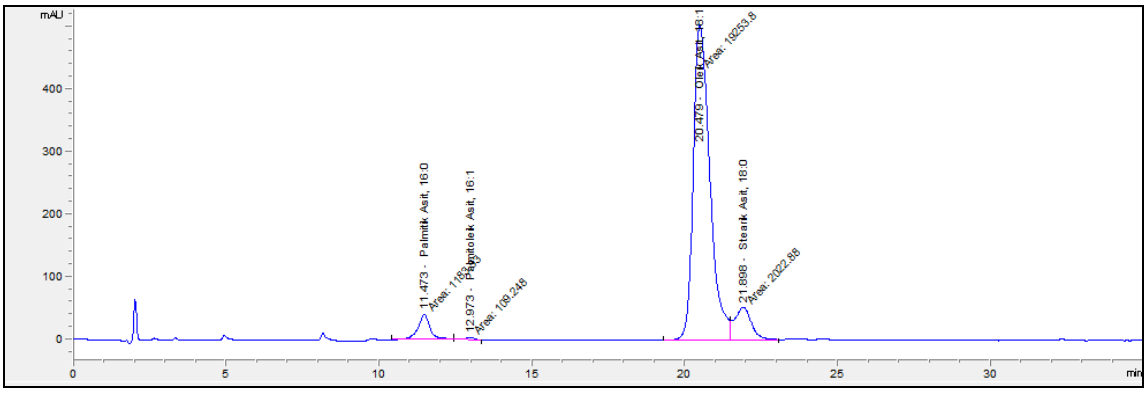


Şekil 4.23. Çoklu Çözücü Kristalizasyonu Metodu ile OA Eldesinde, 3. Kristalizasyondan Elde Edilen Katı Üzerine Aseton İlavesi Sonrası Gerçekleştirilen 4. Kristallendirme İşleminden Elde Edilen Katı Kısma Ait RP-HPLC Kromatogramı (7 pik dikkate alınmıştır)

Tablo 4.33. Çoklu Çözücü Kristalizasyonu Metodu ile OA Eldesinde, 3. Kristalizasyondan Elde Edilen Katı Üzerine Aseton İlavesi Sonrası Gerçekleştirilen 4. Kristallendirme İşleminden Elde Edilen Katı Kısma Ait RP-HPLC Kromatogramı Verileri (7 pik dikkate alınmıştır)

Yağ Asidi Türü	Çıkış zamanı	Alan	Yükseklik	Yarı pik genişliği	% Alan	Pik simetri
Linolenik Asit	2,012	461,9	71	0,1085	1,992	1,008
Linoleik Asit	8,146	137,4	11,5	0,1718	0,593	0,428
Palmitik Asit	11,473	1183,5	41	0,4816	5,104	1,04
Palmitoleik Asit	12,973	109,2	3,9	0,4648	0,471	1,943
Araşidik Asit	15,226	18,6	6,80E-01	0,4549	0,08	0,748
Oleik Asit	20,479	19253,8	505,3	0,6351	83,036	0,621
Stearik Asit	21,898	2022,9	53,2	0,6332	8,724	0,885

Elde edilen sonuçlardan da görüleceği üzere; ***4. kristalizasyon işlemi***nden elde edilen katı kısımdaki OA içeriği, ***3. kristalizasyon işlemi***ne kıyasla ~% 9 birim artmıştır. Ayrıca, ***4. kristalizasyon işlemi***nden elde edilen katı kısım için elde edilen RP-HPLC kromatogramı, sadece belirli piklerin esas alınması ile (standart OA için elde edilen kromatogramdaki pikler dikkate alınmıştır) bir kez daha integre edilmiş ve aseton ile ard arda (4 kez) gerçekleştirilen çoklu çözücü kristalizasyonu işleminden elde edilen OA`nın saflık derecesi, standart OA`nınki (kromatogramda gözlenen 4 pik esas alındığında % 90,85 OA içeriğine sahip olduğu bulunmuştur) ile karşılaştırılmaya çalışılmıştır. **Tablo 4.33.**`den de görüleceği üzere; ***4. kristalizasyon işlemi***nden elde edilen katı kısım içindeki % OA miktarı, 7 pik esas alındığı zaman % 83,04 olarak tespit edilirken, 4 pikin dikkate alınması ile bu değer % 85,31`e yükselmiştir **(Şekil 4.24. ve Tablo 4.34.)**



Şekil 4.24. Çoklu Çözücü Kristalizasyonu Metodu ile OA Eldesinde, 3. Kristalizasyondan Elde Edilen Katı Üzerine Aseton İlavesi Sonrası Gerçekleştirilen 4. Kristallendirme İşleminden Elde Edilen Katı Kısma Ait RP-HPLC Kromatogramı (4 temel pik dikkate alınmıştır)

Tablo 4.34. Çoklu Çözücü Kristalizasyonu Metodu ile OA Eldesinde, 3. Kristalizasyondan Elde Edilen Katı Üzerine Aseton İlavesi Sonrası Gerçekleştirilen 4. Kristallendirme İşleminden Elde Edilen Katı Kısma Ait RP-HPLC Kromatogramı Verileri (4 temel pik dikkate alınmıştır)

Yağ Asidi Türü	Çıkış zamanı	Alan	Yükseklik	Yarı pik genişliği	% Alan	Pik simetri
Palmitik Asit	11,473	1183,5	41,0	0,4816	5,244	1,04
Palmitoleik Asit	12,973	109,2	3,9	0,4648	0,484	1,943
Oleik Asit	20,479	19253,8	505,3	0,6351	85,309	0,621
Stearik Asit	21,898	2022,9	53,2	0,6332	8,963	0,885

C Riviera zeytinyağı numunesinden elde edilen serbest yağ asidi karışımının kullanılması ile gerçekleştirilen çoklu çözücü kristalizasyonu deneyleri sonunda; kristalizasyon işlem sayısı artırıldıkça, elde edilen OA saflığının da arttığı görülmüştür. Şöyle ki; serbest yağ asidi karışımı içerisinde % 57,28 olan OA miktarı, ***1. kristalizasyon*** işleminden sonra % 60,8 değerine; ***2. kristalizasyon*** işleminden sonra % 69,92 değerine; ***3. kristalizasyon*** işleminden sonra % 73,76 değerine; ***4. kristalizasyon*** işleminden sonra ise % 83,04 değerine yükselmiştir (değerlendirmelerde 7 adet pik dikkate alınmıştır). ***4. kristalizasyon*** işlemi için elde edilen kromatogramda, % 90,85 OA içeriğine sahip olduğu tespit edilen standart OA`ya ait kromatogramda olduğu gibi **(Bölüm 4.4.2 `de Şekil 4.1.)** sadece 4 temel pik dikkate alındığı zaman ise, OA için bulunan saflık değerinin % 85,31`e yükseldiği görülmüştür. Bulunan sonuçlardan da görüleceği üzere, tez kapsamında elde edilen OA`nın saflık derecesi, standart OA`nın saflık derecesine oldukça yakındır.

Sonuç olarak;

- Yüksek saflıkta ve miktarda OA eldesine imkan vermesi,
- Kullanılan çözücülerin geri kazanılabilir olması sebebiyle çevre dostu bir yaklaşım sergilemesi,
- Tekrarlanabilir sonuçların elde edilmesine olanak tanıması,
- Kullanılan diğer metotlara kıyasla basit ve kolay uygulanabilir bir metot olması

gibi üstün özellikleri sebebiyle, sunulan tez çalışmasında, serbest yağ asidi karışımlarından OA`nın eldesi için en uygun ve verimli metodun ***çoklu DSÇKM*** olduğu sonucuna varılmıştır.

Tablo 4.35. *A Naturel Sızma*, *B Naturel Sızma* ve *C Riviera* Zeytinyağı Numunelerinden Elde Edilen Serbest Yağ Asidi Karışımlarından Çoklu Çözücü Kristalizasyonu Metodu ile (Aseton) OA Eldesi için Toplu RP-HPLC Analiz Sonuçları

DENEYLER	**Yağ Miktarı (g)**	**Elde Edilen FFAs Miktarı**	**Deney Kodlamaları**	**YAĞ ASİTLERİ (%)**						
				Linoleik Asit (18:2)	**Palmitik Asit (16:0)**	**Oleik Asit (18:1)**	**Stearik asit (18.0)**	**Araşidik (20.0)**	**Palmitoleik (16.1)**	**Linolenik (18.3)**
Deney No: 18 Numune: A Natural Sızma Zeytinyağı	**124 g**	**~98 g**	**17.0.**	5,033	30,093	58,939	3,738	0,518	1,66	0,019
			18.1.	4.225	15.043	58.030	4.667	0.209	2.719	0.957
			18.1.1.	1.918	10.606	69.816	9.351	0.215	1.603	2.060
			18.1.1.1.	1.276	9.912	75.181	9.351	0.161	1.078	3.041
			18.1.1.1.1.	0.779	6.858	81.750	6.883	0.223	0.761	2.745
Deney No: 16 Numune: B (Natural Sızma Zeytinyağı	**121 g**	**~98 g**	**16.0.**	4,733	27,451	59,853	3,973	0,614	3,357	0,019
			16.1.	5.271	30.471	57.068	4.799	0.593	1.770	0.029
			16.1.1.	3.016	22.549	65.028	7.383	0.496	1.173	0.355
			16.1.1.1.	0.909	7.621	78.238	10.531	0.231	0.625	1.845
			16.1.1.1.1	0.784	8.073	83.467	6.841	0.343	0.338	0.154
Deney No: 11 Numune: C Riviera Zeytinyağı	**60 g**	**~53 g**	**11.0**	5,777	29,097	57,276	3,815	0,555	3,448	0,031
			11.1.	4,283	27,374	60,821	6,039	0,182	1,26	0,04
			11.1.1.	1.990	16.395	69.918	8.258	0.150	1.537	1.753
			11.1.1.1.	1.107	11.297	73.758	12.472	0.224	0.777	0.365
			11.1.1.1.1.	0.593	5.104	83.036	8.724	0.080	0.471	1.992

Deney Kodları

0: Serbest yağ asidi
1: Serbest yağ asidinin aseton ile 1.kristalizasyonu sonucu elde edilen katı kısım
1.1: Serbest yağ asidinin aseton ile 2.kristalizasyonu sonucu elde edilen katı kısım
1.1.1: Serbest yağ asidinin aseton ile 3.kristalizasyonu sonucu elde edilen katı kısım
1.1.1.1: Serbest yağ asidinin aseton ile 4.kristalizasyonu sonucu elde edilen katı kısım

4.4. OA`dan AA Eldesi, Saflaştırılması ve *İn-Vitro* Koşullarda İncelenmesi

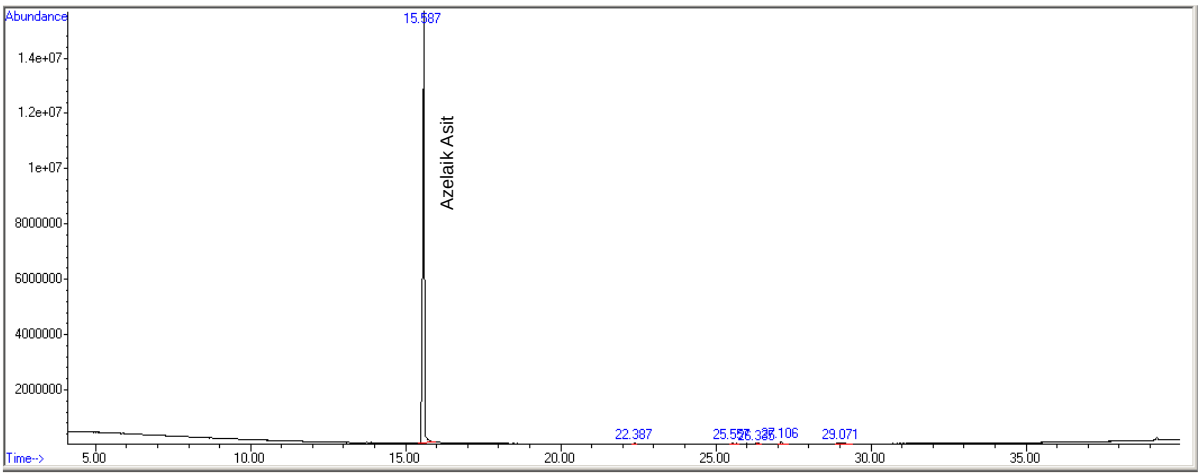
4.4.1. Standart OA, AA ve PA için gerçekleştirilen karakterizasyon çalışmaları

4.4.1.1. Standart AA`nın Farklı Çözücüler İçindeki Çözünürlüğünün Belirlenmesi

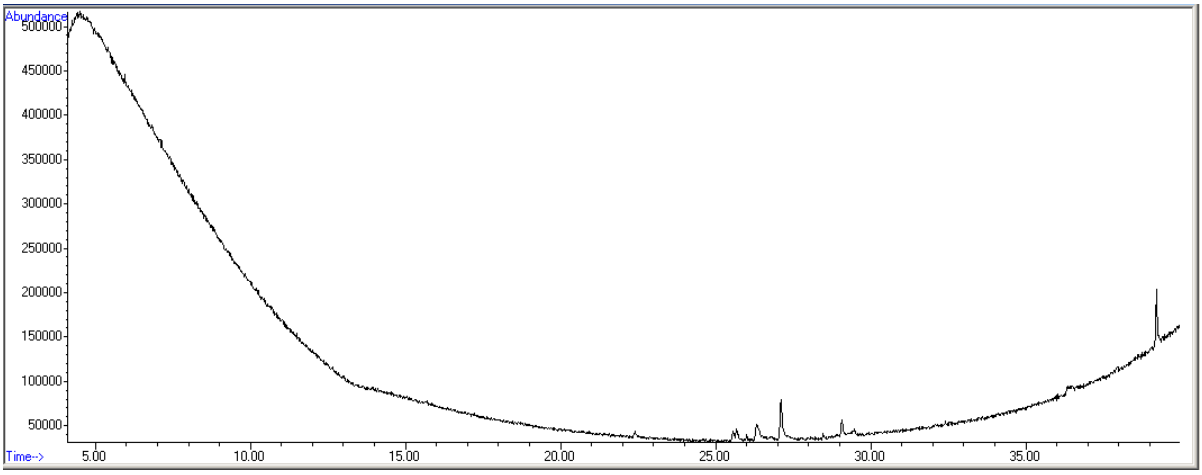
Literatür kaynaklarından ve ürün satışı yapan firmaların resmi sayfalarından edinilen bilgilere göre AA; kaynayan su, metanol (70 mg/mL), etanol (%5), kloroform, pH`ı 7,4 olan fosfat tamponu, dimetil sülfoksit (DMSO), dimetil formamit (DMF) ve etil eter içerisinde belli derecelerde çözünürken, distile su (2.4 mg/mL at 20 °C), pH`sı 6,8 olan fosfat tamponu + % 0,5 Tween 80, pH`sı 6,8 olan fosfat tamponu + % 1 Tween 80 ve pH`sı 5,5-5,6-6,8 olan fosfat tamponu içerisinde ise hemen hemen hiç çözünmemektedir (Mistry ve Ravikumar, 2016).

OA`den yola çıkılarak AA`nın elde edilmeye çalışıldığı bu tez çalışmasında, çeşitli çözücülerin kullanıldığı farklı prosedürler yer aldığı için, AA`nın bazı çözücüler içindeki çözünürlüğü incelenmeye çalışılmıştır. Bunun için standart AA`dan spatül ucu kadar numune alınmış ve üzerine ~10 mL çözücü *(eter, hekzan* ve *kloroform)* ilave edilerek, belli bir süre çalkalama işlemi uygulanmıştır. Daha sonra, elde edilen çözeltiler (tamamen çözünmenin meydana gelmediği durumlarda, karışım süzülerek katı kısım uzaklaştırılmış ve süzüntü kısmı ile işleme devam edilmiştir) asidik ortamda BF_3 ile esterleştirilmiş ve AA`nın söz konusu çözücü içindeki çözünürlüğünü tespit edebilmek amacıyla GC-MS`de analiz edilmiştir.

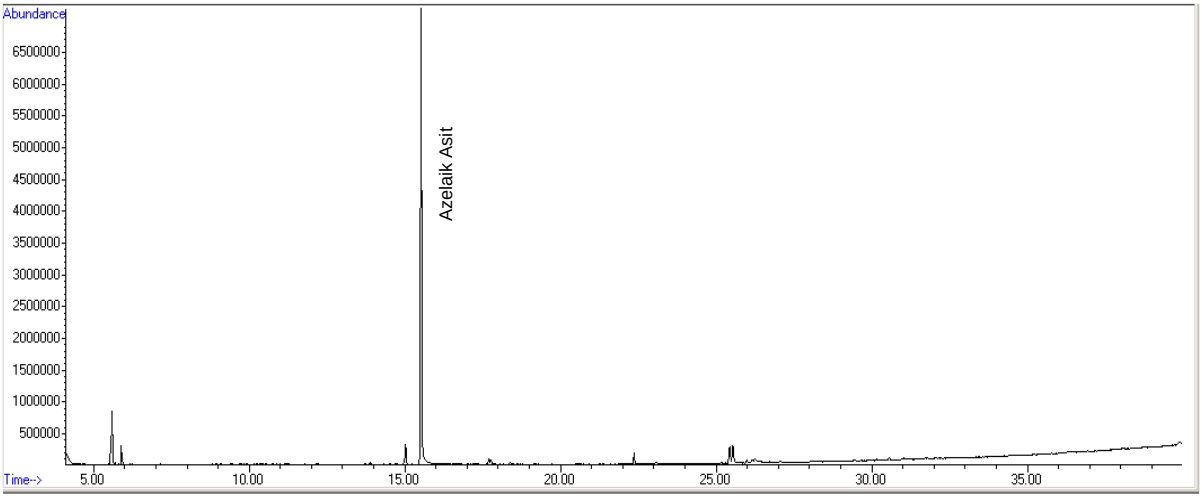
Standart AA`nın *eter* içindeki çözünürlük testi sonunda elde edilen GC-MS kromatogramı **Şekil 4.25.**`de, *hekzan* içindeki çözünürlük testi sonunda elde edilen GC-MS kromatogramı **Şekil 4.26.**`de, *kloroform* içindeki çözünürlük testi sonunda elde edilen GC-MS kromatogramı **Şekil 4.27.**`de yer almaktadır.



Şekil 4.25. Standart AA`nın *Eter* İçindeki Çözünürlük Testi Sonunda Elde Edilen GC-MS Kromatogramı



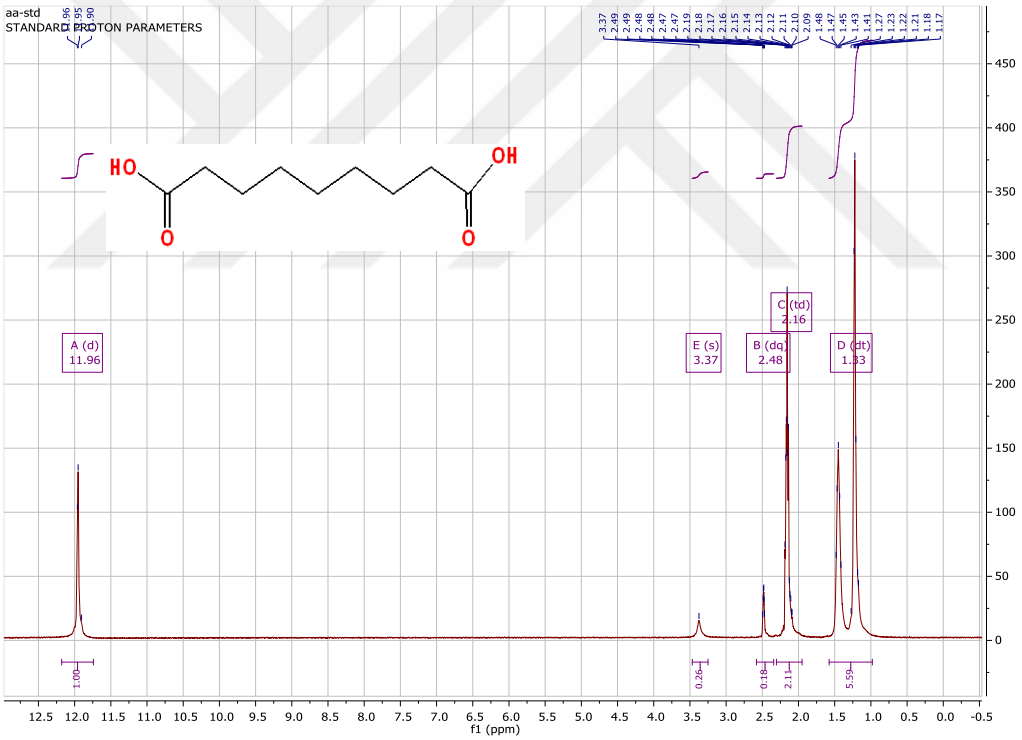
Şekil 4.26. Standart AA`nın *Hekzan* İçindeki Çözünürlük Testi Sonunda Elde Edilen GC-MS kromatogramı



Şekil 4.27. Standart AA`nın *Kloroform* İçindeki Çözünürlük Testi Sonunda Elde Edilen GC-MS Kromatogramı

Standart AA`nın farklı çözücüler içindeki çözünürlük testi sonuçları; AA kristallerinin, kullanılan çözücülerden sadece hekzanda çözünmediğini, kloroform ve eter içinde ise oldukça iyi derecede çözündüğünü göstermiştir. AA`nın eldesi ve saflaştırılması basamaklarında, çözünürlük deneylerinden elde edilen bu bilgiler göz önünde bulundurulmuştur.

4.4.1.2. Standart OA, AA ve PA`nın $^1$H-NMR yöntemi ile karakterizasyonu**Farklı prosedürler ile OA`dan elde edilen ve AA olduğu düşünülen maddelerin yapısal aydınlatmasında karşılaştırma amaçlı kullanılmak üzere, standart AA, PA ve OA için ^{1}H-NMR spektrum taramaları gerçekleştirilmiştir. Bu bağlamda, standart AA için elde edilen ^{1}H-NMR spektrumu **Şekil 4.28.`de, standart PA için elde edilen $^1$H-NMR spektrumu **Şekil 4.29.**`de ve standart OA için elde edilen ^{1}H-NMR spektrumu ise **Şekil 4.30.**`de yer almaktadır.

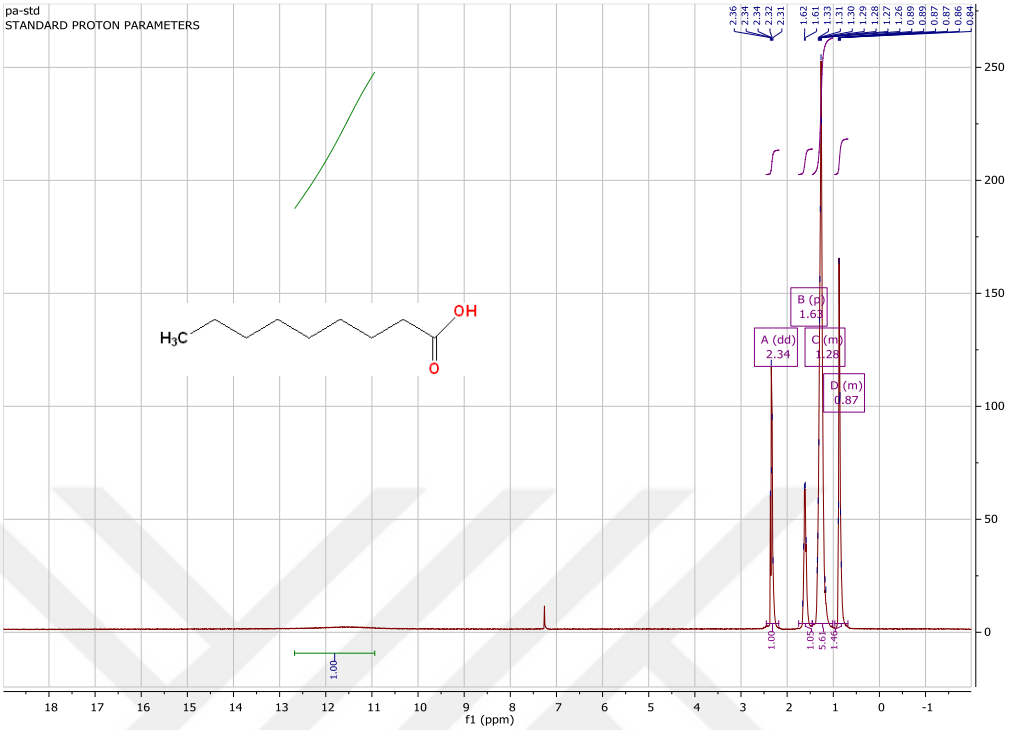


Şekil 4.28. Standart AA`ya Ait ^{1}H-NMR Spektrumu

^{1}H-NMR (400 MHz DMSO): δ 1.33 ppm (dt, 10H,(C**H**$_2$-)$_5$CH_2-COOH), 2.16 (td, 4H, C**H**$_2$-COOH), 11.96 (s, 2H, -COO**H**). M_A: 188.22 g/mol, $C_9H_{16}O_4$

Standart AA için elde edilen ^{1}H-NMR spektrumuna bakıldığında; 1.33 ppm`de karbonil karbonuna komşu (C**H**$_2$- C$H_2$-COOH) -C$H_2$- ye komşu 5 adet -C$H_2$- ait 10H, 2.16 ppm`de karbonik karbonuna komşu 2 adet -CH_2- ye ait 4H (C**H**$_2$-COOH) ve 11.96 ppm`de karboksilik aside ait 2H (-COO**H**) yer aldığı görülmektedir. Standart AA için

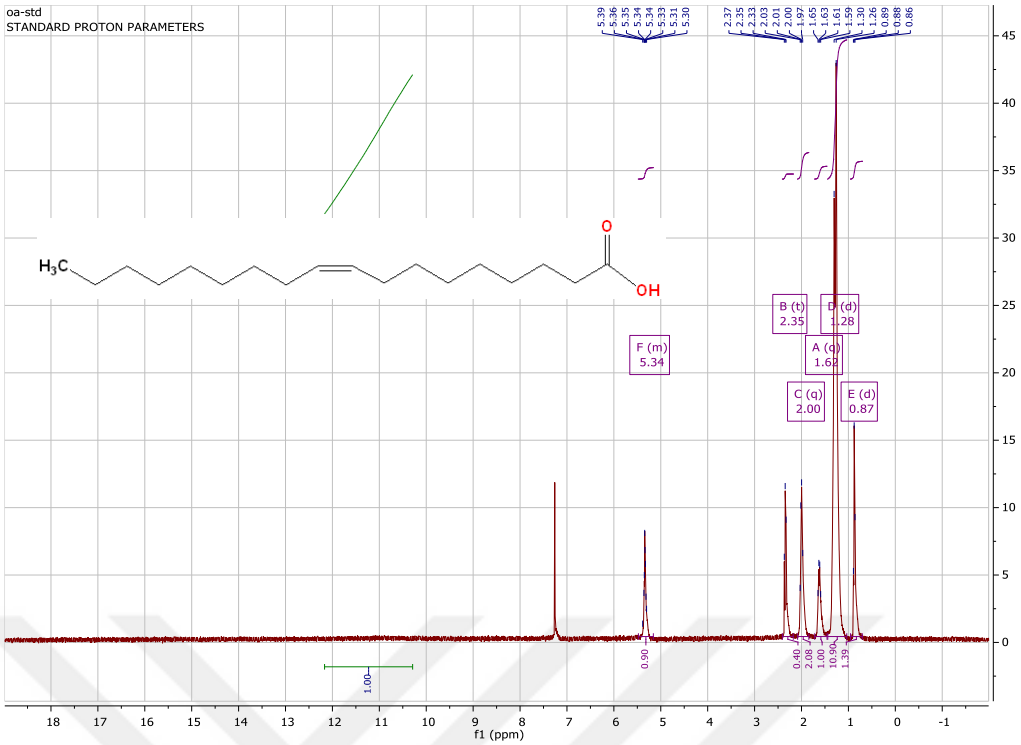
elde edilen ^{1}H-NMR spektrumu literatür bilgisi ile uyumludur (Benessere ve ark., 2015).



Şekil 4.29. Standart PA`ya Ait ^{1}H-NMR Spektrumu

^{1}H-NMR (400 MHz CD_3Cl): δ 0.87 ppm (m, 3H,(-CH_2-C**H**$_3$), 1.28 (m, 10H, -(C**H**$_2$)$_5$-CH_3), 1.63 (p, 2H, C**H**$_2$-(CH_2)$_5$- CH_3), 2.34 (dd, 2H, C**H**$_2$-COOH), 11.96 (b, 1H, -COO**H**). M_A: 158.24 g/mol, $C_9H_{18}O_2$

Standart PA için elde edilen ^{1}H-NMR spektrumuna bakıldığında; 0.87 ppm`de $CH_3$ grubuna ait 3H, 1.28 ppm`de CH_3 grubundan sonraki 5 adet -CH_2- ye ait 10H (-(C**H**$_2$)$_5$- CH_3), 1.63 ppm`de 5 adet -$CH_2$- den sonra gelen -$CH_2$- ye ait 2H (C**H**$_2$-($CH_2$)$_5$-$CH_3$), 2.34 ppm`de karbonil karbonuna komşu -CH_2- ye ait 2H (C**H**$_2$-COOH) ve 11.96 ppm`de –COOH grubuna ait 1H (-COO**H**) yer aldığı görülmektedir. Standart PA için elde edilen ^{1}H-NMR spektrumu literatür bilgisi ile uyumludur (Jang ve ark., 2012).



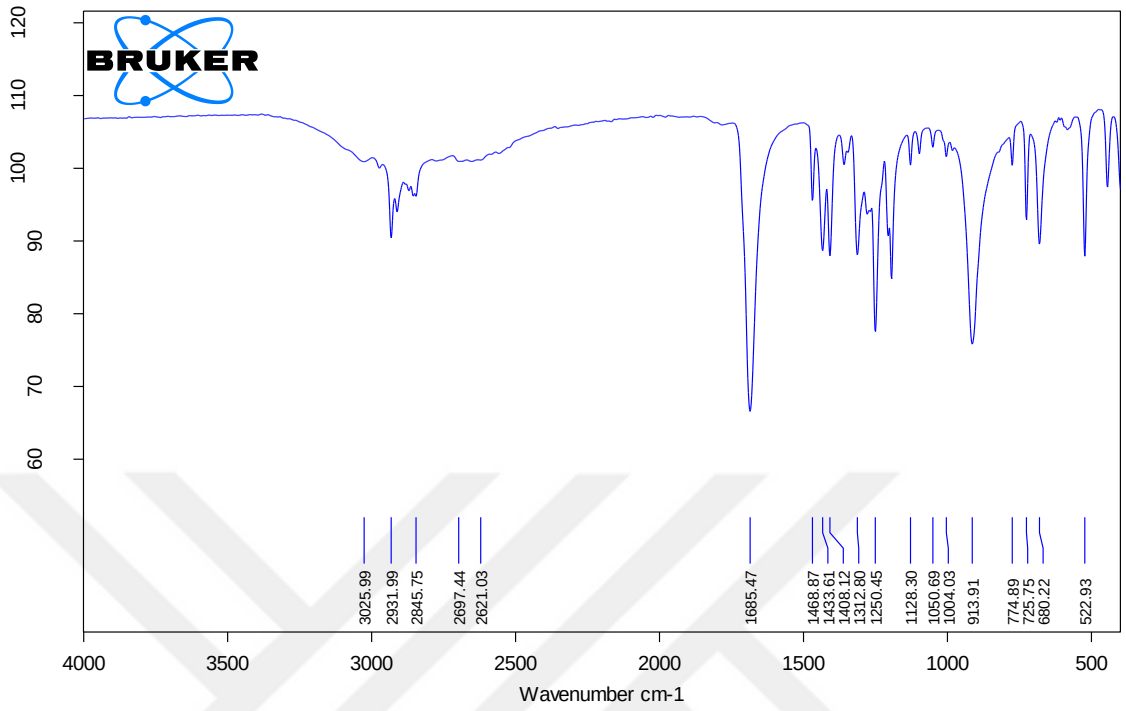
Şekil 4.30. Standart OA`ya Ait ^{1}H-NMR Spektrumu

^{1}H-NMR (400 MHz CD_3Cl): δ 0.87 ppm (d, 3H,(-CH_2-C**H₃**), 1.28 (d, 20H, -(C**H₂**)$_5$-CH_3 ve C=C-CH_2-(C**H₂**)$_5$), 1.62 (d, 2H, C**H₂**-CH_2- COOH), 2.00 (d, 2H, C**H₂**-COOH), 5.34 (m, 2H, (-**H**C=C**H**-), 11.35 (b, 1H, -COO**H**). M_A: 282.5 g/mol, $C_{18}H_{34}O_2$.

Standart OA için elde edilen ^{1}H-NMR spektrumuna bakıldığında; 0.87 ppm`de $CH_3$ grubuna ait 3H, 1.28 ppm`de CH_3 grubundan sonraki 5 adet -CH_2- ye ait 10H ve C=C-CH_2-(C**H₂**)$_5$ ait 10H olmak üzere toplam 20 H, 1.62 ppm`de karbonil karbonuna komşu-$CH_2$- ye komşu -C**H₂**-'ye ait 2H ( C**H₂**-$CH_2$- COOH), 2.00 ppm`de karbonil karbonuna komşu -CH_2- ye ait 2H (C**H₂**-COOH), 5.34 ppm`de alkil grubuna ait –**H**C=C**H**- ye ait 2H –(**H**C=C**H**-) ve 11.35 ppm`de –COOH grubuna ait 1H (-COO**H**) yer aldığı görülmektedir. Standart OA için elde edilen ^{1}H-NMR spektrumu literatür bilgisi ile uyumludur (Wallace, 2019)

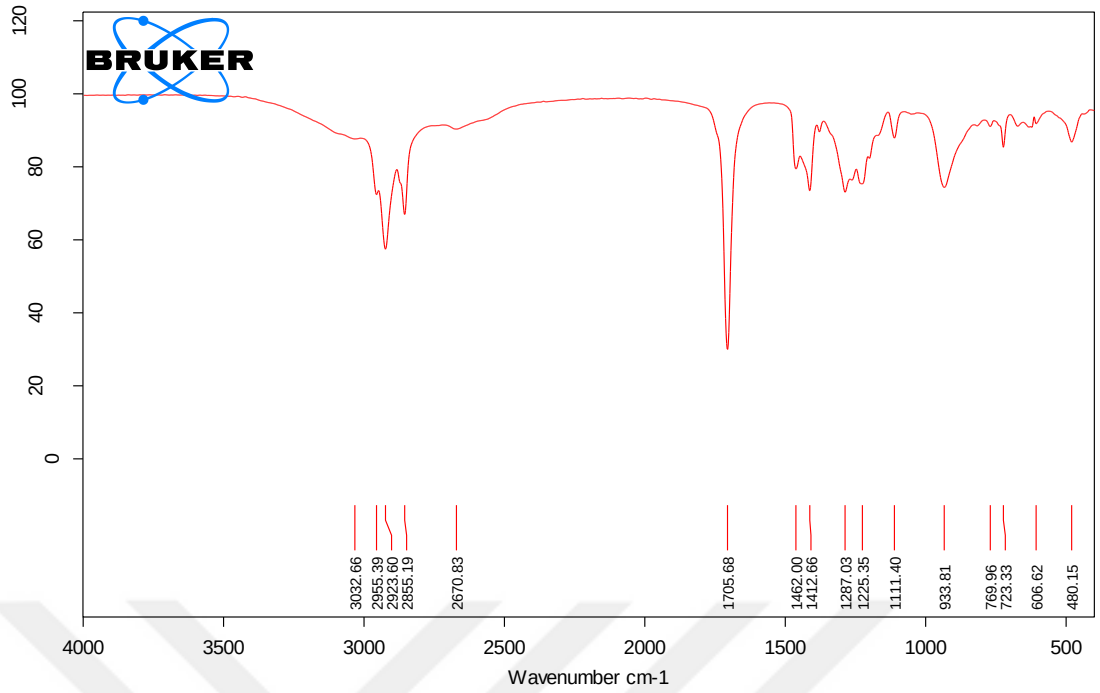
4.4.1.3. Standart AO, AA ve PA`nın FT-IR yöntemi ile karakterizasyonu** Farklı prosedürler ile OA`dan elde edilen ve AA olduğu düşünülen maddelerin yapısal aydınlatmasında karşılaştırma amaçlı kullanılmak üzere, standart AA, PA ve OA için ATR tekniği kullanılarak, FT-IR spektrum taramaları gerçekleştirilmiştir. Bu bağlamda, standart AA için elde edilen FT-IR spektrumu **Şekil 4.31.`de, standart PA için elde

edilen FT-IR spektrumu **Şekil 4.32.**`de ve standart OA için elde edilen FT-IR spektrumu ise **Şekil 4.33.**`de yer almaktadır.



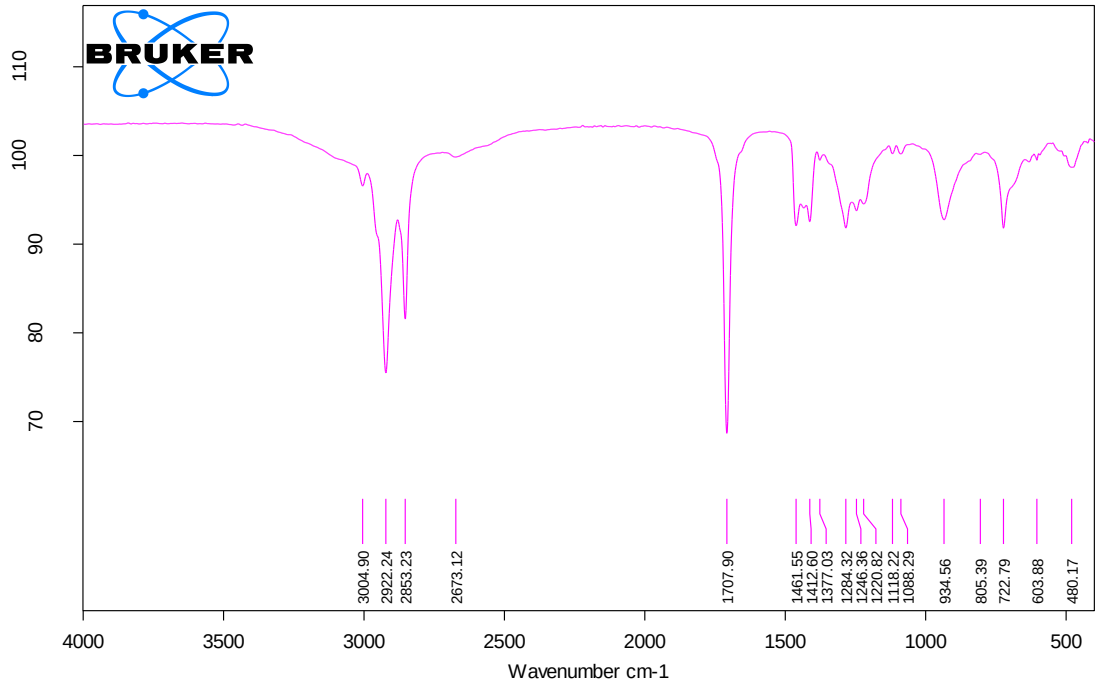
Şekil 4.31. Standart AA İçin ATR Tekniği Kullanılarak Elde Edilmiş FT-IR Spektrumu

Standart AA için elde edilen FT-IR spektrumuna bakıldığında; 3026-3200 cm^{-1} arasında –OH bağı geriliminden kaynaklanan yoğun bir bandın, 2931-2845 cm^{-1}`de $CH_2$ gruplarına ait C-H titreşim bandının, 1685 $cm^{-1}$`de karbonil grubuna ait C=O titreşim bandının, 1468-1250 cm^{-1} aralığında ise C-C ve C-O titreşim bantlarının yer aldığı görülmektedir. Standart AA için elde edilen FT-IR spektrumu literatür bilgisi ile uyumludur (Quaresma ve ark., 2019).



Şekil 4.32. Standart PA İçin ATR Tekniği Kullanılarak Elde Edilmiş FT-IR Spektrumu

Standart PA için elde edilen FT-IR spektrumuna bakıldığında; 3032-3200 cm^{-1} arasında –OH bağı geriliminden kaynaklanan yoğun bir bandın, 2955-2855 cm^{-1}`de $CH_2$ gruplarına ait C-H titreşim bandının, 1705 $cm^{-1}$`de karbonil grubuna ait C=O titreşim bandının, 1462-1225 cm^{-1} aralığında ise C-C ve C-O titreşim bantlarının yer aldığı görülmektedir. Standart PA için elde edilen FT-IR spektrumu literatür bilgisi ile uyumludur (Wallace, 2019)

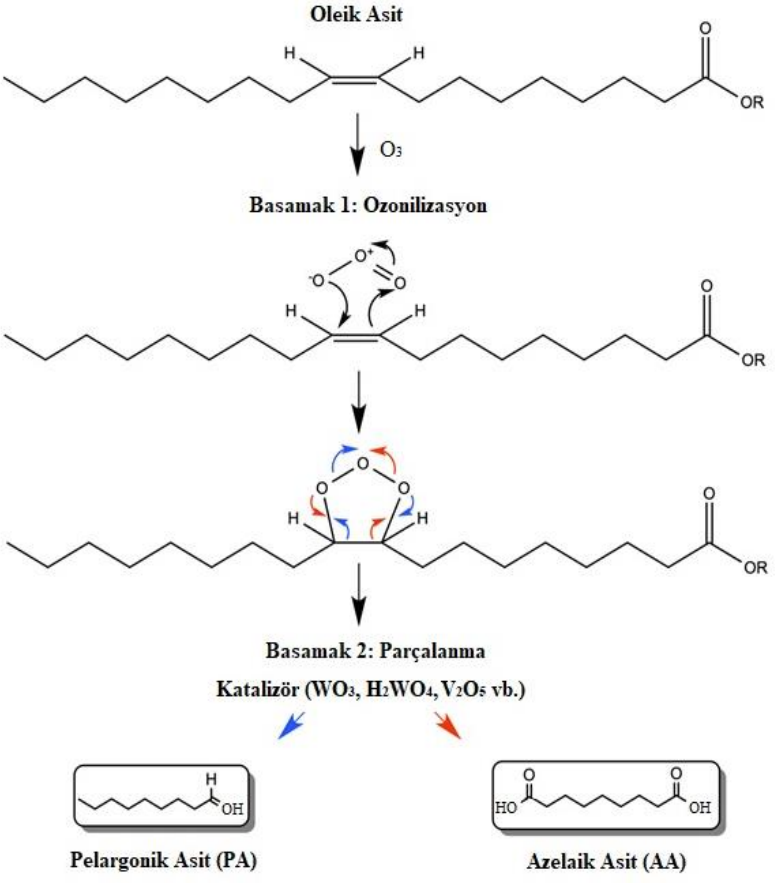


Şekil 4.33. Standart OA İçin ATR Tekniği Kullanılarak Elde Edilmiş FT-IR Spektrumu

Standart OA için elde edilen FT-IR spektrumuna bakıldığında; 3004-3100 cm^{-1} arasında –OH bağı geriliminden kaynaklanan yoğun bir bandın, 2922-2853 cm^{-1}`de $CH_2$ gruplarına ait C-H titreşim bandının, 1707 $cm^{-1}$`de karbonil grubuna ait C=O titreşim bandının, 1461-1246 cm^{-1} aralığında ise C-C ve C-O titreşim bantlarının yer aldığı görülmektedir. Standart OA için elde edilen FT-IR spektrumu literatür bilgisi ile uyumludur (Ghoreishi ve ark., 2012).

4.4.2. OA`nın V_2O_5 katalizörü varlığında ozon jeneratörü ile ozonilasyonu/parçalanması

Tez çalışması kapsamında AA`nın eldesi için kullanılan ilk yöntem, bir katalizör varlığında OA`nın ozon jeneratörü yardımıyla ozonizasyonu ve parçalanmasıdır. Ticari AA üretiminde yaygın olarak kullanılan ve iki basamakta gerçekleşen yöntemin; ilk basamağını OA`nın yapısında bulunan çift bağa ozon molekülünün bağlanması ile *ozonid* adı verilen türevlerin oluşması, ikinci basamağını ise bu türevlerin indirgen koşullarda su ile hidrolize olarak parçalanması oluşturmaktadır. Söz konusu ozonizasyon ve parçalama işlemi sonunda açığa çıkan ana ürünler ise; AA ve PA`dır (**bkz. Şekil 4.34.**).

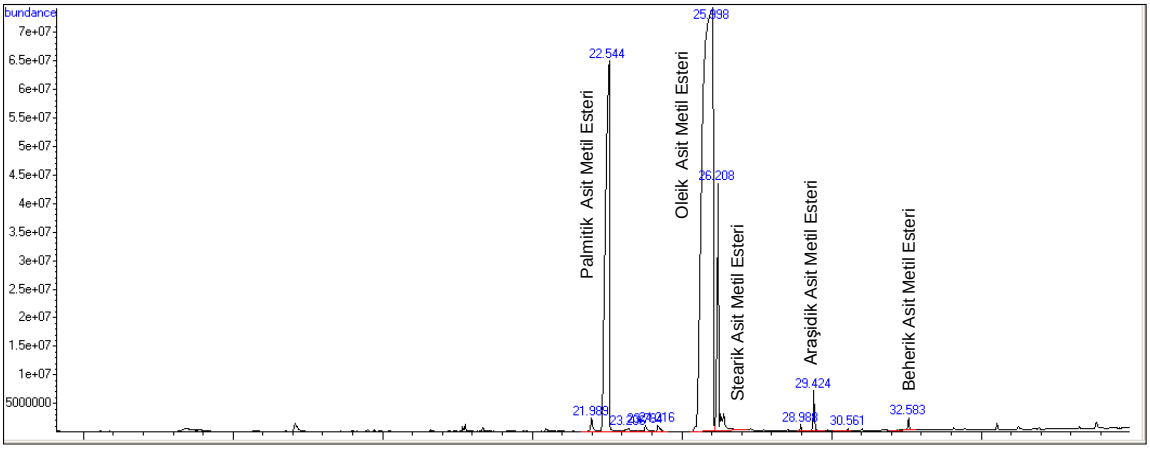


Şekil 4.34. OA Bir Katalizör Varlığında Ozonilasyonu Sonucu Parçalanması ve Açığa Çıkan Ürünler (Pfrang ve ark., 2014)

4.4.2.1. Ozonizasyon/parçalama karışımındaki AA`nın GC-MS yöntemi ile tayini

V_2O_5`in katalizör olarak kullanıldığı ozonizasyon/parçalanma deneylerine 36 saat boyunca devam edilmiş, deneyler sonunda meydana gelmesi beklenen AA oluşumu, reaksiyon karışımından belli aralıklarla (10, 24, 36 saat) alınan numunelerin GC-MS`de analiz edilmesiyle tespit edilmeye çalışılmıştır.

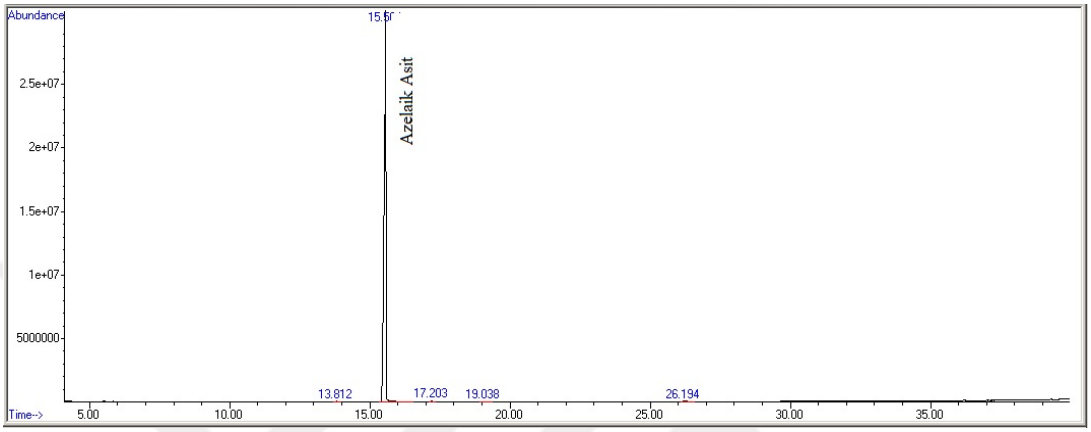
Reaksiyon sırasında oluşan AA (%) ve parçalanmadan ortamda kalan (reaksiyonun ne ölçüde tamamlandığını gösteren) OA (%) miktarlarının tespiti için, ozonizasyon/parçalama işleminde kullanılan OA`nın (tez çalışması kapsamında elde edilen) GC-MS kromatogramından faydalanılmış (**Şekil 4.35.** ve **Tablo 4.36.**), reaksiyon karışımından 10, 24 ve 36. saatlerde alınan numuneler içindeki AA`nın tespiti için ise 4 farklı konsantrasyona sahip AA standartları ile hazırlanan kalibrasyon grafiği kullanılmıştır **(Şekil 4.37.)**. Reaksiyon karışımları içerisindeki AA miktarlarının hesaplanmasında kalibrasyon grafiğinin kullanımına ihtiyaç duyulmasının sebebi; reaksiyon süresi arttıkça artması beklenen AA miktarının (%), reaksiyon karışımından belirli saatlerde alınan numuneler için elde edilmiş olan kromatogramlarda farklı sayıda ve miktarda türlerin yer alması sebebiyle doğru olarak tespit edilememiş olmasıdır *(ilerki çalışmalarda, OA ve PA miktarlarının daha doğru bir şekilde tespit edilmesi için de kalibrasyon grafiklerinden faydalanılacaktır).* Reaksiyon karışımından alınan her bir numune için BF_3 ile türevlendirme işlemi sonrası elde edilen GC-MS kromatogramları da **Şekil 4.38.**, **Şekil 4.39.**,ve **Şekil 4.40.**`de yer almaktadır.



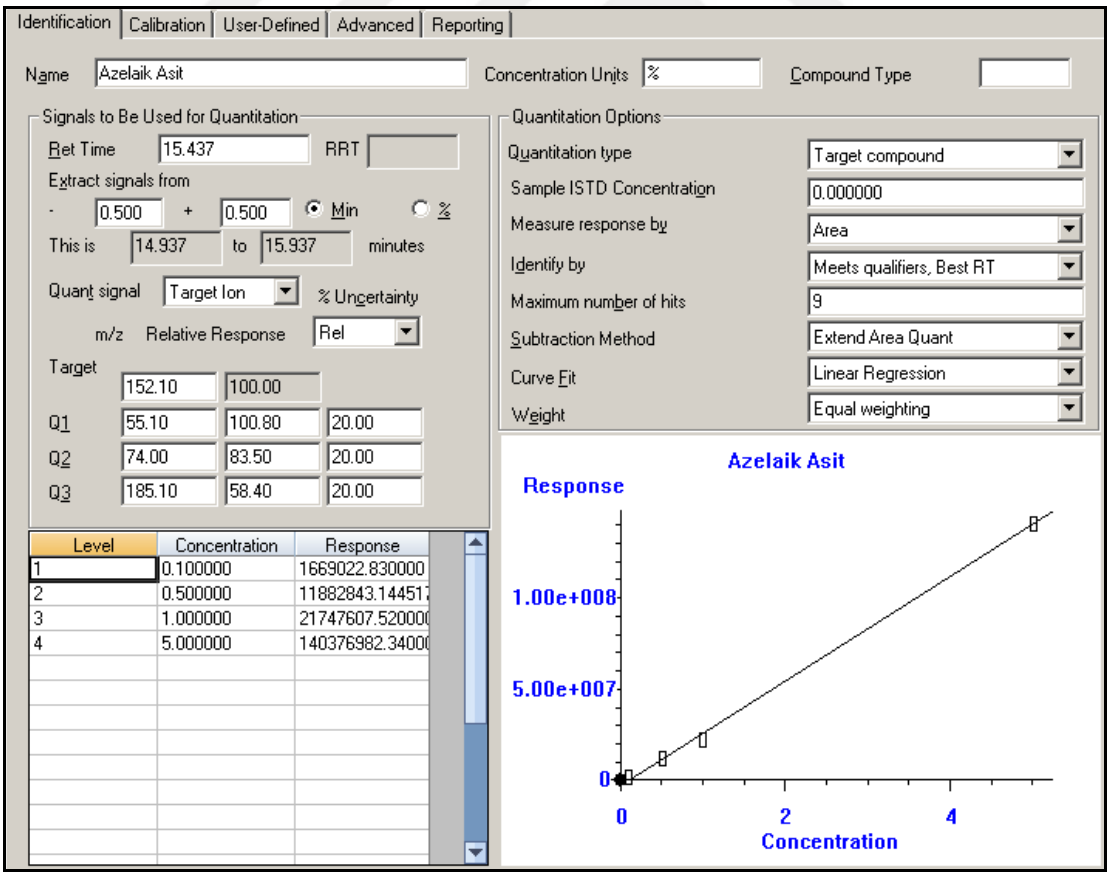
Şekil 4.35. Ozonilasyon/Parçalama Deneylerinde Kullanılan OA Ait GC-MS Kromatogramı

Tablo 4.36. Ozonilasyon/Parçalama Deneylerinde Kullanılan OA Ait GC-MS Kromatogramı Verileri

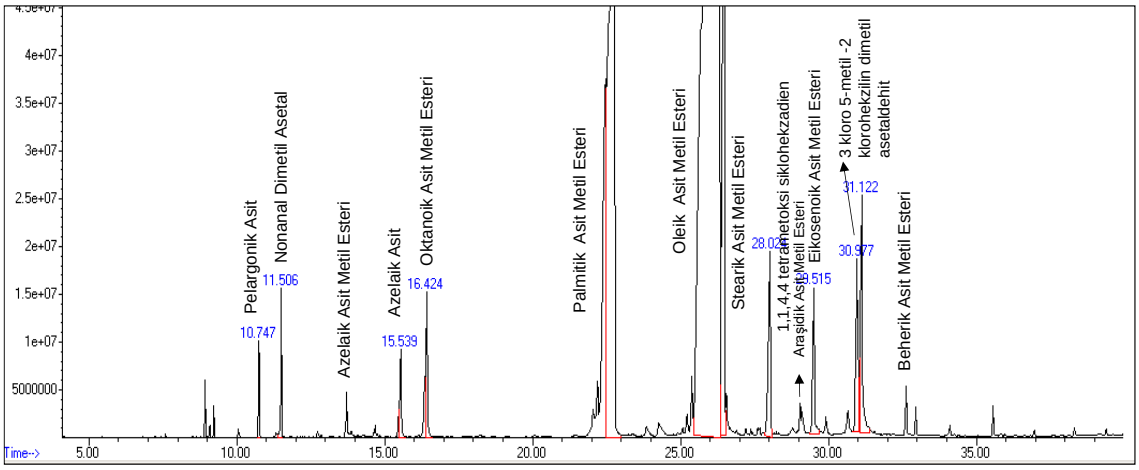
Tür	Alıkonma Zamanı, t_R	Madde Miktarı* (%)
Palmitoleik Asit	21,99	0,39
Palmitik Asit	22,54	22,52
Oleik Asit	25,99	68,39
Stearik asit	26,21	6,82
Araşidik asit	29,42	0,80



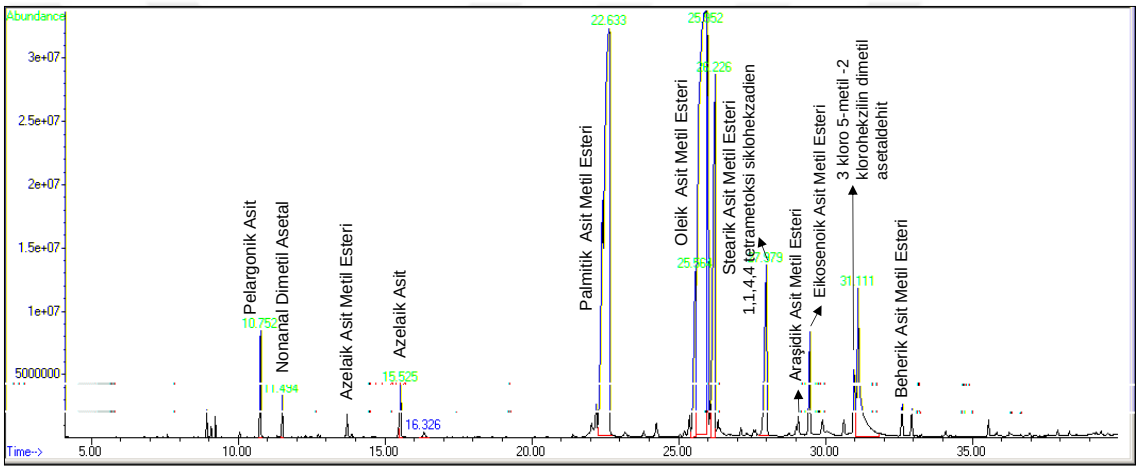
Şekil 4.36. % 5`lik Saf AA`nın Metanoldeki Çözeltisine Ait GC-MS Kromatogramı



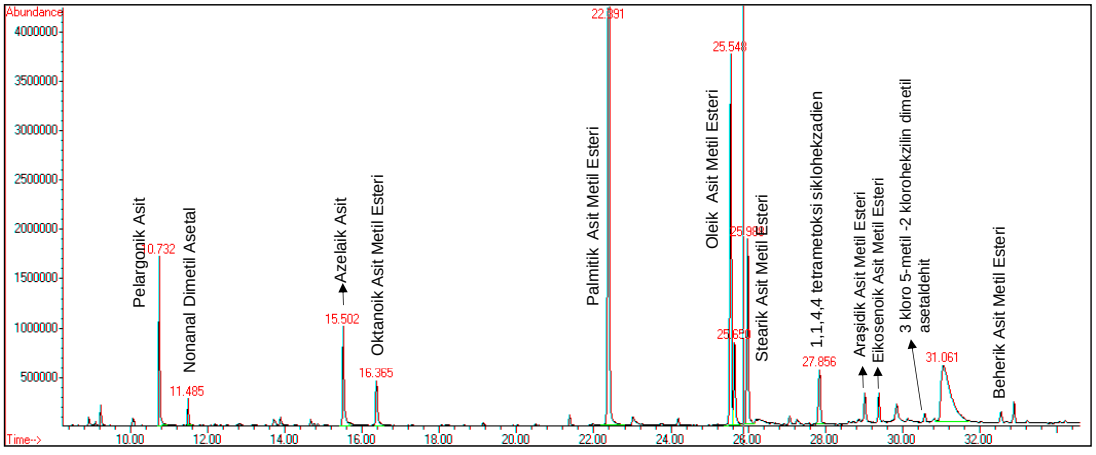
Şekil 4.37. Ozonilasyon/Parçalama Deneylerinden Alınan Reaksiyon Karışımlarındaki AA Miktarının GC-MS Yöntemi ile Tespiti için Kullanılan Kalibrasyon Grafiği (R^2= 0,9985)



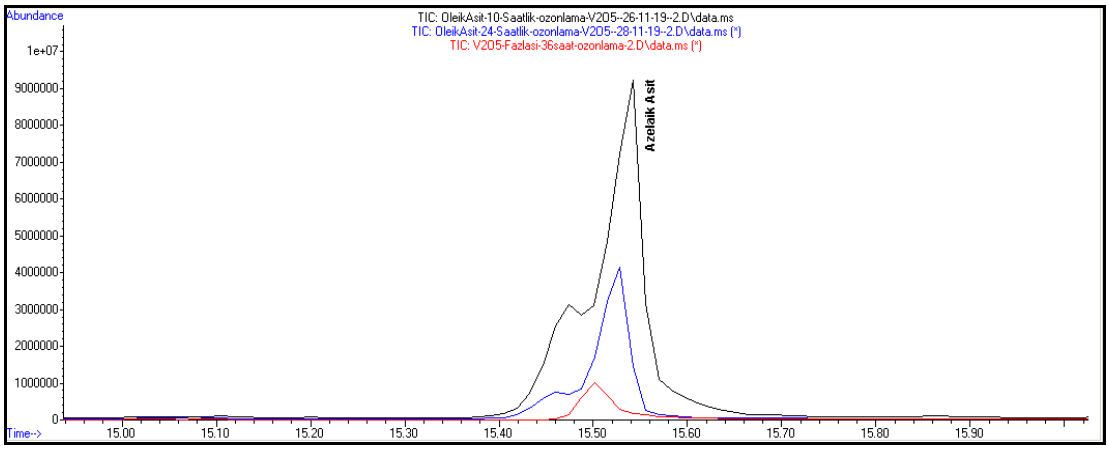
Şekil 4.38. 10 Saatlik Ozonizasyon/Parçalama İşlemi Sonucu Elde Edilen Reaksiyon Karışımına Ait GC-MS Kromatogramı



Şekil 4.39. 24 Saatlik Ozonizasyon/Parçalama İşlemi Sonucu Elde Edilen Reaksiyon Karışımına Ait GC-MS Kromatogramı



Şekil 4.40. 36 Saatlik Ozonizasyon/Parçalama İşlemi Sonucu Elde Edilen Reaksiyon Karışımına Ait GC-MS Kromatogramı



Şekil 4.41. 10, 24 ve 36 Saatlik Ozonizasyon/Parçalama İşlemi Sonucu Elde Edilen Reaksiyon Karışımlarına Ait GC-MS Kromatogramlarında AA Piklerinin Üst Üste Görünüşü

OA`nın ozonizasyonu/parçalanmasına ilişkin reaksiyon veriminin tespit edilmesinde kullanılan OA ve standart AA için elde edilen GC-MS verileri ve bu veriler doğrultusunda tespit edilen reaksiyon karışımındaki AA miktarı (%) ve parçalanmadan kalan OA miktarı (%) **Tablo 4.37.** `de verilmiştir.

Tablo 4.37. OA`nın Ozonizasyonu/Parçalanması İşlemi Sırasında 10, 24 ve 36. Saatlerde Alınan Numuneler için Elde Edilen GC-MS Analizi Verileri

	OA ve Standart AA için Elde Edilen GC-MS Verileri		
	Tür	**Alıkonma Zamanı, t_R**	**Madde Miktarı (%)**
	Oleik Asit	25,65-25,99	68,39
	Standart Azelaik Asit	15,58	100,00
	Ozonilasyon/Parçalama Reaksiyonu Karışımından Alınan Numuneler için AA ve OA Miktarları (%)		
Tür	**10 saat sonra**	**24 saat sonra**	**36 saat sonra**
Reaksiyon Karışımındaki Azelaik Asit* (%)	1,09	0,45	0,19
Reaksiyon Karışımındaki Oleik Asit* (%)	65,16	47,00	12,64

* Ozonizasyon/parçalanma deneyleri sırasında elde edilen reaksiyon karışımları içindeki AA miktarlarının hesaplanmasında AA için hazırlanan kalibrasyon grafiğinden, reaksiyon ortamında parçalanmadan kalan OA miktarının tespitinde ise GC-MS analizlerinden elde edilen kromatogram verilerinden faydalanılmıştır.

Yukarıda yer alan GC-MS kromatogramlarından ve **Tablo 4.37.**`deki verilerden de görüleceği üzere; OA`nın ozonizasyonu/parçalanması ile AA`nın elde edilmeye çalışıldığı deneylerde, reaksiyon süresi arttıkça OA`nın parçalanma oranının

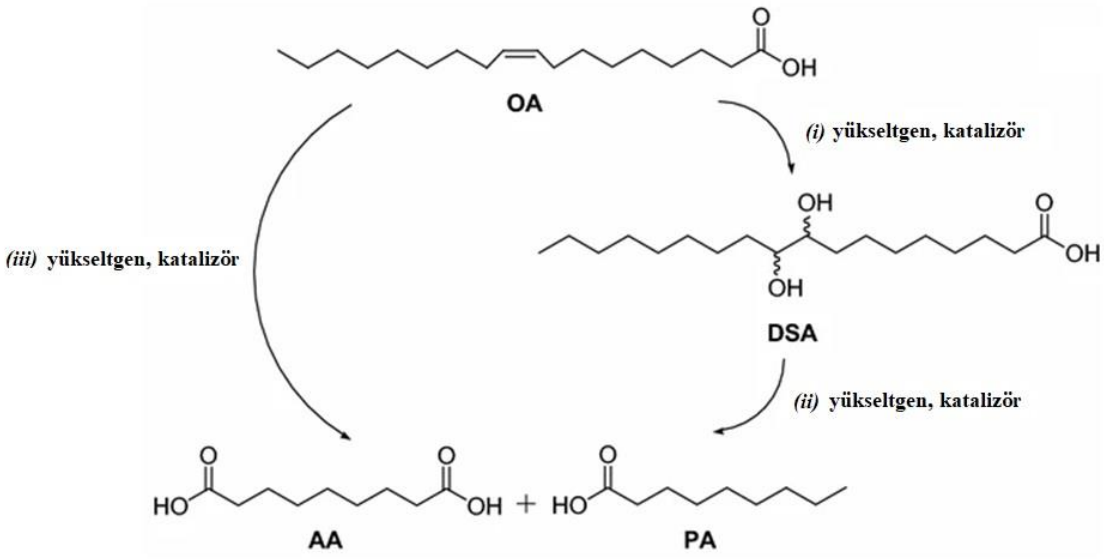
da arttığı gözlenmiş (10. saat sonunda % 65,16 ; 24. saat sonunda % 47,00 ; 36. saat sonunda % 12,64 OA bulunmaktadır) fakat, bu artışa paralel olarak artması beklenen AA`nın reaksiyon karışımı içerisindeki miktarının ise, sadece kromatogram verileri dikkate alındığında; 10, 24 ve 36. saatlerde alınan numuneler için sırasıyla % 0,72 ; % 0,67 ve % 4,55 olduğu tespit edilmiştir. AA için elde edilen bu düzensiz verilerin, kromatogramda yer alan farklı sayı ve miktardaki türlerden kaynaklandığı düşünüldüğünden ve AA miktarının reaksiyon süresi ile birlikte artması beklendiğinden, karışım içerisindeki AA miktarının daha doğru bir yaklaşımla belirlenebilmesi için farklı AA konsatrasyonuna sahip standart çözeltilerin kullanılmasıyla çizilen kalibrasyon grafiğinden faydalanılmıştır. Oluşturulan kalibrasyon grafiği yardımıyla hesaplanan AA miktarlarında, beklenilenin aksine; 10, 24 ve 36. saatlerde alınan numuneler için sırasıyla % 1,09 ; % 0,45 ve % 0,19 şeklinde bir azalış gözlenmiştir. Bu sebeple; ozonizasyon/parçalama yönteminin, söz konusu deneysel şartlarda OA `den AA elde edilmesi için verimli bir metot olmadığına karar verilmiş, yine de 36 saatlik işlem sonrasında elde edilen kompleks karışım içerisinde oldukça az miktarda bulunan AA, fraksiyonlu destilasyon yöntemi kullanılarak saflaştırılmaya çalışılmıştır.

4.4.2.2. Ozonizasyon/parçalama işleminden elde edilen AA'nın fraksiyonlu distilasyon yöntemi ile saflaştırılması

36 saat boyunca devam eden ozonizasyon/parçalama işlemi sonunda elde edilen reaksiyon karışımı içerisinde, % 0,19 gibi oldukça az bir miktarda bulunan AA`nın saflaştırılması için, farklı kaynama noktasına sahip olan maddelerin ayrılması/saflaştırılmasında kullanılan yöntemlerden biri olan fraksiyonlu distilasyon yönteminden faydalanılmıştır. ~295 °C sıcaklıkta, 5-6 saat boyunca sürdürülen deney sonunda toplama kabında herhangi bir ürün elde edilememiş, ayrıca uzun süre yüksek sıcaklığa maruz kalan reaksiyon karışımında yanma ve kararmalar görüldüğü için distilasyon işlemine son verilmek zorunda kalınmıştır.

4.4.3. OA`nın H_2O_2/WO_3 varlığında oksidasyonu/parçalanması

Tez çalışması kapsamında AA`nın eldesi için kullanılan ikinci yöntem, bir katalizör varlığında OA`nın bir yükseltgeyici ajan yardımıyla oksidasyonu ve parçalanmasıdır. Yöntem, OA`nın yapısında bulunan çift bağın bir yükseltgen ile etkileşmesi sonucu 9,10-dihidrokstearik asit (DSA) yapısına dönüşmesini, ardından da söz konusu bu yapının başlıca AA ve PA oluşturmak üzere parçalanmasını içermektedir **(bkz. Şekil 4.42.).**



Şekil 4.42. OA Bir Katalizör ve Bir Yükseltgen Varlığında Parçalanması Sonucu Açığa Çıkan Ürünler (Benessere ve ark., 2015)

Asit ilaveli ve *asit ilavesiz* olmak üzere iki farklı şekilde gerçekleştirilen OA`nın oksidasyonu/parçalanması deneylerinde; katalizör olarak $WO_3$, yükseltgeyici ajan olarak ise $H_2O_2$`nin kullanılmış, 70 °C sabit sıcaklıkta yürütülen deneylerden *asit ilaveli* olanı 5 saatte, *asit ilavesiz* olan ise 8 saatte tamamlanmıştır. Reaksiyonlar sonunda elde edilen ve literatürden edinilen bilgiler doğrultusunda oldukça fazla türü içerdiği bilinen kompleks reaksiyon karışımı içerisinden AA`nın saflaştırılması ise EtOAc ve sıcak suyun kullanıldığı ekstraksiyon çalışmaları ile gerçekleştirilmeye çalışılmıştır.

4.4.3.1. H_2O_2/WO_3 kullanılarak elde edilen AA'nın EtOAc/sıcak su ile saflaştırılma verimi

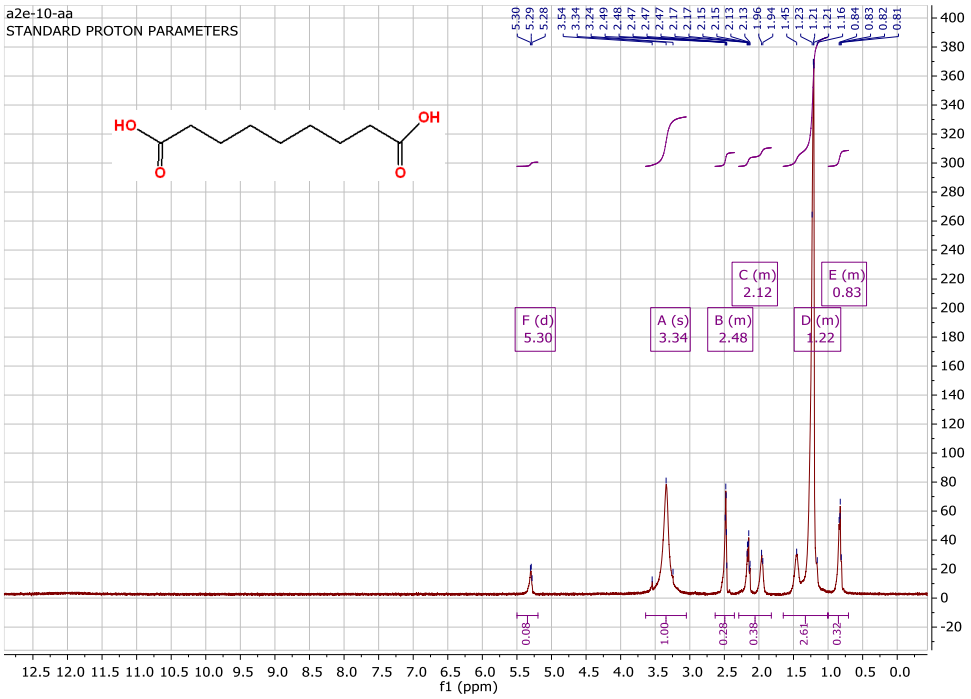
H_2O_2/WO_3 varlığında OA`nın oksidasyonu/parçalanması ile AA`nın elde edilmeye çalışıldığı *asit ilaveli* ve *asit ilavesiz* deneyler sonunda elde edilen kompleks karışımlar içerisindeki AA`nın saf olarak elde edilebilmesi için, EtOAc ve sıcak su ile ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiş; öncelikle AA ve PA karışımının, sonrasında ise bu karışım içerisinden AA`nın elde edilmeye çalışıldığı iki basamakta yürütülen saflaştırma deneylerinden asit ilaveli olan deneyler sonunda yok denecek kadar az miktarda madde elde edilirken, asit ilavesiz olanlarda ise herhangi bir ürün elde edilememiştir.

OA`nın H_2O_2/WO_3 varlığında oksidasyonu/parçalanması işlemi sonunda, büyük oranda AA içeriğine sahip olan bir reaksiyon karışımının elde edildiği düşünülmesine rağmen, saflaştırma basamakları sonunda beklenildiği ölçüde bir ürün

elde edilememiş olmasının; AA ve PA içeren organik fazdan AA`nın izole edilmesi basamağında (ikinci saflaştırma basamağı) EtOAc`nin yüksek bir sıcaklıkta kullanılmış olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Şöyle ki; bu basamakta ortama sıcak su ve EtOAc birlikte ilave edilmiş ve AA`nın çözünürlüğü daha fazla olan sıcak suyu tercih etmesi beklenmiştir. Bununla birlikte, sıcak su fazından elde edilen ürün miktarının oldukça az olması, AA`nın tamamen su fazında kalmadığını, sıcak su kadar olmasa da çözünebildiği maddelerden biri olan EtOAc fazında da kalmış olabileceğini göstermiştir. Söz konusu prosedürdeki deneysel şartların ileriki çalışmalarda değiştirilmesi/geliştirilmesi ile muhtemel çözümler bulunmasının mümkün olabileceği düşünülmektedir.

Asit ilaveli deneyden elde edilen ve AA olduğu düşünülen katı madde, yapısal kimliğinin aydınlatılması için ^{1}H-NMR`da analiz edilmiştir. Madde miktarının çok az olması sebebiyle diğer karakterizasyon çalışmaları (FT-IR ve GC-MS analizleri) gerçekleştirilememiştir.

4.4.3.2. EtOAc kullanılarak saflaştırılan AA`nın NMR yöntemi ile karakterizasyonu** OA`nın H_2O_2/WO_3 varlığında oksidasyonu/parçalanması (asit ilaveli) deneylerinden elde edilen az miktardaki katı madde, yapısal kimliğinin aydınlatılması için ^{1}H-NMR`de analiz edilmiş ve elde edilen spektrum **(Şekil 4.43.), standart AA ^{1}H-NMR spektrumu **(Bölüm 4.4.1.2)** ile karşılaştırılarak maddenin AA olup/olmadığına ilişkin değerlendirmelerde bulunulmuştur.



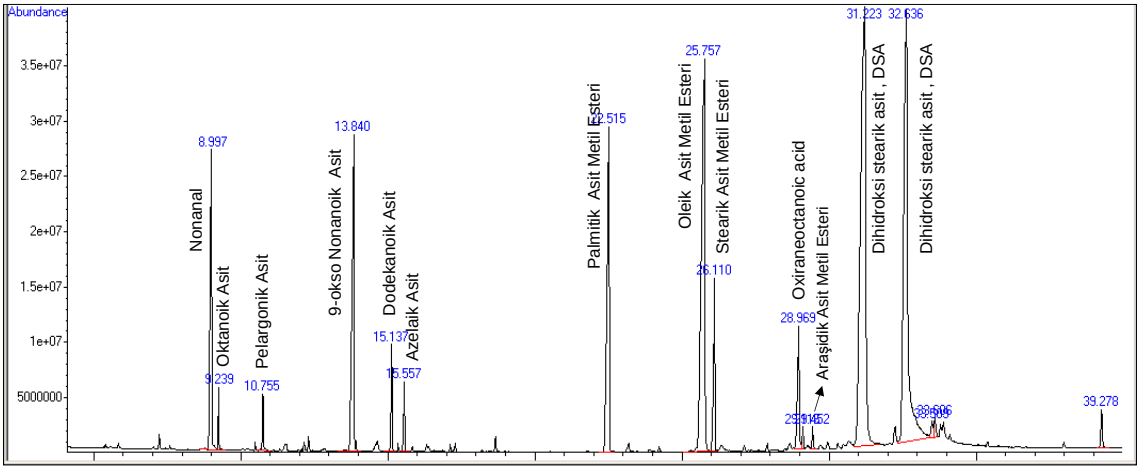
Şekil 4.43. OA`nın H_2O_2/WO_3 Varlığında Oksidasyonu/Parçalanması (asit ilaveli) Deneyinden Elde Edilen Katı Maddeye Ait ^{1}H-NMR Spektrumu. ^{1}H-NMR (400 MHz DMSO)

Bölüm 4.4.1.2.`de belirtildiği gibi, standart AA`nın ^{1}H-NMR spektrumunda; 1.33 ppm`de karbonil karbonuna komşu (C**H**$_2$- $CH_2$-COOH) -$CH_2$- ye komşu 5 adet -$CH_2$- ait 10H, 2.16 ppm`de karbonik karbonuna komşu 2 adet -CH_2- ye ait 4H (C**H**$_2$-COOH) ve 11.96 ppm`de karboksilik aside ait 2H (-COO**H**) yer almaktadır.

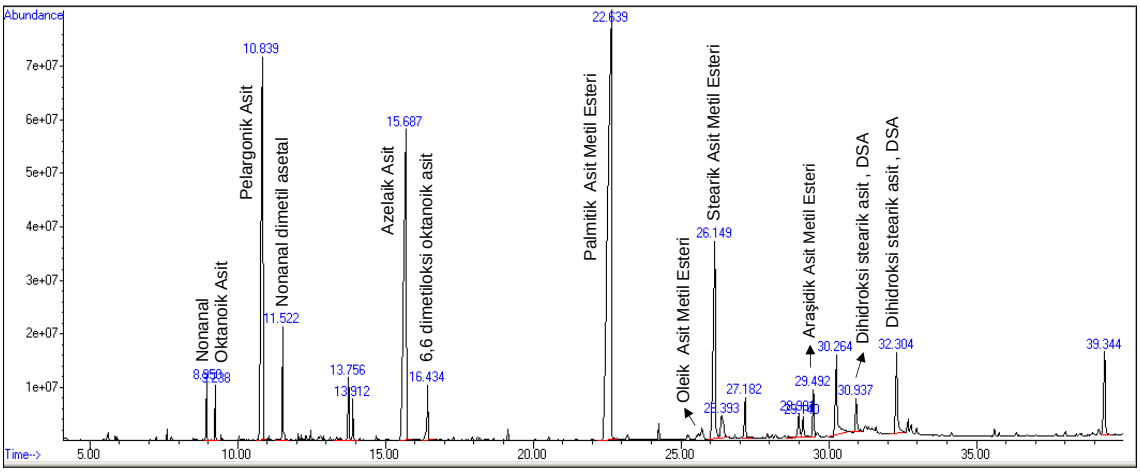
OA`nın H_2O_2/WO_3 varlığında oksidasyonu/parçalanması sonrası, EtOAc ve sıcak su kullanılarak yapılan saflaştırma işleminden elde edilen ürünün ^{1}H-NMR spektrumunun ise, standart AA ile aynı spektrum görüntüsüne sahip olmadığı ve oldukça fazla safsızlık içerdiği görülmektedir. Bu sebeple söz konusu prosedür sonunda elde edilen maddenin saf AA olmadığına ve yüksek saflıkta AA elde edilebilmesi için farklı saflaştırma prosedürleri üzerinde durulması gerektiğine karar verilmiştir.

4.4.4. OA`nın H_2O_2/H_2WO_4 varlığında oksidasyonu/parçalanması

OA`nın $H_2O_2/H_2WO_4$ varlığında oksidasyonu/parçalanması ile AA`nın elde edilmeye çalışıldığı deneylerde; standart OA (% 90,85) ve tez kapsamında elde edilen OA (% 68,02) olmak üzere iki farklı çıkış maddesi kullanılmış, reaksiyon sonunda elde edilen kompleks karışımlar, kullanılan çıkış OA`ların ne ölçüde parçalandığının tespit edilebilmesi ve AA oluşumunun gözlenebilmesi için GC-MS`de analiz edilmiştir. ~16-17 saatlik reaksiyon süresi sonunda meydana gelen kompleks karışımlar için elde edilen GC-MS kromatogramları **Şekil 4.44. ve Şekil 4.45.**`de verilmiştir. Daha sonra bu kompleks karışımlar farklı saflaştırma işlemlerine tabi tutulmuş ve söz konusu saflaştırma işlemlerinin AA eldesi üzerine olan etkisi incelenmeye çalışılmıştır.



Şekil 4.44. Standart OA`nın (% 90,85) H_2O_2/H_2WO_4 Varlığında Oksidasyonu/Parçalanması Sonucu Elde Edilen Kompleks Karışımına Ait GC-MS Kromatogramı (daha sonra $CHCl_3$-sıcak su ile saflaştırılan karışım)



Şekil 4.45. Tez Kapsamında Elde Edilen OA`nın (% 68,02) H_2O_2/H_2WO_4 Varlığında Oksidasyonu/Parçalanması Sonucu Elde Edilen Kompleks Karışımına Ait GC-MS Kromatogramı (daha sonra X/sıcak su ile saflaştırılan karışım)

Şekil 4.44. ve Şekil 4.45.`de yer alan kromatogramlardan da görüleceği üzere; $H_2O_2/H_2WO_4$ varlığında gerçekleştirilen oksidasyonu/parçalanma reaksiyonu sonunda elde edilen karışım içerisinde, AA`nın yanı sıra birçok farklı maddenin de oluşumu söz konusudur. Bu sebeple, sonuçların değerlendirilmesinde sadece tez çalışması kapsamında yer alan maddeler üzerinde durulmuştur. Bu bağlamda; söz konusu oksidasyon/parçalanma işlemi sonunda elde edilen karışımda bulunan OA, PA ve AA miktarları **Tablo 4.38. ve Tablo 4.39.**`de sunulmuştur.

Tablo 4.38. Standart OA`nın (% 90,85) $H_2O_2/H2WO_4$ Varlığında Oksidasyonu/Parçalanması Sonucu Elde Edilen Kompleks Karışımına Ait GC-MS kromatogramı Verileri

Tür	Alıkonma Zamanı, t_R	Madde Miktarı* (%)
Standart Oleik Asit *(% 90,85)*	25,75	15,69
Azelaik Asit	15,56	0,80
Pelargonik Asit	10,76	0,64

* Daha sonra $CHCl_3$ ve sıcak su ile saflaştırma işlemine tabi tutulan reaksiyon karışımı içindeki madde miktarlarını ifade etmektedir.

Tablo 4.39. Tez Kapsamında Elde Edilen OA`nın (% 68,02) H_2O_2/H_2WO_4 Varlığında Oksidasyonu/Parçalanması Sonucu Elde Edilen Kompleks Karışımına Ait GC-MS Kromatogramı Verileri

Tür	Alıkonma Zamanı, t_R	Madde Miktarı* (%)
Tez Kapsamında Elde Edilen Oleik Asit *(% 68,02)*	26,15	9,10
Azelaik Asit	15,69	17,02
Pelargonik Asit	10,84	16,64

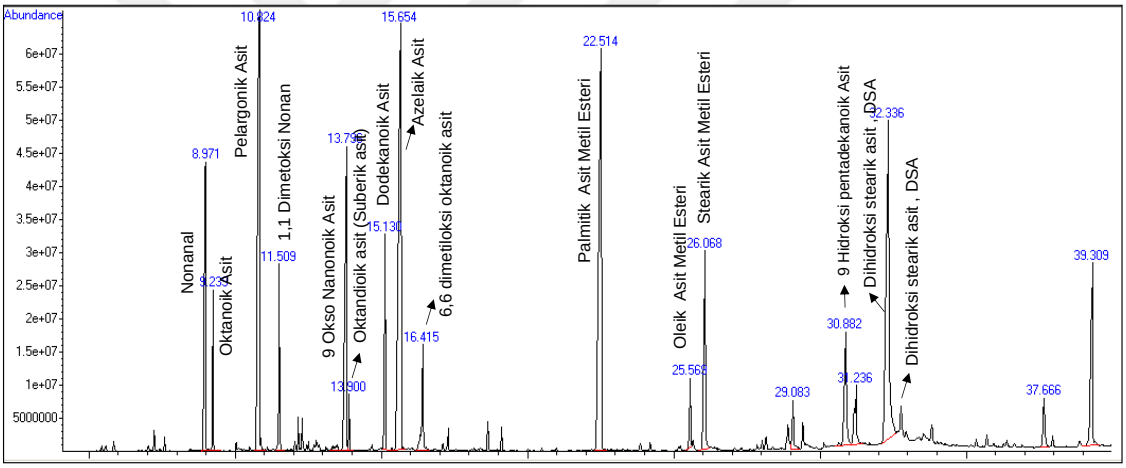
* Daha sonra X/sıcak su ile saflaştırma işlemine tabi tutulan reaksiyon karışımı içindeki madde miktarlarını ifade etmektedir.

Standart OA`nın (% 90,85) H_2O_2/H_2WO_4 varlığında oksidasyonu/parçalanması sonucu elde edilen kompleks karışıma (daha sonra $CHCl_3$ ve sıcak su ile saflaştırma işlemine tabi tutulan) ait GC-MS kromatogramı verileri incelendiğinde **(Tablo 4.38.)** ; reaksiyon başlangıcında % 90,85 olan standart OA yüzdesinin, oksidasyon/parçalama işlemi sonunda % 15,69`ye düştüğü yani OA`nın % 82,73`lik kısmının reaksiyon sırasında parçalandığı görülmektedir. Söz konusu işlem sonunda açığa çıkması beklenen temel parçalanma ürünleri olan AA ve PA miktarları ise sırasıyla % 0,80 ve % 0,64 olarak tespit edilmiştir. OA`ya ilişkin parçalanma oranı % 82,73 gibi yüksek bir değerde olmasına rağmen, AA ve PA miktarlarının reaksiyon karışımı içerisinde oldukça az bulunmuş olmalarının sebebinin, reaksiyon karışımı içerisinde oldukça yüksek miktarlarda olduğu tespit edilen (% 27,96 ve % 22,82) dihidroksi stearik asit (DSA) piklerinden **(Şekil 4.44.`**de 31,22 ve 32,64. dk`larda gözlenen pikler) kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Söz konusu bu piklerin oluşumu, OA`nın H_2O_2/H_2WO_4 varlığındaki oksidasyon işleminin gerçekleştiğinin (DSA oluşumu sebebiyle) fakat parçalanma işleminin tam olarak gerçekleşmediğinin göstergesi olarak kabul edilmiştir. Reaksiyon karışımındaki AA ve PA miktarlarının oldukça az olması da bu teoriyi doğrulamaktadır. Meydana gelen bu durumun sebebi tam olarak bilinmemekle birlikte, reaksiyon süresinin olması gerekenden biraz daha kısa tutulmasından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

Benzer şekilde, tez kapsamında elde edilen OA`nın (% 68,02) H_2O_2/H_2WO_4 varlığında oksidasyonu/parçalanması sonucu elde edilen kompleks karışıma (daha sonra X/sıcak su ile saflaştırma işlemine tabi tutulan) ait GC-MS kromatogramı verileri incelendiğinde **(Tablo 4.45.);** reaksiyon başlangıcında % 68,02 olan OA yüzdesinin, oksidasyon/parçalama işlemi sonunda % 9,10`ye düştüğü yani OA`nın % 86,62`lik kısmının reaksiyon sırasında parçalandığı görülmektedir. Söz konusu işlem sonunda açığa çıkması beklenen temel parçalanma ürünleri olan AA ve PA miktarları ise sırasıyla % 17,02 ve % 16,64 olarak tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlardan da görüleceği üzere; tez kapsamında elde edilmiş olan OA`nın parçalanma oranının (% 86,62), bir önceki deneyde kullanılan standart OA`nın parçalanmasına (% 82,73) kıyasla daha fazla olduğu görülmektedir. Aynı zamanda, bir önceki reaksiyon karışımında oldukça fazla miktarda oldukları tespit edilen DSA türüne ait pikler, bu deney sonunda elde edilen karışımda oldukça az miktarda gözlenmiştir (**Şekil 4.45.`**de 32,30 ve 32,79. dk`larda gözlenen % 3,13 ve % 0,39 değerine sahip pikler). Yukarıda belirtilen sebeplerle, tez kapsamında elde edilen OA`nın kullanılmasıyla gerçekleştirilen H_2O_2/H_2WO_4 varlığındaki oksidasyonu/parçalanma işleminin oldukça başarılı olduğu söylenebilir.

4.4.4.1. H_2O_2/H_2WO_4 kullanılarak elde edilen AA'nın $CHCl_3$/sıcak su ile saflaştırılma verimi

Standart OA`nın $H_2O_2/H_2WO_4$ varlığında oksidasyonu/parçalanması sonucu meydana gelen kompleks karışım, AA`nın saf olarak elde edilebilmesi için öncelikle sıcak su ile etkileştirilmiş, böylece karışımda AA`nın su fazına geçmesi sağlanmaya çalışılmıştır. Sıcak su ilavesinin ardından, elde edilen karışım hiç bekletilmeksizin kaba süzgeç kağıdı ile süzülmüş (sıcak süzme) ve suda çözünmeyen yağsı maddelerin süzgeç kağıdında kalması sağlanmıştır. Süzme işlemi sırasında süzüntü kısmına geçmeden süzgeç kağıdında kalmış olabilecek AA miktarının tespiti için, elde edilen yağlı kısım asidik ortamda BF_3 ile esterleştirildikten sonra GC-MS`de analiz edilmiştir. Sıcak su ilavesinden sonra gerçekleştirilen süzme işleminden elde edilen yağlı kısma ait GC-MS kromatogramı **Şekil 4.46.**`de, incelenen maddelere ilişkin pik bilgiler ise **Tablo 4.40.**`de verilmiştir.



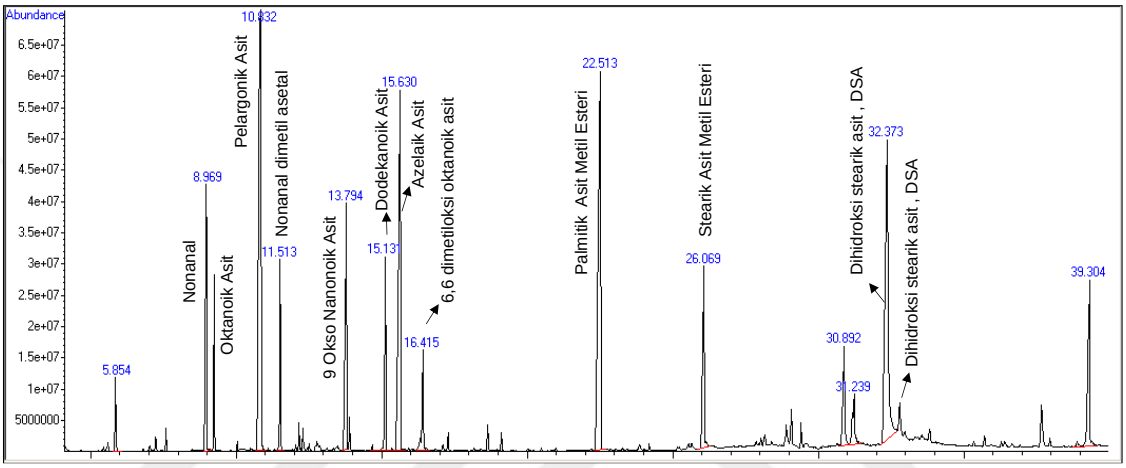
Şekil 4.46. OA (% 90,85) H_2O_2/H_2WO_4 Varlığında Oksidasyonu/Parçalanması İşleminde Sıcak Su İlavesi Sonrası Elde Edilen Karışımın Süzülmesi ile Süzgeç Kağıdında Kalan Yağlı Kısma Ait GC-MS Kromatogramı ($CHCl_3$ ve sıcak su ile saflaştırma prosedürünün uygulandığı deney)

Tablo 4.40. OA (% 90,85) H_2O_2/H_2WO_4 Varlığında Oksidasyonu/Parçalanması İşleminde Sıcak Su İlavesi Sonrası Elde Edilen Karışımın Süzülmesi ile Süzgeç Kağıdında Kalan Yağlı Kısma Ait GC-MS Kromatogram Verileri

Tür	Alıkonma Zamanı, t_R	Madde Miktarı (%)
Oleik Asit	25,56	1,17
Azelaik Asit	15,65	15,34
Pelargonik Asit	10,82	14,65

Tablo 4.40.`de yer alan verilerden de görüldüğü gibi; oldukça karmaşık bir yapı sergileyen yağlı kısım, % 15,34 gibi yüksek bir AA içeriğine sahiptir. Elde edilen bu sonuç, yapılan yıkama işlemlerinin, yağlı kısımda bulunan AA`nın tamamının

süzüntüye geçirilmesi için yeterli olmadığını ve oldukça fazla bir miktarın yağlı kısımda kaldığını göstermiştir. Bunun üzerine, süzgeç kağıdında kalan yağlı kalıntı, birkaç kez sıcak su ile yıkama işlemine tabii tutulmuş, ayrı bir kap içerisinde gerçekleştirilen yıkama işlemi sonrasında süzgeç kağıdında kalan katı kısım, gerçekleştirilen yıkama işleminin etkisinin tespit edilebilmesi için, BF3 ile esterleştirme prosedürü sonrası GC-MS`de analiz edilmiştir. Yağlı kısmın sıcak su ile yıkanması sonrası elde edilen katı kalıntıya ait GC-MS kromatogramı **Şekil 4.47.**`de, incelenen maddelere ilişkin pik bilgileri ise **Tablo 4.41**`de verilmiştir.



Şekil 4.47. OA (% 90,85) H_2O_2/H_2WO_4 Varlığında Oksidasyonu/Parçalanması İşleminde Elde Edilen Yağlı Kısmın Sıcak Su ile Yıkanması Sonrası Elde Edilen Katı Kalıntıya Ait GC-MS Kromatogramı ($CHCl_3$ ve sıcak su ile saflaştırma prosedürünün uygulandığı deney)

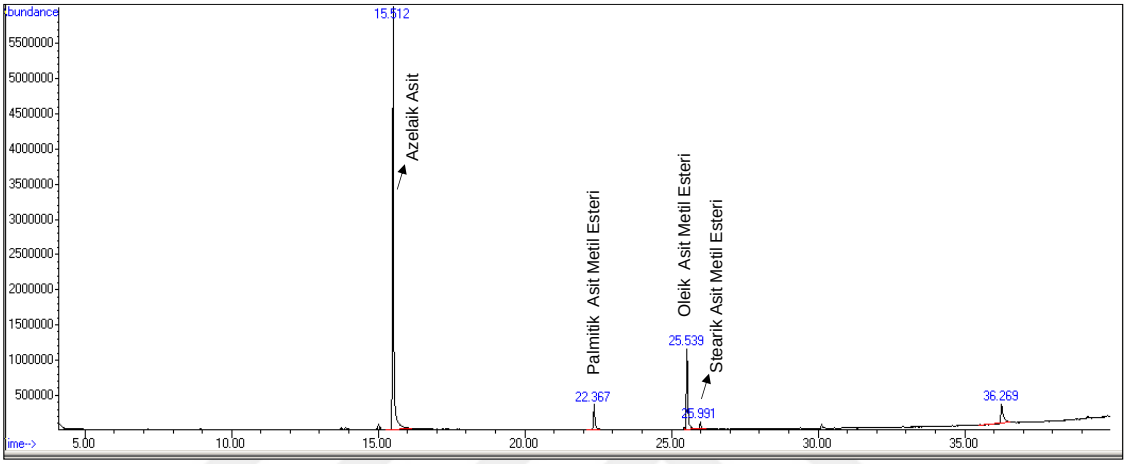
Tablo 4.41. OA (% 90,85) H_2O_2/H_2WO_4 Varlığında Oksidasyonu/Parçalanması İşleminde Elde Edilen Yağlı Kısmın Sıcak Su ile Yıkanması Sonrası Elde Edilen Katı Kalıntıya Ait GC-MS Kromatogram Verileri

Tür	Alıkonma Zamanı, t_R	Madde Miktarı (%)
Oleik Asit	-	-
Azelaik Asit	15,63	12,34
Pelargonik Asit	10,83	18,71

Gerçekleştirilen GC-MS analizleri sonunda elde edilen veriler (Tablo); yağlı kısmın sıcak su ile yıkanmasından sonra da hala AA (% 12,34) içerdiğini göstermiştir. Yıkama sonrası elde edilen kalıntıdaki PA miktarının (% 18,74) ise, yağlı kısımdakine kıyasla (% 14,65) bir miktar daha arttığı görülmüştür, söz konusu bu durumun PA`nın sıcak suda çözünmemiş olmasından kaynaklandığı sonucuna varılmıştır.

Süzme ve sıcak su ile yıkama işlemleri sonunda elde edilen süzüntü kısmında bulunan AA`nın saflaştırılma işlemlerine, $CHCl_3$ ilavesi ile gerçekleştirilen ekstraksiyon

işlemi ile devam edilmiştir (Shi ve ark., 2013). İşlem sonunda elde edilen ve yüksek miktarda AA içeriğine sahip olduğu düşünülen su fazı konsantre edilerek 1 gece +4 °C`de kristallenmeye bırakılmış ve oluşan çökelekler *(1. kademe AA)* süzülüp kurutulduktan sonra, asidik ortamda BF_3 ile esterleştirilerek GC-MS'de analiz edilmiştir. $CHCl_3$ ile ekstraksiyon işlemi sonrası ayrılan su fazından elde edilen beyaz renkli kristallere ait GC-MS kromatogramı **Şekil 4.48.**`de, incelenen maddelere ilişkin pik bilgiler ise **Tablo 4.42.**`de verilmiştir.



Şekil 4.48. OA`nın (% 90,85) H_2O_2/H_2WO_4 Varlığında Oksidasyonu/Parçalanması İşleminde $CHCl_3$ ile Ekstraksiyon İşlemi Sonrası Ayrılan Su Fazından Elde Edilen Beyaz Renkli Kristallere (1. Kademe AA) Ait GC-MS Kromatogramı

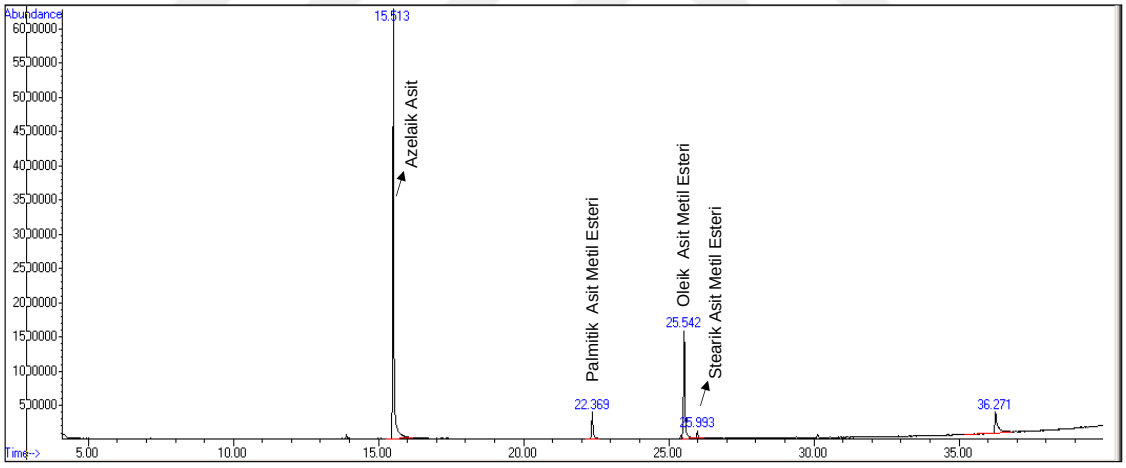
Tablo 4.42. OA`nın (% 90,85) H_2O_2/H_2WO_4 Varlığında Oksidasyonu/Parçalanması İşleminde $CHCl_3$ ile Ekstraksiyon İşlemi Sonrası Ayrılan Su Fazından Elde Edilen Beyaz Renkli Kristallere (1. Kademe AA) Ait GC-MS Kromatogram Verileri

Tür	Alıkonma Zamanı, t_R	Madde Miktarı (%)
Oleik Asit	25,54	15,10
Azelaik Asit	15,51	72,68
Pelargonik Asit	–	–

Tablo 4.42.`de yer alan verilerden de görüldüğü üzere; $CHCl_3$ ile ekstraksiyon işlemi sonrası ayrılan su fazından elde edilen beyaz renkli kristallerin yüksek saflık derecesine sahip AA kristalleri olduğu görülmüş (% 72,68), bununla birlikte kristal yapı içinde hala yüksek bir miktar OA`nın yer aldığı da (% 15,10) tespit edilmiştir. *1. kademe AA* içerisinde yer alan diğer türler ise alıkonma zamanları ile birlikte şöyle sıralanabilir; palmitik asit (22,36 dk) : % 5,28; stearik asit (25,99 dk): % 1,34; 9-oktadekanamit (36,27 dk): % 5,60.

OA`nın $H_2O_2/H_2WO_4$ varlığında oksidasyonu/parçalanması sonucu oluşan reaksiyon karışımı içerisindeki AA`nın, $CHCl_3$/sıcak su yardımıyla izole edilmesini kapsayan işlemler sonunda elde edilen AA kristalleri için verim düzeyinin hesaplanmasında; kullanılan OA ve elde edilen AA`nın miktarları & saflık dereceleri ve reaksiyondaki mol sayıları (1 mol OA`dan 1 mol AA oluşmuştur) dikkate alınmıştır. ~50 g OA (% 90,85)`nın kullanıldığı deneyler sonunda 0,9116 g *1. kademe AA* (%72,68) elde edilmesinden yola çıkılarak verim düzeyi % 2,19 olarak hesaplanmıştır.

Ayrıca; $CHCl_3$ ve sıcak su ile gerçekleştirilen ekstraksiyon işlemleri sonunda, her ne kadar AA`nın su fazında bulunması beklense de, işlemlerde söz konusu olabilecek kaçakların tespit edilebilmesi ve gerekli önlemlerin alınabilmesi bakımından, $CHCl_3$ fazı birkez daha sıcak su ile ekstraksiyona tabi tutulmuş ve bu işlemden elde edilen su fazı konsantre edilerek 1 gece +4 °C de birkez daha kristallendirme işlemi gerçekleştirilmiştir. Oluşan çökelekler *(2. kademe AA)* süzülüp kurutulduktan sonra, asidik ortamda BF_3 ile esterleştirilmiş ve GC-MS'de analiz edilmiştir. $CHCl_3$ fazının su ile 2. kez ile ekstraksiyonu işlemi sonrası elde edilen beyaz renkli kristallere ait GC-MS kromatogramı **Şekil 4.49.**`de, incelenen maddelere ilişkin pik bilgiler ise **Tablo 4.43**`de verilmiştir.



Şekil 4.49. OA`nın (% 90,85) H_2O_2/H_2WO_4 Varlığında Oksidasyonu/Parçalanması İşleminde $CHCl_3$ ile Ekstraksiyon İşlemi Sonrası Ayrılan $Chcl_3$ Fazından Elde Edilen Beyaz Renkli Kristallere (2. kademe AA) Ait GC-MS Kromatogramı

Tablo 4.43. OA`nın (% 90,85) H_2O_2/H_2WO_4 Varlığında Oksidasyonu/Parçalanması İşleminde $CHCl_3$ ile Ekstraksiyon İşlemi Sonrası Ayrılan $CHCl_3$ Fazından Elde Edilen Beyaz Renkli Kristallere (2. kademe AA) Ait GC-MS Kromatogram Verileri

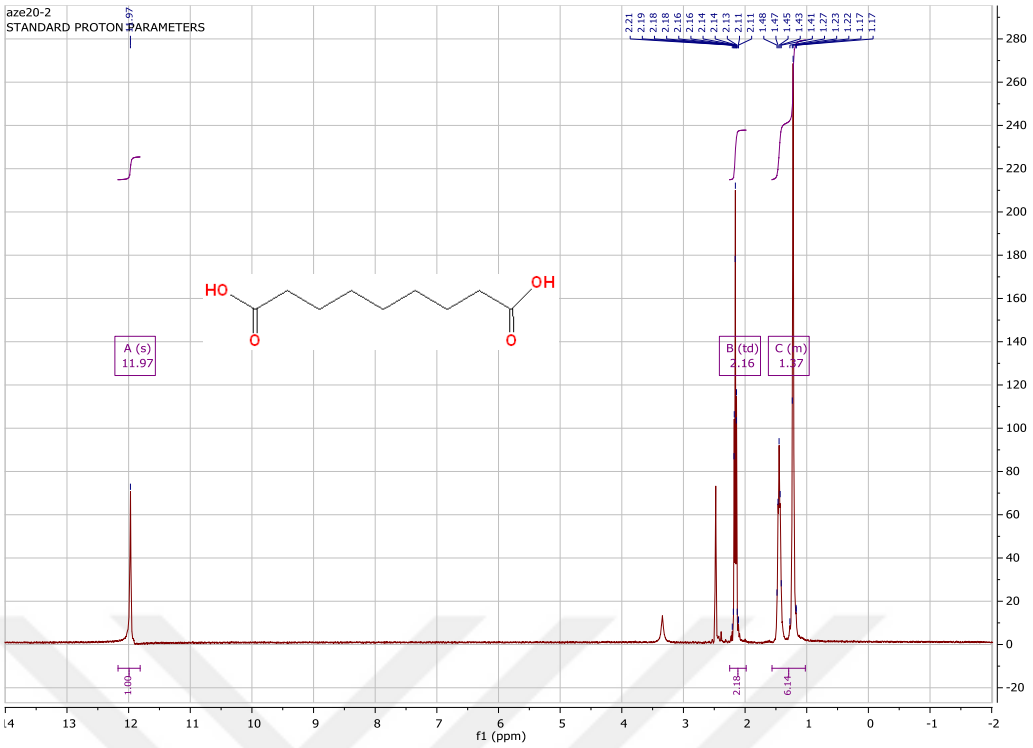
Tür	Alıkonma Zamanı, t_R	Madde Miktarı (%)
Oleik Asit	25,54	18,59
Azelaik Asit	15,51	67,77
Pelargonik Asit	–	–

Tablo 4.43.`de yer alan veriler; $CHCl_3$ ile ekstraksiyon işlemi sonrası ayrılan $CHCl_3$ fazında hala yüksek miktarda AA bulunduğunu göstermiştir (% 67,77). Bununla birlikte kristal yapı içinde hala yüksek bir miktar OA`nın yer aldığı da (% 18,59) tespit edilmiştir. *2. kademe AA* içerisinde yer alan diğer türler ise alıkonma zamanları ile birlikte şöyle sıralanabilir; palmitik asit (22,37 dk) : % 5,32 ; stearik asit (25,99 dk): % 1,39 ; 9-oktadekanamit (36,27 dk): % 6,93.

1. kademe AA eldesi sırasında ayrılan $CHCl_3$ fazının, birkez daha sıcak su ile ekstrakte edilmesi ve ekstraksiyon işleminden elde edilen su fazının kristallendirilmesi ile oluşan *2. kademe AA* için verim düzeyi; ~50 g OA (% 90,85)`nın kullanılması ve deney sonunda 0,4418 g AA (% 67,77) elde edilmesinden yola çıkılarak % 0,99 olarak hesaplanmıştır.

Sonuç olarak; OA`nın $H_2O_2/H_2WO_4$ varlığında oksidasyonu/parçalanması sonucu meydana gelen kompleks karışım içerisinden, AA`nın $CHCl_3$ ve sıcak su ile saflaştırılarak elde edilmesine yönelik gerçekleştirilen çalışmalarda, su fazından beklendiği gibi yüksek saflıkta AA elde edilebilmiş fakat büyük bir kısım AA`nın da $CHCl_3$ fazına kaçtığı görülmüştür. Bu sebeple; $CHCl_3$ yerine, reaksiyon sonunda elde edilen karışım içerisinde yer alan maddeleri çözme gücüne sahip olan (AA dışındaki maddeler) fakat AA`yı çözmeyerek sadece su fazında kalmasını sağlayan başka bir çözücü seçiminin yapılması gerektiğine karar verilmiştir.

4.4.4.1.1. $CHCl_3$ kullanılarak saflaştırılan AA`nın NMR yöntemi ile karakterizasyonu** OA`nın H_2O_2/H_2WO_4 varlığında oksidasyonu/parçalanması ve sonrasında $CHCl_3$ ve sıcak su ile saflaştırılması prosedüründen elde edilen beyaz renkli kristallere *(1. kademe AA)* ait ^{1}H-NMR spektrumu **Şekil 4.50.`de yer almaktadır.

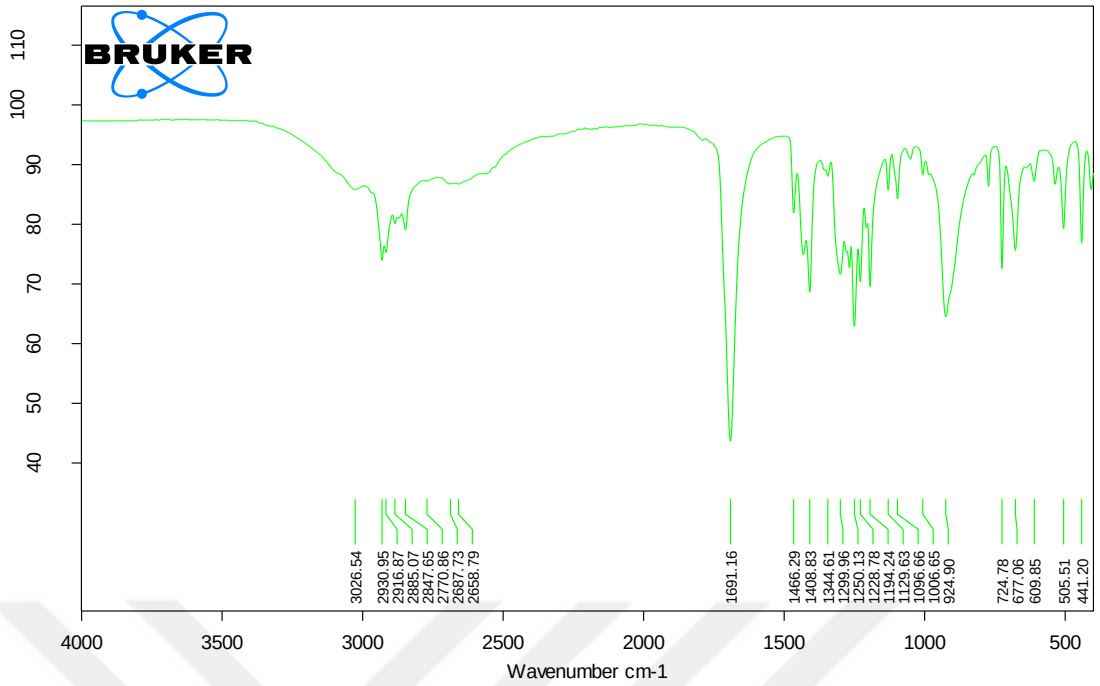


Şekil 4.50. OA`nın H_2O_2/H_2WO_4 Varlığında Oksidasyonu/Parçalanması ve $CHCl_3$ ve Sıcak Su İle Saflaştırılması Prosedüründen Elde Edilen Katı Maddeye Ait ^{1}H-NMR Spektrumu.

^{1}H-NMR (400 MHz DMSO): δ 1.37 ppm (dt, 10H,(C**H**$_2$-)$_5$CH_2-COOH), 2.16 (td, 4H, C**H**$_2$-COOH), 11.97 (s, 2H, -COO**H**). M_A: 188.22 g/mol, $C_9H_{16}O_4$

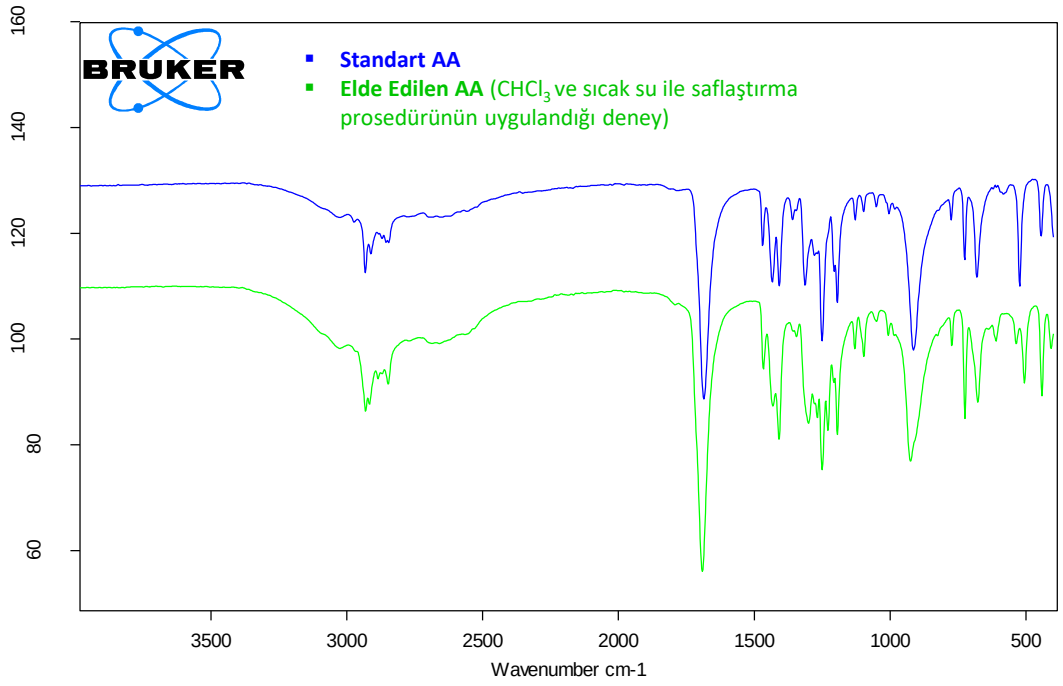
Şekil 4.50.`de yer alan $^1$H-NMR spektrumu incelendiğinde; 1.37 ppm`de karbonil karbonuna komşu (C**H**$_2$- CH_2-COOH) -CH_2- ye komşu 5 adet -CH_2- ait 10H, 2.16 ppm`de karbonik karbonuna komşu 2 adet -C$H_2$- ye ait 4H (C**H**$_2$-COOH) ve 11.97 ppm`de karboksilik aside ait 2H (-COO**H**) yer aldığı görülmüştür. Elde edilen madde spektrumu, standart AA`ya ait 1H-NMR spektrumu ile karşılaştırıldığında ise; her iki madde için de aynı spektrum görüntülerinin elde edildiği tespit edilmiş, bu sebeple söz konusu prosedür sonunda elde edilen maddenin saf AA olduğuna karar verilmiştir.

4.4.4.1.2. $CHCl_3$ kullanılarak saflaştırılan AA`nın FT-IR yöntemi ile karakterizasyonu** OA`nın H_2O_2/H_2WO_4 varlığında oksidasyonu/parçalanması ve sonrasında $CHCl_3$ ve sıcak su ile saflaştırılması prosedüründen elde edilen beyaz renkli kristallere *(1. kademe AA)* ait ATR tekniği kullanılarak alınmış FT-IR spektrumu **Şekil 4.51.`de yer almaktadır.



Şekil 4.51. OA H_2O_2/H_2WO_4 Varlığında Oksidasyonu/Parçalanması ve $CHCl_3$ ve Sıcak Su ile Saflaştırılması Prosedüründen Elde Edilen Katı Maddeye Ait FT-IR Spektrumu

Şekil 4.51.`de yer alan FT-IR spektrumu incelendiğinde; 3026-3200 $cm^{-1}$ arasında –OH bağı geriliminden kaynaklanan yoğun bir bandın, 2931-2885 $cm^{-1}$`de CH_2 gruplarına ait C-H titreşim bandının, 1691 cm^{-1}`de karbonil grubuna ait C=O titreşim bandının, 1468-1300 $cm^{-1}$ aralığında ise C-C ve C-O titreşim bantlarının yer aldığı görülmektedir. İlgili prosedür sonunda elde edilen maddeye ait FT-IR spektrumunun, standart AA spektrumununki ile karşılaştırılması ise **Şekil 4.31.**`de verilmiştir.



Şekil 4.52. OA`nın $H_2O_2/H_2WO_4$ Varlığında Oksidasyonu/Parçalanması ve $CHCl_3$ ve Sıcak Su ile Saflaştırılması Prosedüründen Elde Edilen Katı Madde ve Standart AA`ya ait FT-IR Spektrumlarının Karşılaştırılması

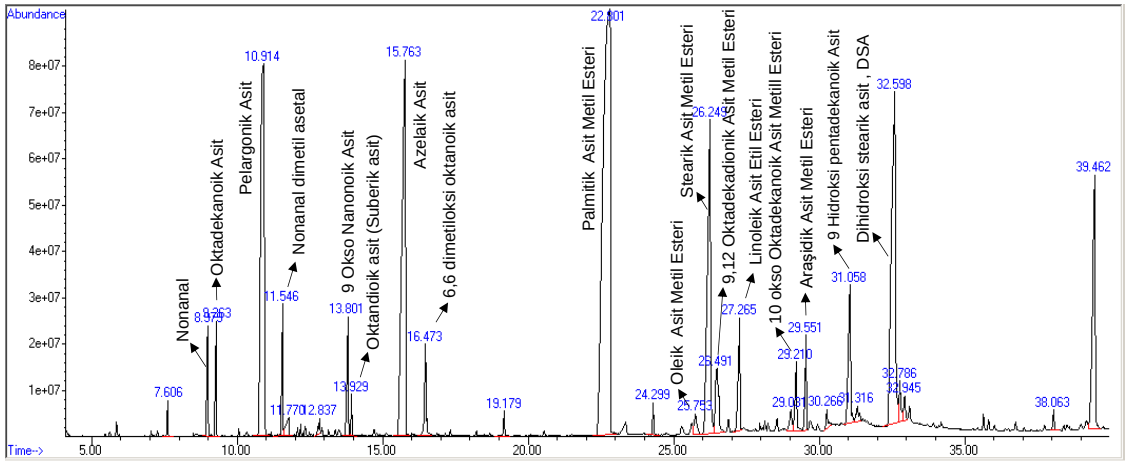
Karşılaştırma amacıyla üst üste getirilen FT-IR spektrumlarından da görüleceği üzere, ilgili prosedür sonunda elde edilen madde, standart AA ile aynı FT-IR spektrumu görüntüsüne sahiptir. Bu sebeple, yüksek saflıkta AA eldesi için uygulanan $CHCl_3$ ve sıcak su ile saflaştırma prosedürünün, istenilen amaca ulaşılması noktasında oldukça verimli olduğu söylenilebilir.

4.4.4.2. H_2O_2/H_2WO_4 kullanılarak elde edilen AA'nın X/sıcak su (patentlendirilecek metoda ait çözücü) ile saflaştırılma verimi

Oleik asidin oksidasyonu/parçalanması işleminden sonra, kompleks karışım içerisindeki AA`nın izolasyonu amacıyla gerçekleştirilen saflaştırma basamağında yer alan çözücü/çözücü karışımı tarafımızdan ilk kez kullanılmış olup, literatürde kullanımı mevcut olmayan ve oldukça verimli sonuçlar elde edilmesini sağlayan bu metot için patent başvurusunda bulunulması düşünülmektedir. Bu sebeple, söz konusu bu prosedürün saflaştırma basamağında kullanılan çözücü ve/veya çözücü karışımları **"X"** olarak ifade edilmiştir.

Tez kapsamında elde edilen OA`nın (% 68,02) H_2O_2/H_2WO_4 varlığında oksidasyonu/parçalanması sonucu elde edilen kompleks karışımın (daha sonra X/sıcak su ile saflaştırma işlemine tabi tutulan), asidik ortamda BF3 ile esterleştirilmesi sonrası gerçekleştirilen GC-MS analizine ait kromatogram ve analiz verileri **Bölüm. 4.4.4.** `de verilmiştir **(bkz. Şekil 4.45. ve Tablo 4.39.).**

AA ve PA miktarları ise sırasıyla % 15,69 ve % 16,64 olarak tespit edildiği GC-MS analiz çalışmalarından sonra, karışım içindeki AA`nın saf olarak elde edilmesi çalışmalarına geçilmiş ve karışım, AA`nın çözünürlüğünün en fazla olduğu madde olan sıcak su ile etkileştirilerek, karışım içerisindeki AA`nın su fazına geçmesi sağlanmaya çalışılmıştır. Sıcak su ilavesinin ardından, elde edilen karışım hiç beklenmeksizin kaba süzgeç kağıdı ile süzülmüş (sıcak süzme) ve suda çözünmeyen yağsı maddelerin süzgeç kağıdında kalması sağlanmıştır. Süzme işlemi sırasında süzüntü kısmına geçmeden süzgeç kağıdında kalmış olabilecek AA miktarının tespiti için, süzme işleminden elde edilen elde edilen yağlı kısım asidik ortamda BF_3 ile esterleştirildikten sonra GC-MS`de analiz edilmiştir. Sıcak su ilavesinden sonra gerçekleştirilen süzme işleminde elde edilen yağlı kısma ait GC-MS kromatogramları **Şekil 4.53.**`de, incelenen maddelere ilişkin pik bilgileri ise **Tablo 4.44.**`de sunulmuştur.

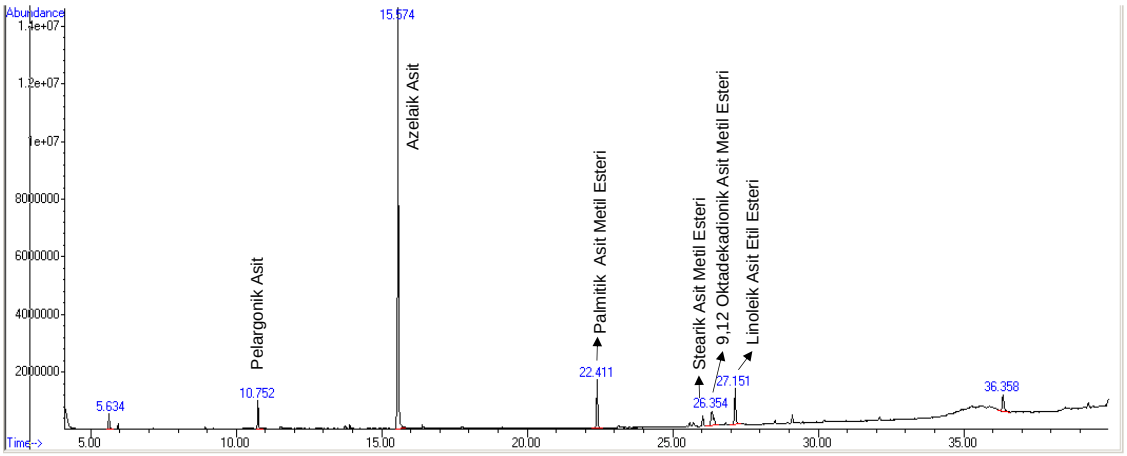


Şekil 4.53. OA (% 68,02) H_2O_2/H_2WO_4 Varlığında Oksidasyonu/Parçalanması İşleminde Sıcak Su İlavesi Sonrası Elde Edilen Karışımın Süzülmesi ile Süzgeç Kağıdında Kalan Yağlı Kısma Ait GC-MS Kromatogramı (X/sıcak su ile saflaştırma prosedürünün uygulandığı deney)

Tablo 4.44. OA (% 68,02) H_2O_2/H_2WO_4 Varlığında Oksidasyonu/Parçalanması İşleminde Sıcak Su İlavesi Sonrası Elde Edilen Karışımın Süzülmesi ile Süzgeç Kağıdında Kalan Yağlı Kısma Ait GC-MS Kromatogram Verileri (X/sıcak su ile saflaştırma prosedürünün uygulandığı deney)

Tür	Alıkonma Zamanı, t_R	Madde Miktarı (%)
Oleik Asit	26,25	8,93
Azelaik Asit	15,76	11,43
Pelargonik Asit	10,91	13,29

Tablo 4.44. ` de yer alan verilerden de görüldüğü üzere; oldukça karmaşık bir yapı sergileyen yağlı kısım, % 11,43 gibi yüksek bir AA içeriğine sahiptir. Elde edilen bu sonuç, sıcak su ilavesi sonrası gerçekleştirilen süzme işlemi sırasında, karışım içerinde yer alan AA`nın tamamının süzüntüye geçmediğini, belli bir kısmının süzgeç kağıdındaki yağlı kısımda kaldığını göstermiştir. Bunun üzerine, süzgeç kağıdında kalan yağlı kalıntı, birkaç kez sıcak su ile yıkama işlemine tabii tutulmuş, ayrı bir kap içerisinde gerçekleştirilen yıkama işlemi sonrasında elde edilen süzüntü kısmı, gerçekleştirilen yıkama işleminin etkisinin tespit edilebilmesi için, BF_3 ile esterleştirme prosedürü sonrası GC-MS`de analiz edilmiştir. Yağlı kısmın sıcak su ile yıkanması sonrası elde edilen süzüntü kısmına ait GC-MS kromatogramı **Şekil 4.54.** `de, incelenen maddelere ilişkin pik bilgileri ise **Tablo 4.45.**`de verilmiştir.



Şekil 4.54. OA (% 68,02) H_2O_2/H_2WO_4 Varlığında Oksidasyonu/Parçalanması İşleminde Elde Edilen Yağlı Kısmın Sıcak Su ile Yıkanması Sonrası Elde Edilen Süzüntü Kısmına Ait GC-MS Kromatogramı (X/sıcak su ile saflaştırma prosedürünün uygulandığı deney)

Tablo 4.45. OA`nın (% 68,02) H_2O_2/H_2WO_4 Varlığında Oksidasyonu/Parçalanması İşleminde Elde Edilen Yağlı Kısmın Sıcak Su ile Yıkanması Sonrası Elde Edilen Süzüntü Kısmına Ait GC-MS Kromatogram Verileri (X/sıcak su ile saflaştırma prosedürünün uygulandığı deney)

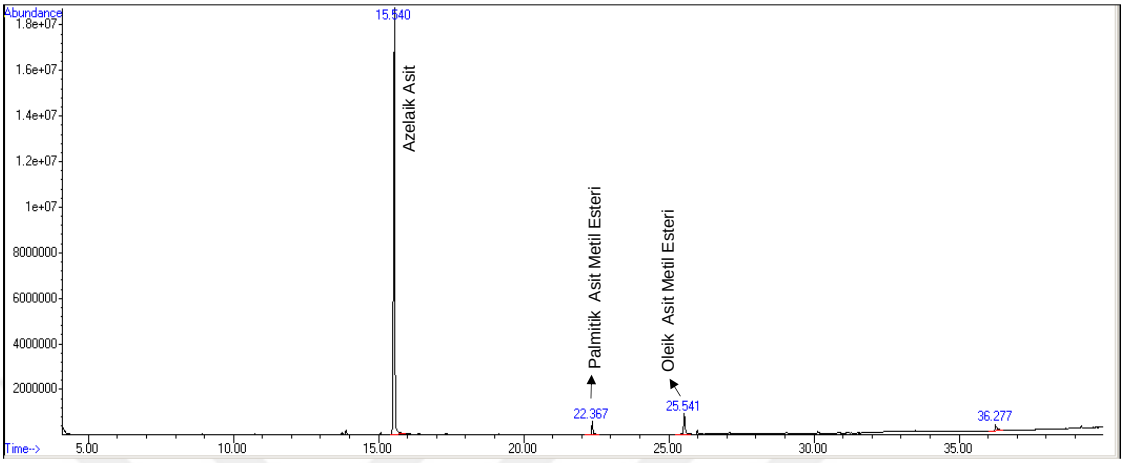
Tür	Alıkonma Zamanı, t_R	Madde Miktarı (%)
Oleik Asit	–	–
Azelaik Asit	15,56	85,19
Pelargonik Asit	10,73	1,30

Gerçekleştirilen GC-MS analizleri sonunda elde edilen veriler **(Tablo 4.45.)**; yağlı kısımda hala belli bir miktar AA bulunduğunu göstermiş, sıcak su ile gerçekleştirilen yıkama işlemi sayesinde de, AA`nın bir kısmı yüksek bir saflıkla (% 85,19) yağlı kısımdan geri kazanılabilmiştir.

Sonuç olarak; oksidasyon/parçalama işlemleri sonunda yüksek bir verim ve saflıkta elde edilmesi beklenilen AA`nın, kompleks karışım içerisinden oldukça yüksek bir saflıkta elde edilebildiği, ancak kullanılan çözücülerin AA ve diğer türleri ayırmada göstermiş oldukları beklenmeyen etkiler sebebiyle AA miktarında kayıplar meydana geldiği görülmüştür. İlgili prosedürlerdeki deneysel faktörler üzerinde yapılacak düzenlemeler ile ileriki çalışmalarda AA verimin artırılabileceği düşünülmektedir.

Oksidasyon/parçalama işleminden elde edilen kompleks karışım üzerine sıcak su ilave edilmesinin ardından gerçekleştirilen süzme işlemi sonunda elde edilen süzüntü kısmında (sulu faz) yüksek miktarda olduğu düşünülen AA`nın saflaştırılma işlemlerine ise, süzüntü kısmına X ilave edilmesi ile devam edilmiştir. Gerçekleştirilen ekstraksiyon işlemi sonunda elde edilen su fazı konsantre edilerek 1 gece +4 °C de kristallenmeye

bırakılmış ve oluşan çökelekler süzülüp kurutulduktan sonra, asidik ortamda BF_3 ile esterleştirilerek GC-MS'de analiz edilmiştir. $CHCl_3$ ile ekstraksiyon işlemi sonrası ayrılan su fazından elde edilen beyaz renkli kristallere ait GC-MS kromatogramı **Şekil 4.55.**`de, incelenen maddelere ilişkin pik bilgiler ise **Tablo 4.46.** `de verilmiştir.



Şekil 4.55. OA`nın (% 68,02) H_2O_2/H_2WO_4 Varlığında Oksidasyonu/Parçalanması İşleminde X ile Ekstraksiyon İşlemi Sonrası Ayrılan Su Fazından Elde Edilen Beyaz Renkli Kristallere Ait GC-MS Kromatogramı (X/sıcak su ile saflaştırma prosedürünün uygulandığı deney-1)

Tablo 4.46. OA`nın (% 68,02) H_2O_2/H_2WO_4 Varlığında Oksidasyonu/Parçalanması İşleminde X ile Ekstraksiyon İşlemi Sonrası Ayrılan Su Fazından Elde Edilen Beyaz Renkli Kristallere Ait GC-MS Kromatogram Verileri (X/sıcak su ile saflaştırma prosedürünün uygulandığı deney-1)

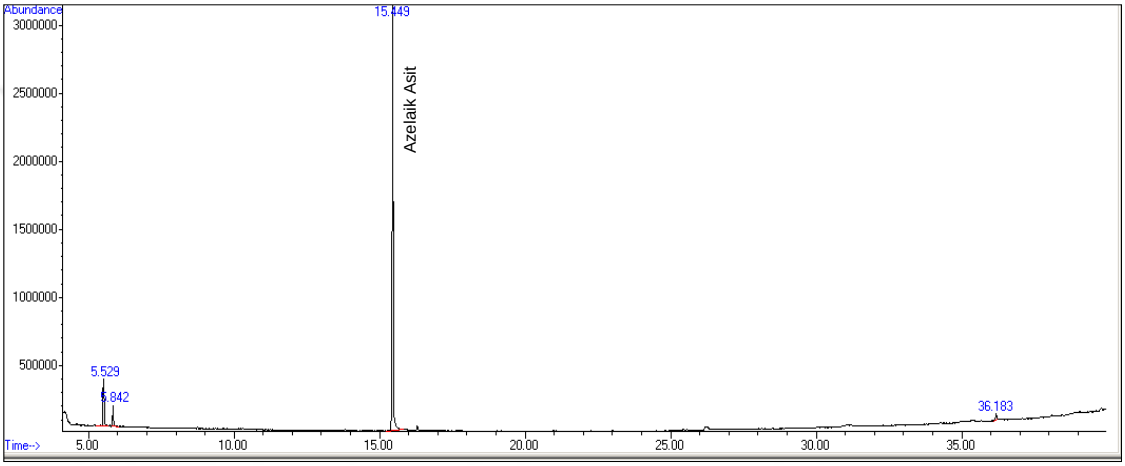
Tür	Alıkonma Zamanı, t_R	Madde Miktarı (%)
Oleik Asit	25,54	5,03
Azelaik Asit	15,54	89,34
Pelargonik Asit	–	–

Tablo 4.46.`de yer alan verilerden de görüldüğü üzere; X ile gerçekleştirilen ekstraksiyon işlemi sonrası ayrılan su fazından elde edilen beyaz renkli kristallerin yüksek saflık derecesine sahip AA kristalleri olduğu görülmüş (% 89,34), bununla birlikte kristal yapı içinde az da olsa bir miktar OA`nın yer aldığı da tespit edilmiştir (% 5,03). Elde edilen AA içerisinde yer alan diğer türler ise alıkonma zamanları ile birlikte şöyle sıralanabilir; palmitik asit (22,37 dk) : % 3,14 ; 9-oktadekanamit (36,28 dk): % 2,49.

OA`nın $H_2O_2/H_2WO_4$ varlığında oksidasyonu/parçalanması sonucu oluşan reaksiyon karışımı içerisindeki AA`nın, X/sıcak su yardımıyla izole edilmesini kapsayan işlemler sonunda elde edilen AA kristalleri için verim düzeyinin hesaplanmasında; kullanılan OA ve elde edilen AA`nın miktarları & saflık dereceleri ve

reaksiyondaki mol sayıları (1 mol OA`dan 1 mol AA oluşmuştur) dikkate alınmıştır. ~67 g OA (% 68,02)`nın kullanıldığı deneyler sonunda 4,2375 g AA (%89,34) elde edilmesinden yola çıkılarak verim düzeyi % 12,50 olarak hesaplanmıştır.

Saf AA`nın elde edilmesi için gerçekleştirilen oksidasyon/parçalama ve saflaştırma işlemlerine ait basamaklar, prosedürün kesinliğini göstermek amacıyla birkaç kez daha tekrarlanmış ve yine oldukça yüksek saflıkta AA eldesi sağlanmıştır. Gerçekleştirilen 2 farklı tekrar prosedüründen elde edilen saf AA kristallerine ait GC-MS kromatogramları **Şekil 4.56.** ve **Şekil 4.57.**`de, incelenen maddelere ilişkin pik bilgiler ise **Tablo 4.47.** ve **Tablo 4.48.**`de verilmiştir.



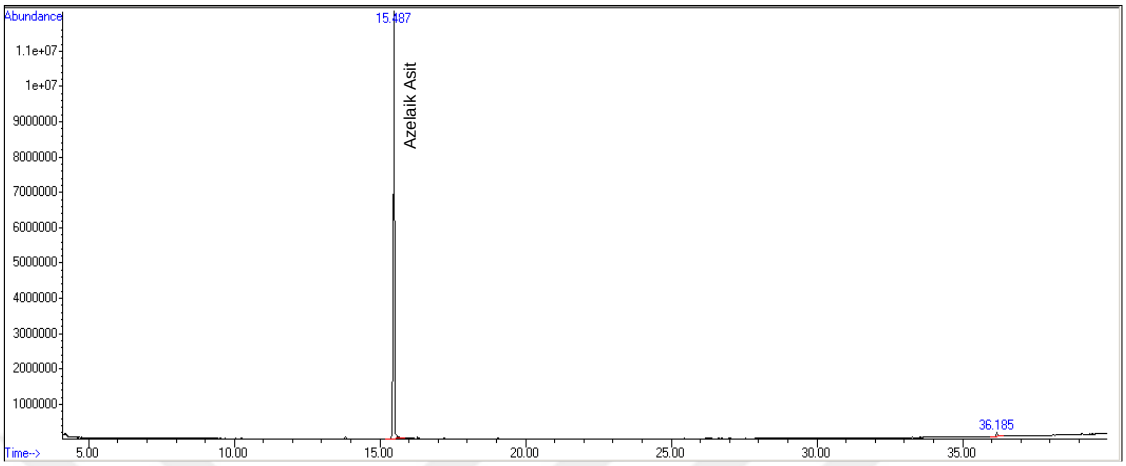
Şekil 4.56. OA`nın (% 68,02) H_2O_2/H_2WO_4 Varlığında Oksidasyonu/Parçalanması İşleminde X ile Ekstraksiyon İşlemi Sonrası Ayrılan Su Fazından Elde Edilen Beyaz Renkli Kristallere Ait GC-MS Kromatogramı (X/sıcak su ile saflaştırma prosedürünün uygulandığı deney-2)

Tablo 4.47. OA`nın (% 68,02) H_2O_2/H_2WO_4 Varlığında Oksidasyonu/Parçalanması İşleminde X ile Ekstraksiyon İşlemi Sonrası Ayrılan Su Fazından Elde Edilen Beyaz Renkli Kristallere Ait GC-MS Kromatogram Verileri (X ve sıcak su ile saflaştırma prosedürünün uygulandığı deney-2)

Tür	Alıkonma Zamanı, t_R	Madde Miktarı (%)
Oleik Asit	–	–
Azelaik Asit	15,45	83,03
Pelargonik Asit	–	–

Tablo 4.47. `de yer alan verilerden de görüldüğü üzere; X/sıcak su ile saflaştırma prosedürünün uygulandığı *2. tekrar deney*den elde edilen AA kristallerinin de yüksek bir saflık derecesine sahip olduğu görülmüş (% 83,03), ayrıca kristal yapı içinde hiç OA`nın bulunmadığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte, elde edilen AA kristalleri içerisinde farklı yapıda iki türe rastlanmıştır; 2-hekzanon (5,53 dk): % 12,02 ; pentanal (5,84 dk): % 3,28 ; 9-oktadekanamit (36,18 dk): % 1,68.

*2. tekrar deney*den elde edilen AA kristalleri için verim düzeyi; ~100 g OA (% 68,02)`nın kullanıldığı deneyler sonunda 5,5023 g AA (% 83,03) elde edilmesinden yola çıkılarak verim düzeyi % 10,50 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.57. OA`nın (% 63,50) H_2O_2/H_2WO_4 Varlığında Oksidasyonu/Parçalanması İşleminde X ile Ekstraksiyon İşlemi Sonrası Ayrılan Su Fazından Elde Edilen Beyaz Renkli Kristallere Ait GC-MS Kromatogramı (X/sıcak su ile saflaştırma prosedürünün uygulandığı deney-3)

Tablo 4.48. OA`nın (% 63,50) H_2O_2/H_2WO_4 Varlığında Oksidasyonu/Parçalanması İşleminde X ile Ekstraksiyon İşlemi Sonrası Ayrılan Su Fazından Elde Edilen Beyaz Renkli Kristallere Ait GC-MS Kromatogram Verileri (X/sıcak su ile saflaştırma prosedürünün uygulandığı deney-3)

Tür	Alıkonma Zamanı, t_R	Madde Miktarı (%)
Oleik Asit	–	–
Azelaik Asit	15,49	98,73
Pelargonik Asit	–	–

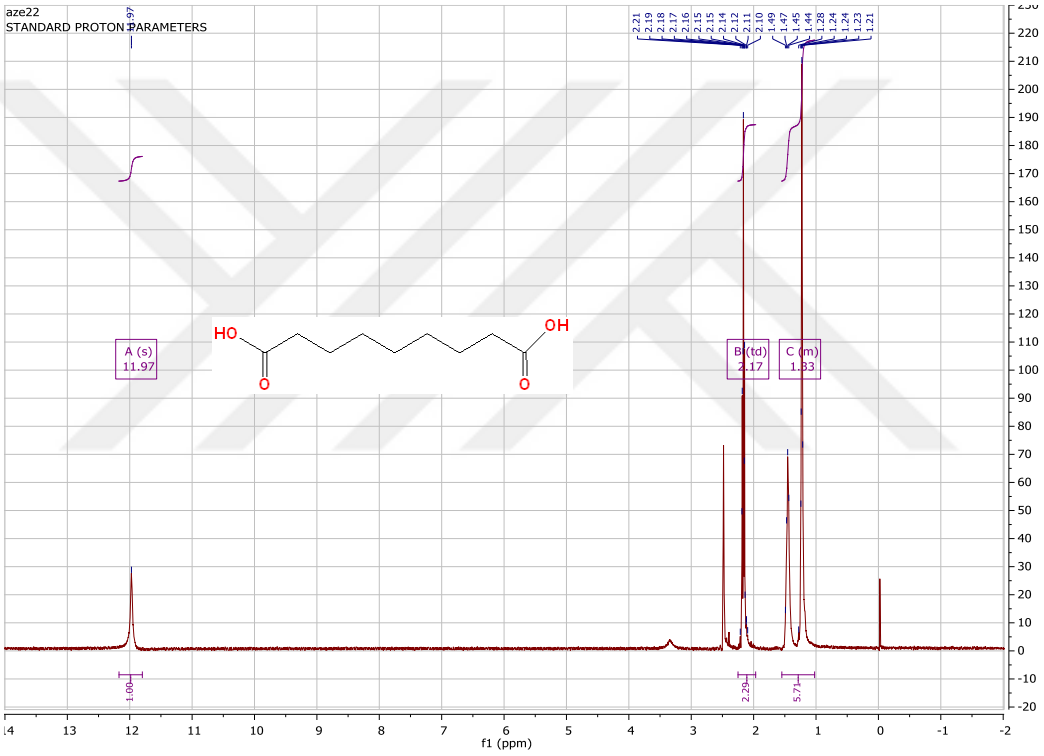
Tablo 4.48.`de yer alan verilerden de görüldüğü üzere; X/sıcak su ile saflaştırma prosedürünün uygulandığı *3. tekrar deney*den elde edilen AA kristallerinin en yüksek saflık derecesine sahip olduğu görülmüş (% 98,73), ayrıca kristal yapı içinde hiç OA`nın bulunmadığı tespit edilmiştir. Elde edilen kristaller içerisinde, AA`nın yanı sıra sadece tek bir türün yer aldığı tespit edilmiştir; 9-oktadekanamit (36,18 dk): % 1,27.

*3. tekrar deney*den elde edilen AA kristalleri için verim düzeyi; ~200 g OA (% 63,50)`nın kullanıldığı deneyler sonunda 7,9597 g AA (% 98,73) elde edilmesinden yola çıkılarak verim düzeyi % 9,28 olarak hesaplanmıştır.

Özet olarak; tez kapsamında elde edilen OA`ların, H_2O_2/H_2WO_4 varlığında oksidasyonu/parçalanması sonucu AA elde edilmesini amaçlayan 3 tekrarlı deneylerden (daha sonra X/sıcak su ile saflaştırma işlemine tabi tutulan); ***1. deney***den elde edilen AA için % verim düzeyi % 12,50 (% 89,34 saflık derecesine sahip); ***2. tekrar deney***den elde

edilen AA için verim düzeyi % 10,50 (% 83,03 saflık derecesine sahip); ***3. tekrar deney***den elde edilen AA için % verim düzeyi % 9,28 (% 98,73 saflık derecesine sahip) olduğu tespit edilmiş olup, sonuçlar arasında gözlenen bu farklılığın, deneysel hatalardan kaynaklı olabileceği düşünülmektedir.

4.4.4.2.1. X/sıcak su kullanılarak saflaştırılan AA`nın NMR yöntemi ile karakterizasyonu** OA`nın (% 68,02) H_2O_2/H_2WO_4 varlığında oksidasyonu/parçalanması ve sonrasında X/sıcak su ile saflaştırılması prosedüründen *(Deney-1)* elde edilen beyaz renkli kristallere ait ^{1}H-NMR spektrumu **Şekil 4.58.`de yer almaktadır.



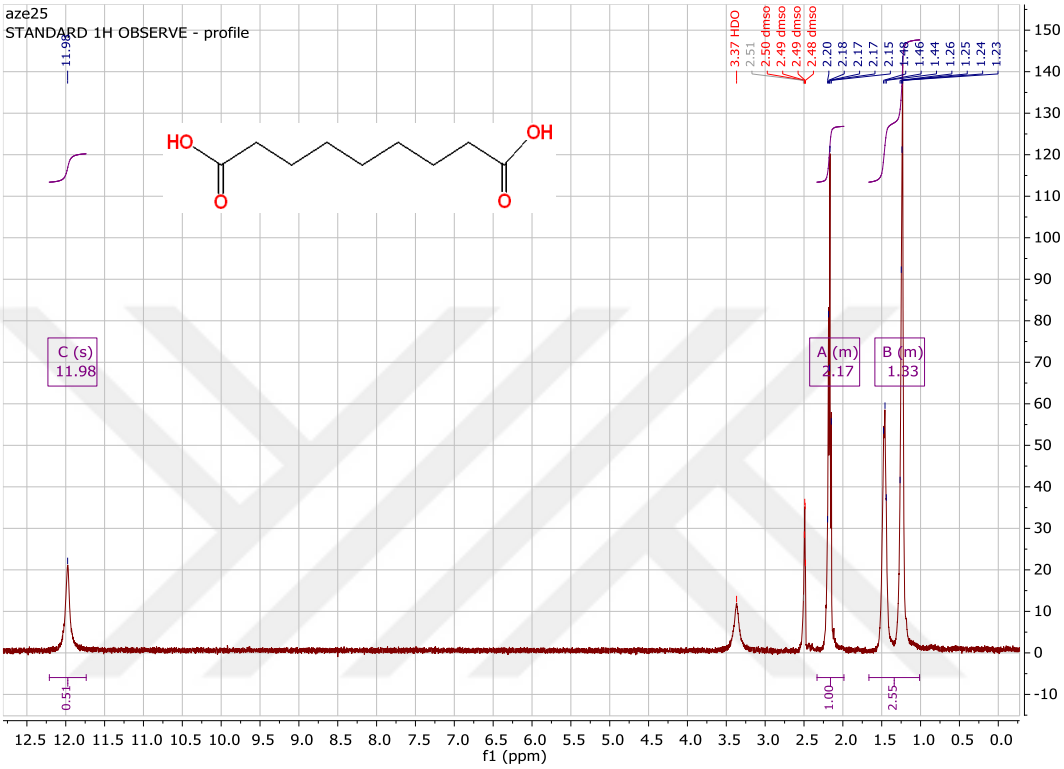
Şekil 4.58. OA`nın (% 68,02) H_2O_2/H_2WO_4 Varlığında Oksidasyonu/Parçalanması ve X/sıcak Su İle Saflaştırılması Prosedüründen Elde Edilen Katı Maddeye Ait ^{1}H-NMR Spektrumu.

^{1}H-NMR (400 MHz DMSO): δ 1.33 ppm (dt, 10H,(C**H**$_2$-)$_5$CH_2-COOH), 2.17 (td, 4H, C**H**$_2$-COOH), 11.97 (s, 2H, -COO**H**). M_A: 188.22 g/mol, $C_9H_{16}O_4$

Şekil 4.58.`de yer alan $^1$H-NMR spektrumu incelendiğinde; 1.33 ppm`de karbonil karbonuna komşu (C**H**$_2$- CH_2-COOH) -CH_2- ye komşu 5 adet -CH_2- ait 10H, 2.17 ppm`de karbonik karbonuna komşu 2 adet -C$H_2$- ye ait 4H (C**H**$_2$-COOH) ve 11.97 ppm`de karboksilik aside ait 2H (-COO**H**) yer aldığı görülmüştür. Elde edilen madde spektrumu, standart AA`ya ait ^{1}H-NMR spektrumu ile karşılaştırıldığında ise; her iki

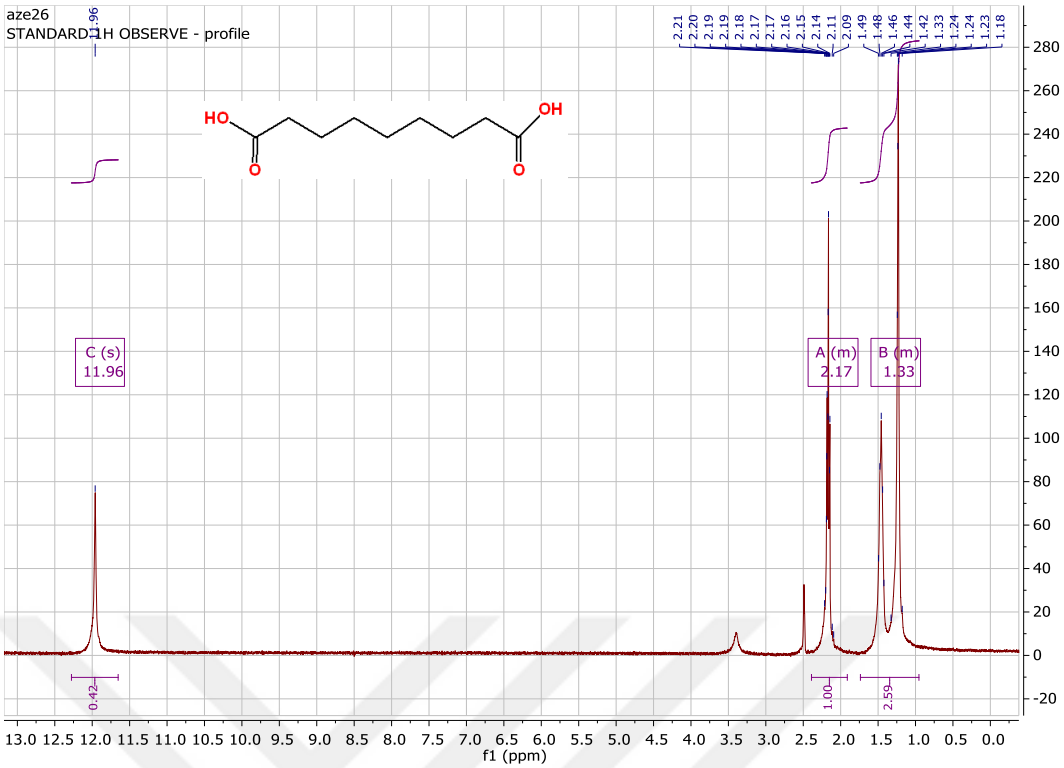
madde için de aynı spektrum görüntülerinin elde edildiği tespit edilmiş, bu sebeple söz konusu prosedür sonunda elde edilen maddenin saf AA olduğuna karar verilmiştir.

2. ve 3 tekrar deneyleri olarak aynı şartlarda gerçekleştirilen deneyler sonunda elde edilen kristallerin de, yüksek saflıkta AA olduklarını gösterir ^{1}H-NMR spektrumları gözlenmiştir (**Şekil 4.59**. ve **Şekil 4.60.)**.



Şekil 4.59. OA`nın (% 68,02) H_2O_2/H_2WO_4 Varlığında Oksidasyonu/Parçalanması ve X/Sıcak Su İle Saflaştırılması Prosedüründen Elde Edilen Katı Maddeye Ait ^{1}H-NMR Spektrumu *(2. tekrar deney)*.

^{1}H-NMR (400 MHz DMSO): δ 1.33 ppm (dt, 10H,(C**H**$_2$-)$_5$CH_2-COOH), 2.17 (td, 4H, C**H**$_2$-COOH), 11.98 (s, 2H, -COO**H**). M_A: 188.22 g/mol, $C_9H_{16}O_4$

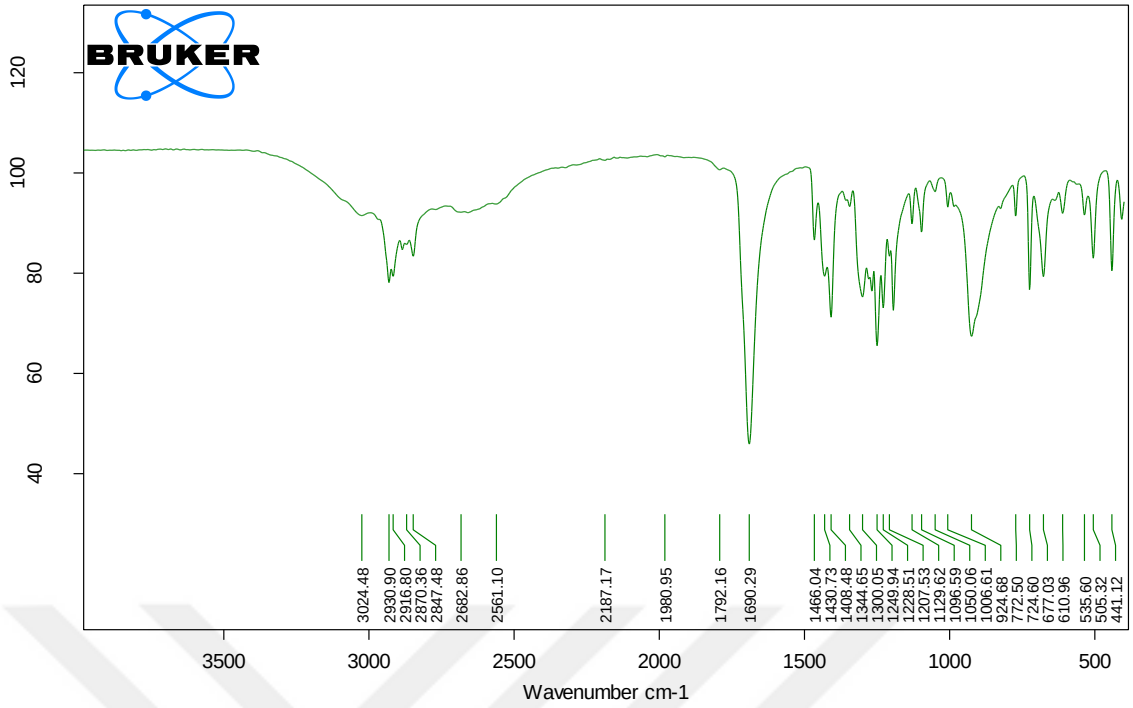


Şekil 4.60. OA`nın (% 63,50) H_2O_2/H_2WO_4 Varlığında Oksidasyonu/Parçalanması ve X/Sıcak Su İle Saflaştırılması Prosedüründen Elde Edilen Katı Maddeye Ait ^{1}H-NMR Spektrumu *(3. tekrar deney)*.

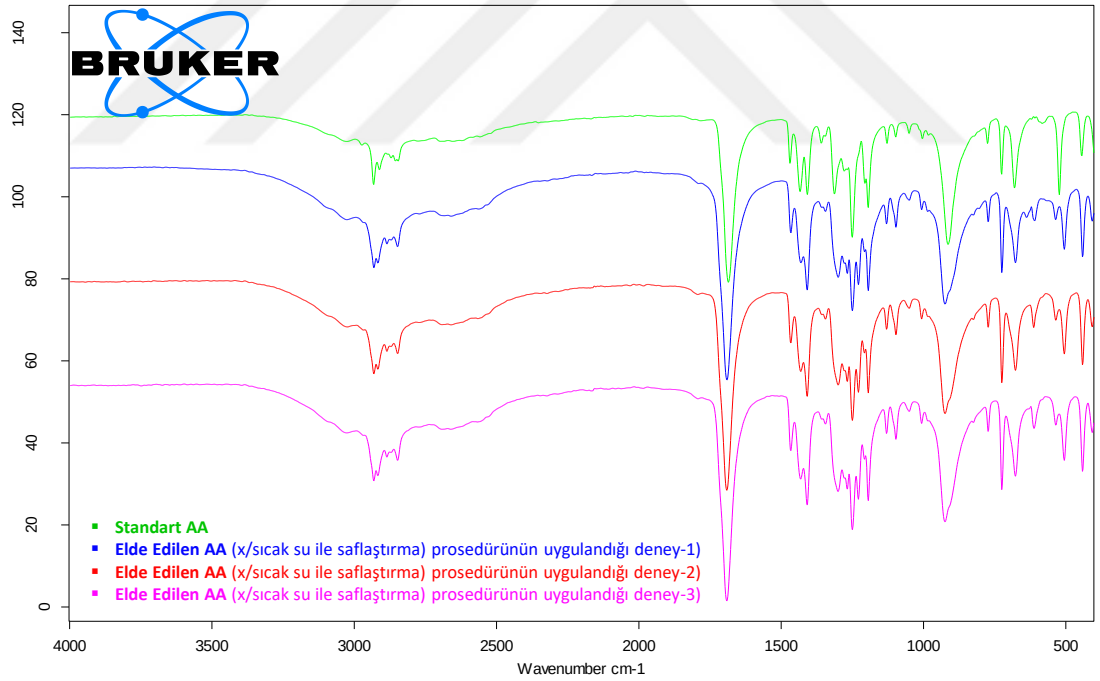
^{1}H-NMR (400 MHz DMSO): δ 1.33 ppm (dt, 10H,(C**H**$_2$-)$_5$CH_2-COOH), 2.17 (td, 4H, C**H**$_2$-COOH), 11.96 (s, 2H, -COO**H**). M_A: 188.22 g/mol, $C_9H_{16}O_4$

4.4.4.2.2. X/sıcak su (patentlendirilecek metoda ait çözücü) kullanılarak saflaştırılan AA`nın FT-IR yöntemi ile karakterizasyonu

OA`nın (% 68,02) $H_2O_2/H_2WO_4$ varlığında oksidasyonu/parçalanması ve sonrasında X/sıcak su ile saflaştırılması prosedüründen *(Deney-1)* elde edilen beyaz renkli kristallere ait ATR tekniği kullanılarak alınmış FT-IR spektrumu **Şekil 4.61.**`de yer almaktadır. *Deney-1* ile aynı şartlarda gerçekleştirilen tekrar deneylerin *(2. ve 3. tekrar deney)* FT-IR spektrumları da, standart AA spektrumununki ile karşılaştırmalı olarak **Şekil 4.62.**`de verilmiştir.



Şekil 4.61. OA`nın (% 68,02) H_2O_2/H_2WO_4 Varlığında Oksidasyonu/Parçalanması ve X/Sıcak Su ile Saflaştırılması Prosedüründen Elde Edilen Katı Maddeye Ait FT-IR Spektrumu.



Şekil 4.62. OA`nın $H_2O_2/H_2WO_4$ Varlığında Oksidasyonu/Parçalanması ve X/Sıcak Su ile Saflaştırılması Prosedürünü İçeren 3 Tekrarlı Deneylerden Elde Edilen Katı Maddelere ve Standart AA`ya Ait FT-IR Spektrumlarının Karşılaştırılması

Deney-1 ve aynı şartlarda gerçekleştirilen *tekrar deneyler*den elde edilen maddeler için elde edilen FT-IR spektrumları incelendiğinde (Şekil 4.61 ve Şekil 4.62.); 3026-3200 cm^{-1} arasında –OH bağı geriliminden kaynaklanan yoğun bir bandın, 2931-

2885 cm^{-1}`de $CH_2$ gruplarına ait C-H titreşim bandının, 1691 $cm^{-1}$`de karbonil grubuna ait C=O titreşim bandının, 1466-1345 cm^{-1} aralığında ise C-C ve C-O titreşim bantlarının yer aldığı görülmektedir.

Sonuçlardan da görüleceği üzere; ilgili prosedür sonunda elde edilen tüm maddeler, standart AA ile aynı FT-IR spektrumu görüntüsüne sahiptir. Bu sebeple, yüksek saflıkta AA eldesi için uygulanan X/sıcak su ile saflaştırma prosedürünün, istenilen amaca ulaşılması noktasında oldukça verimli olduğu söylenilebilir.

4.4.5. X/sıcak su (patentlendirilecek metoda ait çözücü) kullanılarak saflaştırılan AA`nın *in-vitro* koşullarda incelenmesi

OA`nın H_2O_2/H_2WO_4 varlığında oksidasyonu/parçalanması ve sonrasında X/sıcak su ile saflaştırılması prosedüründen elde edilen AA kristalleri için *in-vitro* koşullarda gerçekleştirilen antibakteriyel aktivite deneylerine ilişkin sonuçlar aşağıda detaylı olarak açıklanmıştır.

4.4.5.1. AA`nın Disk difüzyon yöntemi ile antibakteriyel aktivite tayini

OA`nın H_2O_2/H_2WO_4 varlığında oksidasyonu/parçalanması ve sonrasında X/sıcak su ile saflaştırılması prosedürlerinden elde edilen saf AA bileşiğinin antibakteriyel aktivitesi, (Bauer, 1966) tarafından geliştirilen disk difüzyon yöntemi kullanılarak tayin edilmeye çalışılmış ve elde edilen sonuçlar standart AA ve standart OA`dan elde edilen AA için elde edilen aktivite sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır.

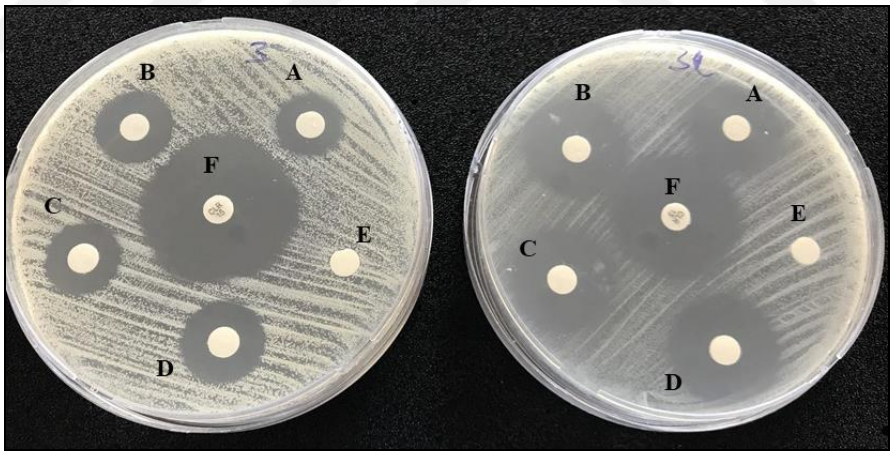
Aktivite belirleme çalışmalarında ilk olarak, standart AA ve deneylerden elde edilen AA numunelerinin steril şartlarda, 500 mg/mL konsantrasyonda DMSO ile stok çözeltileri hazırlanmış, mikroorganizma türü olarak ise; ciltte yaygın olarak bulunan 2 adet gram pozitif bakterinin 4 farklı suşu olan *Staphylococcus aureus ATCC 25923,* MRSA *Staphylococcus aureus ATCC 43300*, *Staphylococcus epidermidis ATTC 35984, Staphylococcus epidermidis ATTC 12228* bakterileri kullanılmıştır. AA`nın akne, rozasea ve deride leke (malezma) gibi cilt rahatsızlıklarını tedavi edici/iyileştirici özelliklere sahip olması sebebiyle, çalışmada cilt florasında bulunan bakteri türleri tercih edilmiştir. Tez kapsamında elde edilen AA`nın cilt uygulamalarında kullanılacağı dikkate alınarak; cilde uygun pH aralığı olan (pH= 4,5-6) pH= 5,6 ve MHA besiyerinin normal pH'sı olan pH= 7,3 değerlerine sahip iki farklı besiyerinde çalışmalar yürütülmüştür. **Bölüm 3.9.4.1`**de yer alan deneysel prosedür doğrultusunda yürütülen

çalışmalarda 37 °C`de 24 saat süreyle gerçekleştirilen iki tekrarlı çalışmalar sonunda, gözlenen inhibisyon bölgelerinin çapı (mm) bir kumpas/cetvel yardımıyla ölçülmüş ve AA`nın antibakteriyel etkisi değerlendirilmeye çalışılmıştır. İnhibisyon bölgeleri için elde edilen çap değerlerinin fazla olması, ilgilenilen maddeyi içeren diskin, bulunduğu besiyeri ortamındaki bakterileri daha fazla inhibe ettiği ile ilişkilendirilmiştir.

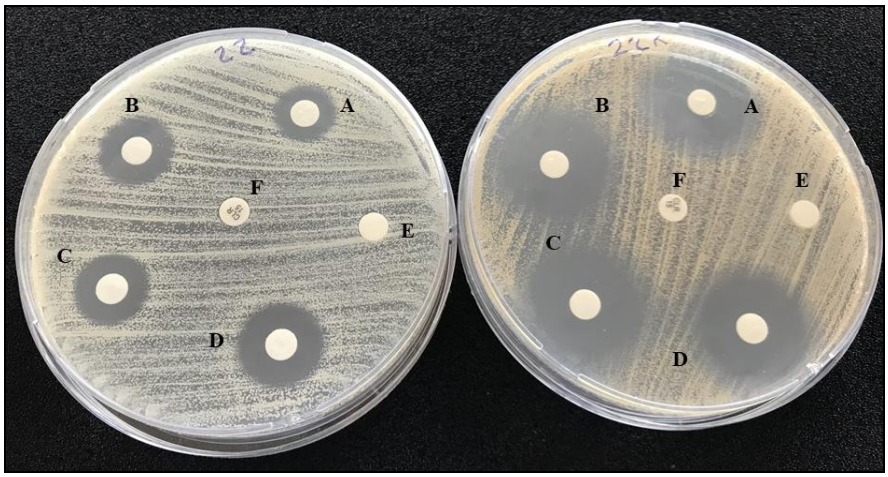
Besiyeri ortamına yerleştirilen diskler üzerinde bulunan maddelere ilişkin kodlamalar şöyledir:

A: Standart AA
B: Standart OA`dan elde edilen AA
C: Tez kapsamında elde edilen AA (patenlendirilecek 1. madde)
D: Tez kapsamında elde edilen AA (patenlendirilecek 2. madde)
E: DMSO (negatif kontrol)
F: Klaritromisin (CLR, 15 mcg) antibiyotiği (pozitif kontrol)

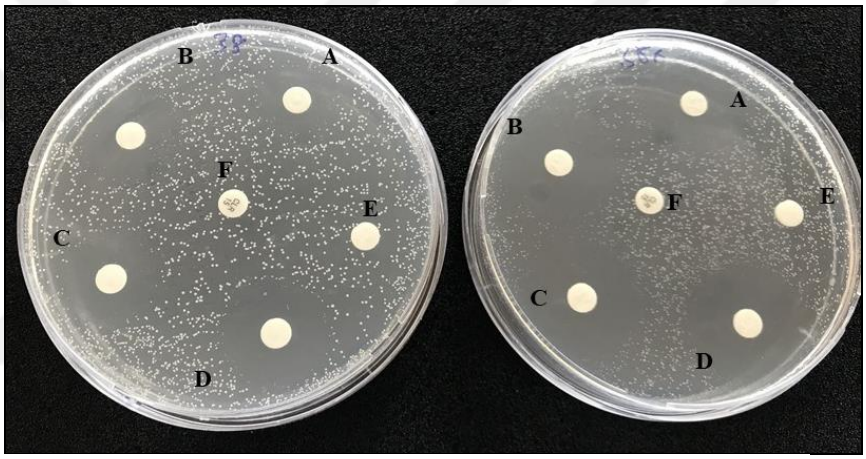
Farklı bakteri türleri kullanılarak, farklı pH değerlerinde gerçekleştirilen aktivite tayini çalışmaları sonunda elde edilen inhibisyon zon bölgelerinin görünümleri ise aşağıda yer almaktadır.



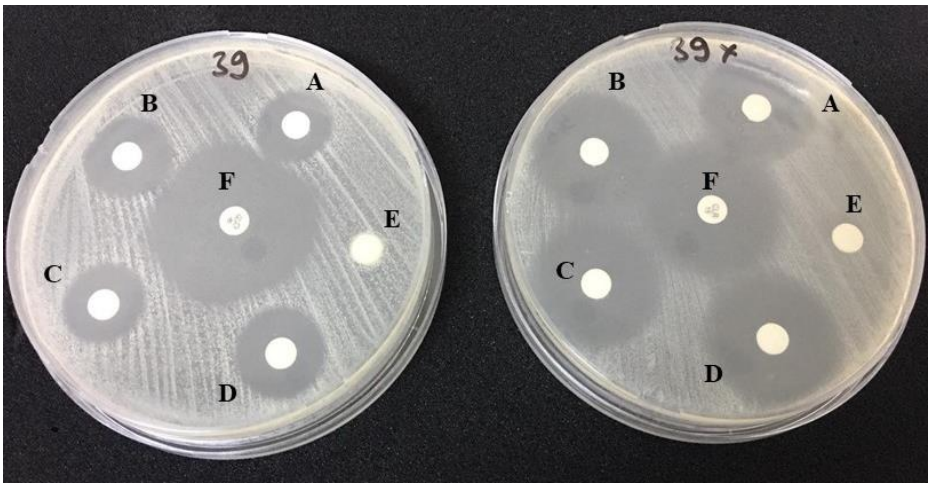
Şekil 4.63. Elde Edilen AA Bileşikleri için *Staphylococcus Aureus* ATCC 25923 Bakterisi ile Disk Difüzyon Yöntemi Kullanılarak Elde Edilen İnhibisyon Zonlarının Görünümü (Soldaki besiyeri pH: 7,3 - sağdaki besiyeripH: 5,6`dır)



Şekil 4.64. Elde Edilen AA Bileşikleri için MRSA *Staphylococcus Aureus ATCC 43300* Bakterisi ile Disk Difüzyon Yöntemi Kullanılarak Elde Edilen İnhibisyon Zonlarının Görünümü (Soldaki besiyeri pH: 7,3 - sağdaki besiyeripH: 5,6`dır)



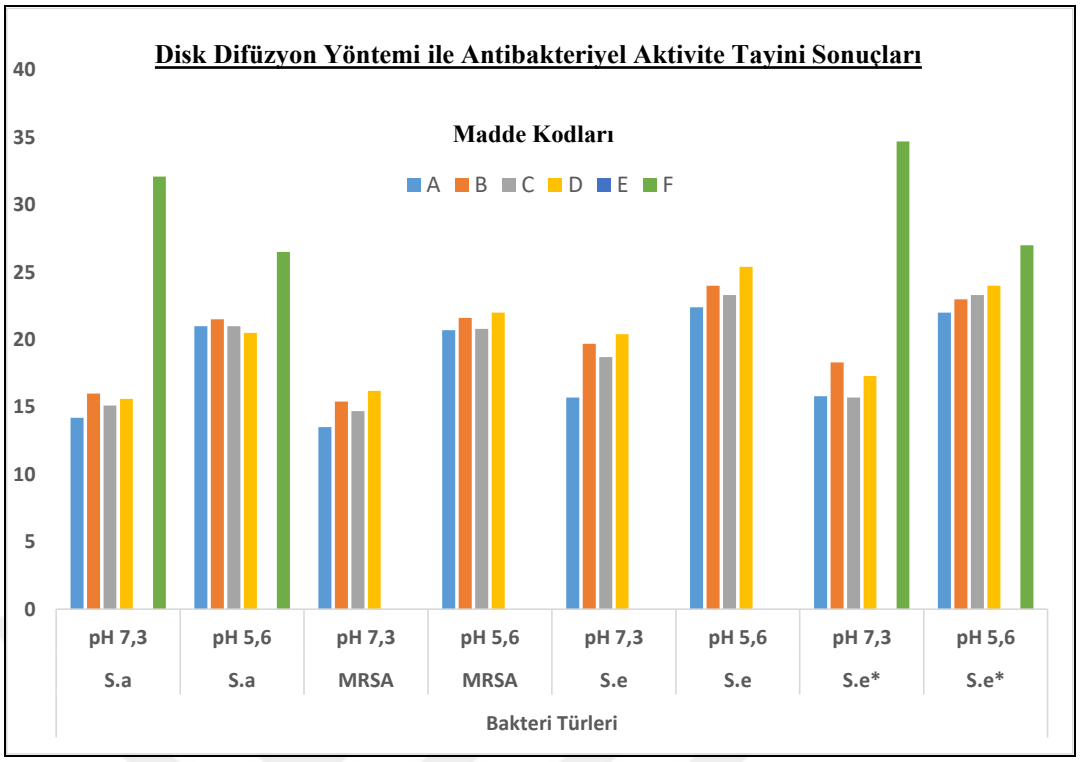
Şekil 4.65. Elde Edilen AA Bileşikleri için *Staphylococcus Epidermidis ATTC 35984* Bakterisi ile Disk Difüzyon Yöntemi Kullanılarak Elde Edilen İnhibisyon Zonlarının Görünümü (Soldaki besiyeri pH: 7,3 - sağdaki besiyeripH: 5,6`dır)



Şekil 4.66. Elde Edilen AA Bileşikleri için *Staphylococcus Epidermidis ATTC 12228* Bakterisi ile Disk Difüzyon Yöntemi Kullanılarak Elde Edilen İnhibisyon Zonlarının Görünümü (Soldaki besiyeri pH: 7,3 - sağdaki besiyeripH: 5,6`dır)

Disk difüzyon yöntemi ile elde edilen inhibisyon zonları incelendiğinde **(Şekil 4.63-Şekil 4.66.)**; çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan Klaritromisin (CLR, 15 mcg) antibiyotiğinin, beklenildiği gibi *Staphylococcus aureus ATCC 25923* ve *Staphylococcus epidermidis ATTC 12228* bakterilerini inhibe ettiği, MRSA *Staphylococcus aureus ATCC 43300* ve *Staphylococcus epidermidis ATCC 35984* bakterileri üzerinde ise herhangi bir etkinlik göstermediği görülmüştür. Negatif kontrol olarak kullanılan DMSO için gözlenen veriler ise, sadece çözücü olarak ortama ilave edilen bu maddenin, yine beklenildiği gibi herhangi bir aktivitesi olmadığını doğrulamıştır.

Tez kapsamında elde edilen türlerin (A, B, C ve D) antibakteriyel aktivitelerinin değerlendirilmesinde ise; oluşturmuş oldukları inhibisyon bölgeleri dikkate alınmış ve herbir maddenin inhibisyon bölgesi oluşturduğu gözlendiğinden, antibakteriyel aktiviteye sahip oldukları sonucuna varılmıştır. Gözle yapılan bu incelemelerin yanı sıra, antibakteriyel aktivitelerinin değerlendirilmesinde; bir kumpas/cetvel yardımıyla ölçülerek sayısal hale dönüştürülen inhibisyon bölgelerine ait çap değerlerinden de faydalanılmış, böylece daha doğru ve karşılaştırılabilir sonuçlar elde edilmiştir. Disk difüzyon yöntemi ile antibakteriyel aktivitesi incelenen maddeler için belirlenen inhibisyon bölgelerine ait çap değerlerinin çubuk grafik ile gösterimi **Şekil 4.67.** de, elde edilen değerler ise **Tablo 4.49.`**de toplu olarak verilmiştir.



Şekil 4.67. Disk Difüzyon Yöntemi ile Antibakteriyel Aktivitesi İncelenen Maddeler İçin Belirlenen İnhibisyon Bölgelerine Ait Çap Değerlerinin Çubuk Grafik İle Gösterim

— ***S.a*:** *Staphylococcus aureus ATCC 25923*, **MRSA:** Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus ATCC 43300*, ***S.e*:** *Staphylococcus epidermidis ATCC 35984*, ***S.e**:** *Staphylococcus epidermidis ATCC 12228*

— **A:** Standart AA, **B:** Standart OA`dan elde edilen AA, **C:** Tez kapsamında elde edilen AA (patenlendirilecek 1. madde), **D:** Tez kapsamında elde edilen AA (patenlendirilecek 2. madde), **E:** DMSO (negatif kontrol), **F:** Klaritromisin (CLR, 15 mcg) antibiyotiği (pozitif kontrol)

Tablo 4.49. Elde Edilen AA Bileşikleri için Disk Difüzyon Yöntemi ile Antibakteriyel Aktivitesi İncelenen Maddeler İçin Belirlenen İnhibisyon Bölgelerine Ait Çap Değerleri

	Bakteri Türleri							
Madde Kodları	***S.a* pH 7,3**	***S.a* pH 5,6**	**MRSA pH 7,3**	**MRSA pH 5,6**	***S.e* pH 7,3**	***S.e* pH 5,6**	***S.e** pH 7,3**	***S.e** pH 5,6**
A	14,2	21,0	13,5	20,7	15,7	22,4	15,8	22,0
B	16,0	21,5	15,4	21,6	19,7	24,0	18,3	23,0
C	15,1	21,0	14,7	20,8	18,7	23,3	15,7	23,3
D	15,6	20,5	16,2	22,0	20,4	25,4	17,3	24,0
E	-	-	-	-	-	-	-	-
F	32,1	26,5	-	-	-	-	34,7	27,0

Değerler, 6 mm'lik disk çapı dâhil inhibisyon bölgelerinin çaplarını (mm) göstermektedir.

Şekil 4.67. ve **Tablo 4.49.**`den de görüleceği üzere; pH`sı 5,6 olan besiyerinde gerçekleştirilen antibakteriyel aktivite deneylerinden elde edilen inhibisyon bölgesi çap değerlerinin, pH`sı 7,3 olan besiyerinde gerçekleştirilen deneylerden elde edilenlere kıyasla daha fazla olduğu, dolayısıyla aktivitesi incelenen maddelerin cilt pH`sı

aralığında daha fazla aktivite gösterdikleri görülmüştür. Ayrıca, inhibisyon bölgeleri için elde edilen çap değerleri, tez kapsamında elde edilen tüm AA türlerinin (B, C, D), standart AA`dan (A) daha fazla antibakteriyel aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir.

Antibakteriyel aktivitesi incelelen madde türlerinin, 4 farklı bakteri türü üzerindeki etkinlikleri dikkate alındığında ise;

— *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 bakterisi (S.a) üzerinde en fazla antibakteriyel aktivite gösteren türün; 21,5 mm`lik inhibisyon bölge çapına sahip olan B maddesi (standart OA`dan elde edilen AA) olduğu görülmüştür. Bununla birlikte; tez kapsamındaki çalışmalardan elde edilen C kodlu AA`nın da (patenlendirilecek 1. madde), bu değere oldukça yakın bir inhibisyon çapı sergilediği (21,0 mm) ve standart AA için elde edilen çap değerinin de aynı olduğu görülmüştür.

— *Metisiline dirençli Staphylococcus aureus ATCC 43300* bakterisi (MRSA) üzerinde en fazla antibakteriyel aktivite gösteren türün; 22,0 mm`lik inhibisyon bölge çapına sahip olan D maddesi (tez kapsamında elde edilen AA, patenlendirilecek 2. madde) olduğu görülmüştür. Söz konusu maddeye ait inhibisyon çap değerinin, standart AA için elde edilen çap değerinden (21,6 mm) daha fazla olması, tez çalışmasının etkinliğini vurgulamak açısından son derece önemlidir.

— *Staphylococcus epidermidis ATCC 35984* bakterisi (S.e) üzerinde en fazla antibakteriyel aktivite gösteren türün; 25,4 mm`lik inhibisyon bölge çapına sahip olan D maddesi (tez kapsamında elde edilen AA, patenlendirilecek 2. madde) olduğu görülmüştür. Burada da D maddesi için ölçülen inhibisyon çap değerinin, standart AA için elde edilen çap değerinden (22,4 mm) oldukça fazla olduğu görülmektedir.

— *Staphylococcus epidermidis ATCC 12228* (S.e*) üzerinde en fazla antibakteriyel aktivite gösteren türün yine; 24,0 mm`lik inhibisyon bölge çapına sahip olan D maddesi (tez kapsamında elde edilen AA, patenlendirilecek 2. madde) olduğu görülmüştür. D maddesi için ölçülen inhibisyon çap değerinin, standart AA için elde edilen çap değerinden (22,0 mm) oldukça fazla olması, daha fazla aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir.

Antibakteriyel aktivite tayinlerinden elde edilen sonuçlar genel anlamda değerlendirildiğinde; tez kapsamında elde edilen AA türlerinin, standart AA ve standart OA`dan elde edilen AA maddeleri kadar yüksek inhibisyon çap değerine sahip oldukları, hatta bazı bakteri türleri üzerinde çok daha fazla etkinlik gösterdikleri tespit edilmiştir.

4.4.5.2. AA`nın Mikrodilüsyon Broth yöntemi ile antibakteriyel aktivite tayini

OA`nın H_2O_2/H_2WO_4 varlığında oksidasyonu/parçalanması ve sonrasında X/sıcak su ile saflaştırılması prosedürlerinden elde edilen saf AA bileşiğinin antibakteriyel aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan diğer yöntem olan Mikrodilüsyon Broth yönteminde, aktivitesi incelenen farklı içerik/konsantrasyona sahip madde dilüsyonlarının, belirli konsantrasyondaki mikroorganizmalara karşı olan etkisi, 96 kuyucuklu mikroplakalar kullanılarak bir seri seyreltme yöntemi ile incelenmiş ve bakteriyostatik etki gücünün göstergesi olan minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri tespit edilmeye çalışılmıştır. Tez kapsamında elde edilen AA türlerinin antibakteriyel aktivite derecesinin belirlenmesinde karşılaştırma değeri olarak ise, standart AA ve standart OA`dan elde edilen AA için elde edilen aktivite sonuçları kullanılmıştır.

Mikrodilüsyon Broth yöntemi ile aktivite belirleme çalışmalarında; standart AA ve deneylerden elde edilen AA numunelerinin steril şartlarda, 128 mg/mL konsantrasyonda DMSO ile stok çözeltileri hazırlanmış, mikroorganizma türü olarak ise; ciltte yaygın olarak bulunan 2 adet gram pozitif bakterinin 4 farklı suşu olan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, MRSA *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Staphylococcus epidermidis* ATTC 35984, *Staphylococcus epidermidis* ATTC 12228 bakterileri kullanılmıştır. Besiyeri olarak iki farklı pH değerine sahip (pH= 5,6 ve pH= 7,3) Müeller Hinton Broth (MHB) çözeltisinin yer aldığı çalışmalarda; pozitif kontrol olarak Klaritromisin antibiyotiğinin saf su içinde hazırlanmış 512 µg/mL konsantrasyondaki çözeltisi, negatif kontrol olarak ise (MHB) solüsyonu kullanılmıştır.

Bölüm 3.9.4.2`de yer alan deneysel prosedür doğrultusunda yürütülen çalışmalarda 37 °C`de 24 saat süreyle gerçekleştirilen inkübasyon işleminden sonra 600 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerleri, herbir kuyucuktaki madde konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirilmiş ve elde edilen grafikler MİK değerlerinin hesaplanmasında kullanılmıştır. Ayrıca, MİK değerleri TTC yöntemiyle de doğrulanmış, bakteri üremesinin görülmediği (kırmızı renklenmenin olmadığı) en düşük konsantrasyonu temsil eden kuyucuklar MİK değerleri olarak kabul edilmiştir (Eloff, 1998; Kang ve ark., 2008) .

Antibakteriyel aktivite tayinleri sırasında mikroplaka kuyucukları içerisine ilave edilen maddelere ilişkin kodlamalar şöyledir:

A1 ve A2: Standart AA

B1 ve B2: Standart OA`dan elde edilen AA

C1 ve C2: Tez kapsamında elde edilen AA (patenlendirilecek 1. madde)

D: Tez kapsamında elde edilen AA (patenlendirilecek 2. madde)

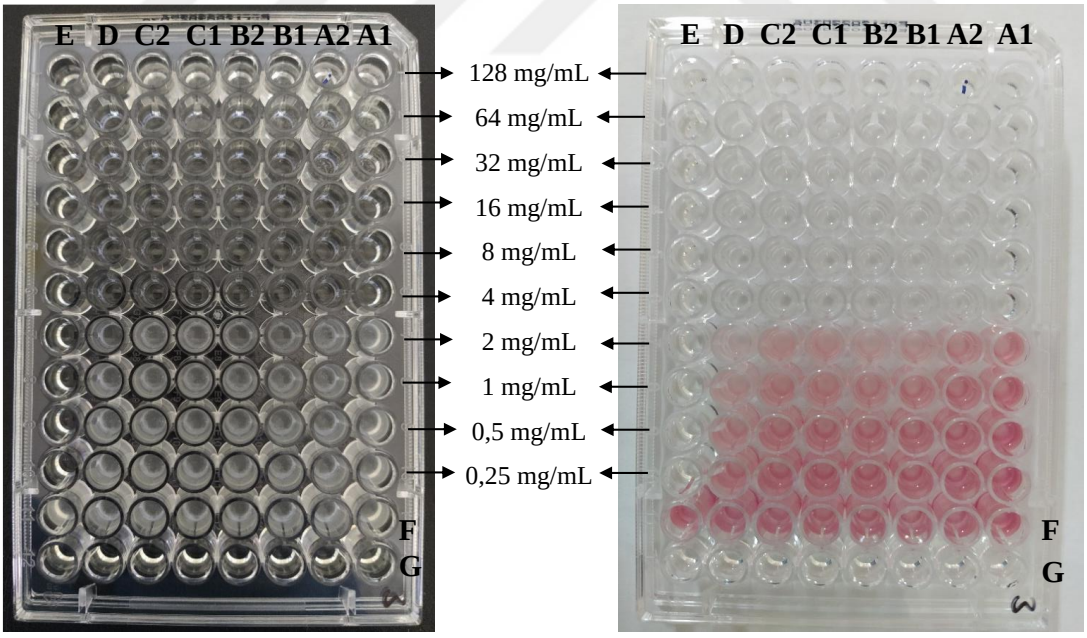
E: Klaritromisin (CLR) antibiyotiği (pozitif kontrol)

F: MHB + bakteri içeren karışım (üreme kontrol)

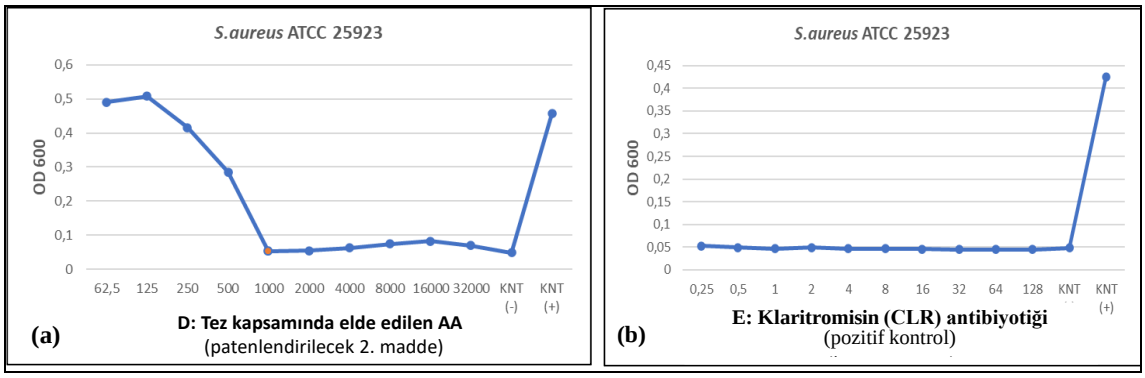
G: MHB çözeltisi (besiyeri)

Farklı bakteri türleri kullanılarak, farklı pH değerlerine sahip (pH= 5,6 ve pH= 7,3) besiyerleri ile gerçekleştirilen aktivite tayini çalışmaları sonunda; bakterilerin asidik ortam şartlarında üreyemedikleri görülmüş ve MİK değerlerini belirlemede kullanılabilecek kayda değer veriler elde edilememiştir. Bu sebeple, MİK değerlerinin belirlenmesinde sadece pH= 7,3`e sahip besiyerinin kullanıldığı çalışmalardan elde edilen sonuçlar dikkate alınmıştır.

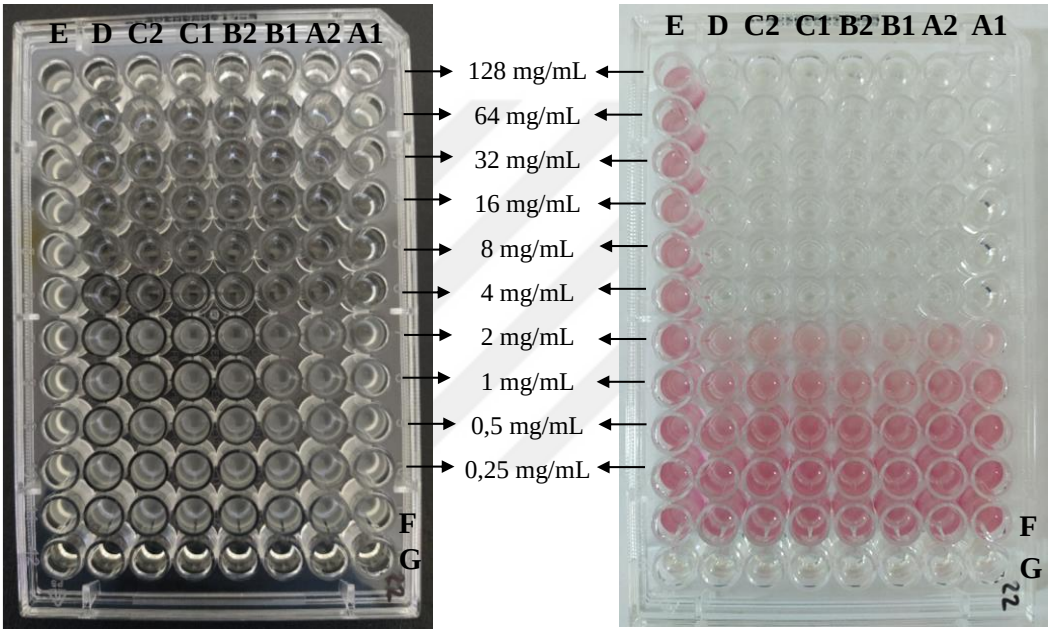
Mikrodilüsyon Broth yöntemi ile antibakteriyel aktivitesi incelenen maddeler için belirlenen MİK değerlerine ait mikroplakaların 24 saat inhibisyon sonrası ve TTC ile boyama sonrasına ait görüntüler **Şekil 4.68.- 4.72.** de, verilmiştir.



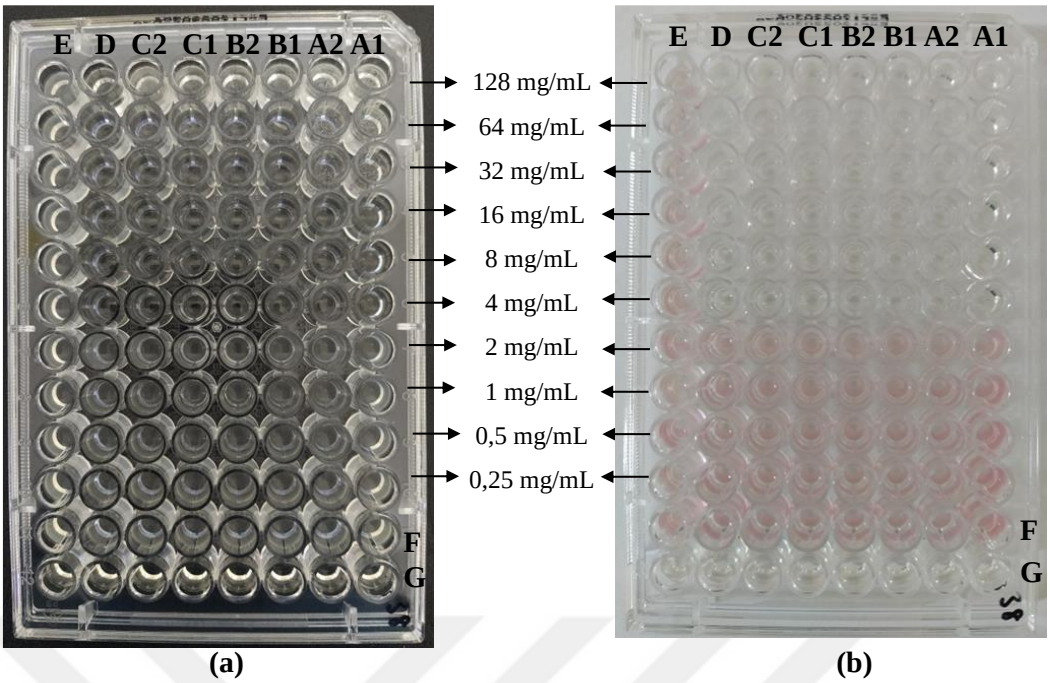
Şekil 4.68. Elde Edilen AA Bileşikleri İçin *Staphylococcus Aureus ATCC 25923* Bakterisinin **(a)** 24 Saat İnkübasyon Sonrasındaki Görüntüsü **b)** TTC ile Boyanma Sonrası Görüntüsü



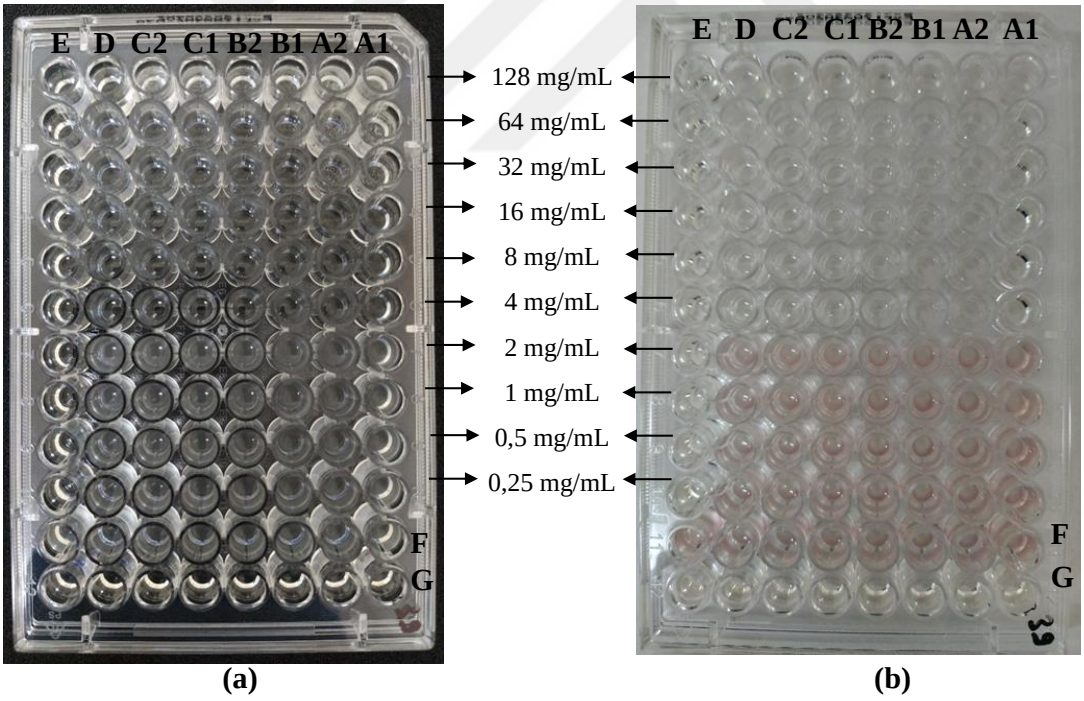
Şekil 4.69. D ve E Kodlu Bileşiklerin *Staphylococcus Aureus* ATCC 25923 Bakterisi İçin MİK Değerlerinin Belirlenmesinde Kullanılan Optik Yoğunluk (OD)-Konsantrasyon (µg/mL) Grafikleri



Şekil 4.70. Elde Edilen AA Bileşikleri için *MRSA ATCC 43300* Bakterisinin **(a)** 24 Saat İnkübasyon Sonrasındaki Görüntüsü **(b)** TTC ile Boyanma Sonrası Görüntüsü



Şekil 4.71. Elde Edilen AA Bileşikleri İçin *Staphylococcus Epidermidis ATTC 35984* Bakterisinin **(a)** 24 Saat İnkübasyon Sonrasındaki Görüntüsü **(b)** TTC ile Boyanma Sonrası Görüntüsü



Şekil 4.72. Elde Edilen AA Bileşikleri İçin *Staphylococcus Epidermidis ATTC 12228* Bakterisinin **(a)** 24 Saat İnkübasyon Sonrasındaki Görüntüsü **(b)** TTC ile Boyanma Sonrası Görüntüsü

Tez kapsamında elde edilen AA bileşikleri için, Mikrodilüsyon Broth Yöntemi ile gerçekleştirilen antibakteriyel aktivite tayinleri sonunda tespit edilen MİK değerleri (µg/mL) **Tablo 4.50**. de verilmiştir.

Tablo 4.50. Elde Edilen AA Bileşikleri İçin Mikrodilüsyon Broth Yöntemi ile Antibakteriyel Aktivitesi İncelenen Maddeler İçin Belirlenen MİK Değerleri (µg/mL)

	Bakteriler			
Madde Kodları	***S. a***	**MRSA**	***S. e***	***S.e****
A	1000	1000	1000	1000
B	1000	1000	1000	1000
C	1000	1000	1000	1000
D	1000	1000	1000	1000
E	<0,25	>128	>128	<0,25

— ***S.a*****:** *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, **MRSA:** Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, ***S.e*****:** *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, ***S.e**:** *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228

— **A:** Standart AA, **B:** Standart OA`dan elde edilen AA, **C:** Tez kapsamında elde edilen AA (patenlendirilecek 1. madde), **D:** Tez kapsamında elde edilen AA (patenlendirilecek 2. madde), **E:** : Klaritromisin (CLR) antibiyotiği (pozitif kontrol)

Tablodan da görüldüğü üzere; tez kapsamında elde edilen AA bileşikleri (B, C ve D) için hesaplanan MİK değerleri, standart AA için bulunan MİK değeri ile aynıdır (1000 µg/mL). Pozitif kontrol olarak kullanılan Klaritromisinin (CLR) MİK değeri ise; dirençli bakteriler için >128 µg/mL, duyarlı bakteriler için ise <0,25 µg/mL olarak bulunmuştur.

4.4.6. Geliştirilen topikal krem formülasyonlarının organoleptik ve fiziksel/kimyasal özelliklerinin incelenmesi

Tez çalışması kapsamında; etkin madde içeriği bakımından; ***(i)*** sadece AA içeren ***(ii)*** sadece SA içeren ***(iii)*** AA ve SA kombinasyonunu içeren formülasyonlar olmak üzere değişik şekillerde hazırlanan 6 farklı topikal krem formülasyonu geliştirilmiştir; ***Formül-1:*** Etkin madde içermeyen krem, ***Formül-2:*** % 0,5 AA içeren Krem, ***Formül-3****:* % 0,5 SA içeren Krem, ***Formül-4****:* % 0,5 AA + % 0,5 SA içeren Krem, ***Formül-5:*** % 1 AA içeren Krem, ***Formül-6:*** % 10 AA içeren Krem.

Hazırlanan krem formülasyonları, organoleptik ve fiziksel/kimyasal özelliklerinin belirlenmesi amacıyla, hızlandırılmış stabilite testlerine tabii tutulmuş, 3 aylık bir sürede (12.02.2020-15.05.2020 tarihleri arasında) tamamlanan testler, Dağlar Kozmetik Ürünleri İmalat ve Gıda San. Tic. A.Ş`nin destekleri ile geçekleştirilmiştir.

Herbir krem formülasyonu için, oda şartlarında (25 °C ± 2 sıcaklık ve doğal oda nemi) ve stabilite dolabında (40 °C ± 5 sıcaklık, % 65 ±3 nem ve floresan ışıkta) olmak üzere iki farklı ortamda yürütülen çalışmalar sonunda çok sayıda veri elde edilmiş olduğundan, burada sadece % 0,5 AA içeren krem formülasyonu için elde edilen test sonuçları detaylı olarak verilmiş, diğer krem formülasyonları için elde edilen veriler ise kısaca özetlenmiştir.

Kozmetik ürünler için stabilite kriteri olarak, haftalara göre elde edilen spekt değerleri dikkate alınmış; *4. haftada değişiklik göstermeye başlayan ürünlerin maksimum raf ömrü 1 yıl*, *8. haftada değişiklik göstermeye başlayan ürünlerin maksimum raf ömrü 1,5 yıl*, *12. haftada değişiklik göstermeye başlayan ürünlerin maksimum raf ömrü 2 yıl*, *12. hafta sonunda hala değişiklik görülmeyen ürünlerin maksimum raf ömrü ise 3 yıl* olarak öngörülmüştür.

- **% 0,5 AA İçeren Krem Formülasyonu (*Formül-2*) için Hızlandırılmış Stabilite Testi Sonuçları:** % 0,5 AA içeren krem formülasyonu için, farklı şartlarda gerçekleştirilen hızlandırılmış stabilite testlerine ait sonuçlar ve kabul edilen kriter değerler ile olan karşılaştırmaları aşağıda yer almaktadır:

  - **Proses-1:** % 0,5 AA içeren krem formülasyonu, 25 °C ± 2 oda şartlarında 3 ay (12 hafta) boyunca test edilmiştir.

Tablo 4.51. % 0,5 AA İçeren Krem Formülasyonu için Oda Şartlarında (25 °C ± 2) 0. Hafta Gerçekleştirilen Stabilite Testlerine Ait Sonuçlar ve Kabul Kriterleri

		Kabul Kriterleri
Görünüm **(a)**	yarı katı	yarı katı
Koku **(b)**	çiçek kokusu	çiçek kokusu
Renk **(c)**	beyaz renk	beyaz renk
Suda çözünürlük **(d)**	yok	yok
Akışkanlık **(e)**	yarı akışkan	yarı akışkan
Ayrışma **(f)**	yok	yok
Ağırlıkta değişim **(g)**	98,40	98,4±3
Kapta değişiklik **(h)**	yok	yok
Viskozite **(ı)**	35900	35900 ±7000
pH **(i)**	5,5	5,3-5,7

Tablo 4.52. % 0,5 AA İçeren Krem Formülasyonu için Oda Şartlarında (25 °C ± 2) 12 Hafta Boyunca Gerçekleştirilen Hızlandırılmış Stabilite Testlerine Ait Sonuçlar

	Spektler	**0.hafta**	**1.hafta**	**2.hafta**	**4.hafta**	**8.hafta**	**12.hafta**
	Tarih	**12.02.2020**	**19.02.2020**	**26.02.2020**	**11.03.2020**	**14.04.2020**	**15.05.2020**
ODA ŞARTLARI (25 °C ± 2)	**a**	Değişiklik gözlenmedi.	Değişiklik gözlenmedi.	Değişiklik gözlenmedi.	Değişiklik gözlenmedi.	Değişiklik gözlenmedi.	Değişiklik gözlenmedi.
	b	Değişiklik gözlenmedi.	Değişiklik gözlenmedi.	Değişiklik gözlenmedi.	Değişiklik gözlenmedi.	Değişiklik gözlenmedi.	Değişiklik gözlenmedi.
	c	Değişiklik gözlenmedi.	Değişiklik gözlenmedi.	Değişiklik gözlenmedi.	Değişiklik gözlenmedi.	Değişiklik gözlenmedi.	Değişiklik gözlenmedi.
	d	Değişiklik gözlenmedi.	Değişiklik gözlenmedi.	Değişiklik gözlenmedi.	Değişiklik gözlenmedi.	Değişiklik gözlenmedi.	Değişiklik gözlenmedi.
	e	Değişiklik gözlenmedi.	Değişiklik gözlenmedi.	Değişiklik gözlenmedi.	Değişiklik gözlenmedi.	Değişiklik gözlenmedi.	Değişiklik gözlenmedi.
	f	Değişiklik gözlenmedi.	Değişiklik gözlenmedi.	Değişiklik gözlenmedi.	Değişiklik gözlenmedi.	Değişiklik gözlenmedi.	Değişiklik gözlenmedi.
	g	98,40	98,05	97,78	97,4	97,06	96,8
	h	Değişiklik gözlenmedi.	Değişiklik gözlenmedi.	Değişiklik gözlenmedi.	Değişiklik gözlenmedi.	Değişiklik gözlenmedi.	Değişiklik gözlenmedi.
	ı*	35900	40000	42000	42500	60000	66000
	i**	5,4	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5

* 22,7 °C`de ölçüm yapılmıştır.

** Oda sıcaklığında fonksiyonel turnusol kağıdı kullanılarak ölçüm yapılmıştır.

Sonuç-1: % 0,5 AA içeren krem formülasyonu için oda şartlarında (25 °C ± 2) gerçekleştirilen hızlandırılmış stabilite testlerinden elde edilen sonuçlar **(bkz Tablo 4.51. ve Tablo 4.52.)**, test edilen tüm parametre değerlerinin, ürünün spesifikasyonuna uygun olduğunu göstermiştir.

- **Proses-2:** % 0,5 AA içeren krem formülasyonu stabilite kabininde (40 °C ± 5 sıcaklık, % 65 ±3 nem ve floresan ışıkta) 3 ay (12 hafta) boyunca test edilmiştir.

Tablo 4.53. % 0,5 AA İçeren Krem Formülasyonu için Stabilite Kabininde (40 °C ± 5 sıcaklık, % 65 ±3 nem ve floresan ışıkta) 0. Hafta Gerçekleştirilen Stabilite Testlerine Ait Sonuçlar ve Kabul Kriterleri

		Kabul Kriterleri
Görünüm **(a)**	yarı katı	yarı katı
Koku **(b)**	çiçek kokusu	çiçek kokusu
Renk **(c)**	beyaz renk	beyaz renk
Suda çözünürlük **(d)**	yok	yok
Akışkanlık **(e)**	yarı akışkan	yarı akışkan
Ayrışma **(f)**	yok	yok
Ağırlıkta değişim **(g)**	103,50	103,5±3
Kapta değişiklik **(h)**	yok	yok
Viskozite **(ı)**	35900	35900 ±7000
pH **(i)**	5,5	5,3-5,7

Tablo 4.54. % 0,5 AA İçeren Krem Formülasyonu için Stabilite Kabininde (40 °C ± 5 sıcaklık, % 65 ±3 nem ve floresan ışıkta) 12 Hafta Boyunca Gerçekleştirilen Hızlandırılmış Stabilite Testlerine Ait Sonuçlar

	Spektler	**0.hafta**	**1.hafta**	**2.hafta**	**4.hafta**	**8.hafta**	**12.hafta**
	Tarih	**12.02.2020**	**19.02.2020**	**26.02.2020**	**11.03.2020**	**14.04.2020**	**15.05.2020**
STABİLİTE KABİNİ (40 °C ± 5 sıcaklık, % 65 ±3 nem ve floresan ışıkta)	**a**	Değişiklik gözlenmedi.	Değişiklik gözlenmedi.	Değişiklik gözlenmedi.	Değişiklik gözlenmedi.	Değişiklik gözlenmedi.	Değişiklik gözlenmedi.
	b	Değişiklik gözlenmedi.	Değişiklik gözlenmedi.	Değişiklik gözlenmedi.	Değişiklik gözlenmedi.	Değişiklik gözlenmedi.	Değişiklik gözlenmedi.
	c	Değişiklik gözlenmedi.	Değişiklik gözlenmedi.	Değişiklik gözlenmedi.	Değişiklik gözlenmedi.	Değişiklik gözlenmedi.	Değişiklik gözlenmedi.
	d	Değişiklik gözlenmedi.	Değişiklik gözlenmedi.	Değişiklik gözlenmedi.	Değişiklik gözlenmedi.	Değişiklik gözlenmedi.	Değişiklik gözlenmedi.
	e	Değişiklik gözlenmedi.	Değişiklik gözlenmedi.	Değişiklik gözlenmedi.	Değişiklik gözlenmedi.	Değişiklik gözlenmedi.	Değişiklik gözlenmedi.
	f	Değişiklik gözlenmedi.	Değişiklik gözlenmedi.	Değişiklik gözlenmedi.	Değişiklik gözlenmedi.	Değişiklik gözlenmedi.	Değişiklik gözlenmedi.
	g	103,50	103,15	102,93	102,89	102,81	102,63
	h	Değişiklik gözlenmedi.	Değişiklik gözlenmedi.	Değişiklik gözlenmedi.	Değişiklik gözlenmedi.	Değişiklik gözlenmedi.	Değişiklik gözlenmedi.
	ı*	35900	36000	40000	40000	20800	9700
	i**	5,4	5,5	5,4	5,5	5,5	5,5

* 22,7 °C`de ölçüm yapılmıştır.

** Oda sıcaklığında fonksiyonel turnusol kağıdı kullanılarak ölçüm yapılmıştır.

Sonuç-2: % 0,5 AA içeren krem formülasyonu için stabilite kabininde (40 °C ± 5 sıcaklık, % 65 ±3 nem ve floresan ışıkta) gerçekleştirilen hızlandırılmış stabilite testlerinden elde edilen sonuçlar **(bkz Tablo 4.53.ve Tablo 4.54**.), test edilen tüm parametre değerlerinin, ürünün spesifikasyonuna uygun olduğunu göstermiştir.

- **Kozmetik Ürün için Stabilite Test Raporu**

Tablo 4.55. % 0,5 AA İçeren Krem Formülasyonu için Hızlandırılmış Stabilite Testi Sonuçları ve Ürün Spesifikasyonunu Gösteren Kabul Kriterleri

Kriter	**Sonuç**	**Kabul Kriterleri**
Renk	Beyaz renk	Beyaz renk
Koku	Çiçek kokusu	Çiçek kokusu
Görünüm	Yarı katı	Yarı katı
Suda çözünürlük	Yok	Yok
Akışkanlık	Yarı akışkan	Yarı akışkan
Ayrışma	Yok	Yok
Kapta değişiklik	Yok	Yok
Ağırlık Değişikliği	≈ 3	≈ 103,5±3,00 g
pH	5,4	5,3±0,5

Değerlendirme: % 0,5 AA içeren krem formülasyonu için gerçekleştirilen hızlandırılmış stabilite testlerinden elde edilen verilere göre; gerek oda şartlarında gerekse stabilite kabini şartlarında analiz edilen parametrelerden, viskozite dışındaki herhangi bir parametrede belirgin bir değişikliğin oluşmadığı gözlenmiştir. 8. haftaya kadar majör bir değişikliğin olmadığı viskozite değerinin ise, bu haftadan sonra kabul kriterinin dışına çıktığı dikkate alınarak, ürünün maksimum raf ömrünün 18 ay olarak belirlenmesi ön görülmüştür.

- **Etkin Madde İçermeyen Krem Formülasyonu (*Formül-1)* için Hızlandırılmış Stabilite Testi Sonuçları:**

AA içermeyen krem formülasyonu için; 3 ay süreyle, iki farklı ortamda (oda şartları ve stabilite kabini) yürütülen hızlandırılmış stabilite testleri sonunda, ürünün organoleptik ve fiziko-kimyasal özellikleri asıl spesifikasyonu ile karşılaştırılarak değerlendirilmiş ve test edilen tüm parametrelerin her iki koşulda da ürünün spesifikasyonuna uygun olduğu gözlemlenmiştir.

Test edilen parametrelerden ürün viskozitesi, numunenin minimum miktar altında kalması sebebiyle ölçülememiş, diğer parametre değerlerinde ise 4. haftaya kadar majör bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Ancak 4. haftadan sonra pH ve ağırlık değişiminin kabul kriterinin dışına çıktığı görülmüş, bu sebeple AA içermeyen ürünün maksimum raf ömrünün 12 ay olarak belirlenmesi ön görülmüştür.

- **% 0,5 SA içeren Krem Formülasyonu (*Formül-3)* için Hızlandırılmış Stabilite Testi Sonuçları:**

% 0,5 SA içeren krem formülasyonu için; 3 ay süreyle, iki farklı ortamda (oda şartları ve stabilite kabini) yürütülen hızlandırılmış stabilite testleri sonunda, test edilen tüm parametrelerin her iki koşulda da ürünün spesifikasyonuna uygun olduğu gözlemlenmiştir.

Test edilen parametrelerden ürün viskozitesi, numunenin minimum miktar altında kalması sebebiyle ölçülememiş, diğer parametre değerlerinde ise 4. haftaya kadar majör bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Ancak 4. haftadan sonra her iki ortamda da ağırlık değişiminin kabul kriterinin dışına çıktığı görülmüş, bu sebeple % 0,5 SA içeren ürünün maksimum raf ömrünün 12 ay olarak belirlenmesi ön görülmüştür.

- **% 0,5 AA + % 0,5 SA içeren Krem Formülasyonu (*Formül-4*) için Hızlandırılmış Stabilite Testi Sonuçları:**

% 0,5 AA + % 0,5 SA içeren krem formülasyonu için; 3 ay süreyle, iki farklı ortamda (oda şartları ve stabilite kabini) yürütülen hızlandırılmış stabilite testleri sonunda, test edilen tüm parametrelerin her iki koşulda da ürünün spesifikasyonuna uygun olduğu gözlemlenmiştir.

Test edilen parametrelerden ürün viskozitesi, numunenin minimum miktar altında kalması sebebiyle ölçülememiş, diğer parametre değerlerinde ise 8. haftaya kadar majör bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Ancak 8. haftadan sonra pH ve ağırlık değişiminin kabul kriterinin dışına çıktığı görülmüş, bu sebeple % 0,5 AA + % 0,5 SA içeren ürünün maksimum raf ömrünün 18 ay olarak belirlenmesi ön görülmüştür.

- **% 1 AA içeren Krem Formülasyonu (*Formül-5*) için Hızlandırılmış Stabilite Testi Sonuçları:**

% 1 AA içeren krem formülasyonu için; 3 ay süreyle, iki farklı ortamda (oda şartları ve stabilite kabini) yürütülen hızlandırılmış stabilite testleri sonunda, ürünün organoleptik ve fiziko-kimyasal özellikleri asıl spesifikasyonu ile karşılaştırılarak değerlendirilmiş ve test edilen tüm parametrelerin her iki koşulda da ürünün spesifikasyonuna uygun olduğu gözlemlenmiştir.

Test edilen parametrelerden ürün viskozitesi, numunenin minimum miktar altında kalması sebebiyle ölçülememiş, diğer parametre değerlerinde ise 12. haftaya kadar majör bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Ancak 12. haftadan sonra her iki ortamda da ağırlık değişiminin kabul kriterinin dışına çıktığı görülmüş, bu sebeple AA içermeyen ürünün maksimum raf ömrünün 24 ay olarak belirlenmesi ön görülmüştür.

- **% 10 AA içeren Krem Formülasyonu (*Formül-6*) için Hızlandırılmış Stabilite Testi Sonuçları:**

% 10 AA içeren krem formülasyonu için; 3 ay süreyle, iki farklı ortamda (oda şartları ve stabilite kabini) yürütülen hızlandırılmış stabilite testleri sonunda, ürünün organoleptik ve fiziko-kimyasal özellikleri asıl spesifikasyonu ile karşılaştırılarak değerlendirilmiş ve test edilen tüm parametrelerin her iki koşulda da ürünün spesifikasyonuna uygun olduğu gözlemlenmiştir.

Test edilen parametrelerden ürün viskozitesi, numunenin minimum miktar altında kalması sebebiyle ölçülememiştir. Oda koşullarında bekletilen ürünün parametre değerlerinin 12 hafta boyunca kabul kriterinin dışına çıkmadığı görülürken, stabilite kabininde bekletilen ürünün pH ve ağırlık değişimi verilerinde ise 8. hafta itibariyle majör değişiklikler olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca 8. hafta itibariyle, stabilite kabininde bekletilen üründe ayrışmanın olduğu da saptanmıştır. Söz konusu sebeplerle, % 10 AA içeren ürünün maksimum raf ömrünün 18 ay olarak belirlenmesi ön görülmüştür.

4.4.7. Geliştirilen topikal krem formülasyonlarının *in-vitro* koşullarda incelenmesi

4.4.7.1. Krem formülasyonlarının disk difüzyon yöntemi ile antibakteriyel aktivite tayini

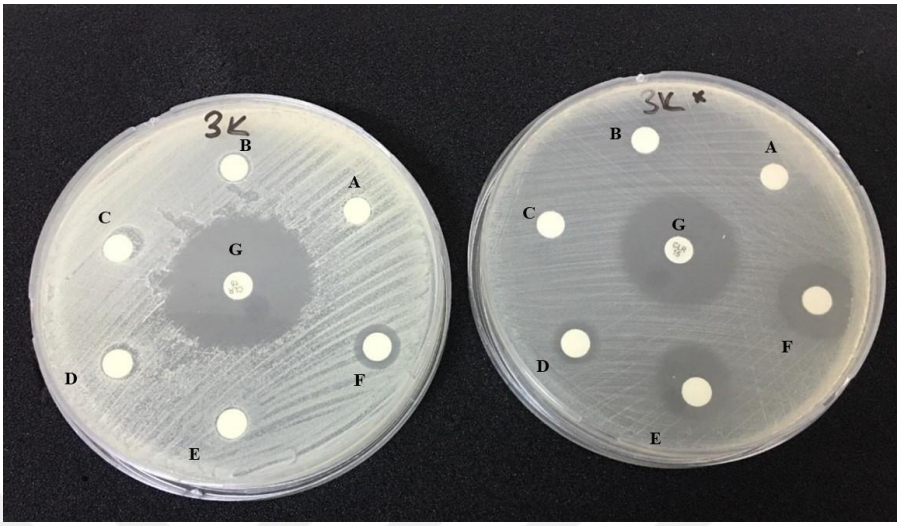
OA`nın H_2O_2/H_2WO_4 varlığında oksidasyonu/parçalanması ve sonrasında X/sıcak su ile saflaştırılması prosedürlerinden elde edilen saf AA bileşiğinin kullanılması ile geliştirilen farklı içeriklere sahip krem formülasyonlarının disk difüzyon yöntemi ile antibakteriyel özelliklerinin belirlenmesinde **Bölüm 3.9.4.1** da yer alan prosedür kullanılmıştır.

37 °C`de 24 saat süreyle gerçekleştirilen iki tekrarlı çalışmalar sonunda, krem formülasyonları için gözlenen inhibisyon bölgelerine ait çaplar ölçülmüş ve en fazla çap değerine sahip olan (bakteri türünü inhibe etme özelliği fazla olan) krem formülasyonunun en yüksek antibakteriyel aktiviteyi sergilediği kabul edilmiştir.

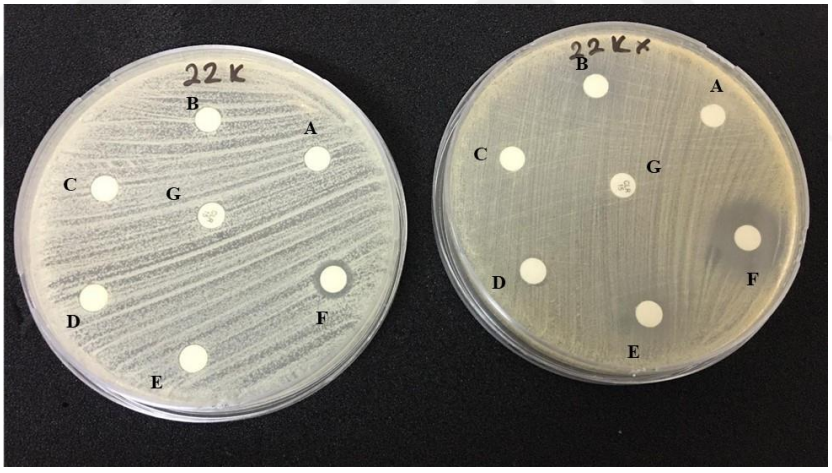
Besiyeri ortamına yerleştirilen diskler üzerinde bulunan maddelere ilişkin kodlamalar şöyledir:

A: Etken madde olmayan krem
B: % 0,5 SA
C: % 0,5 AA
D: % 1 AA
E: % 0,5 AA + % 0,5 SA
F: % 10 AA
G: Klaritromisin (CLR, 15 mcg)

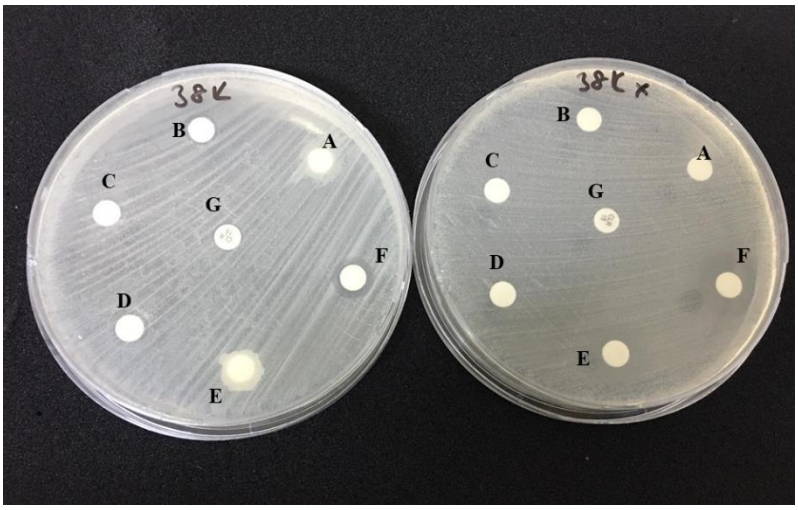
Farklı bakteri türleri kullanılarak, farklı pH değerlerinde gerçekleştirilen aktivite tayini çalışmaları sonunda elde edilen inhibisyon bölgelerinin görünümleri ise aşağıda yer almaktadır.



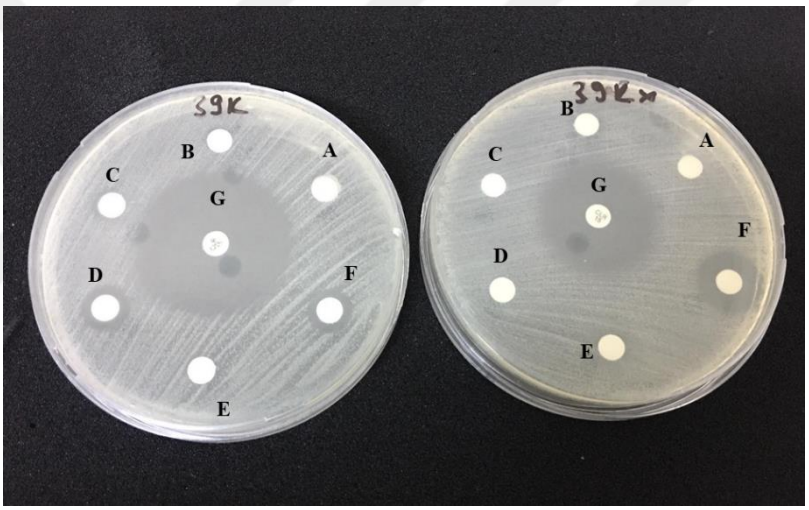
Şekil 4.73. Geliştirilen Krem Formülasyonları için *Staphylococcus Aureus* ATCC 25923 Bakterisi ile Disk Difüzyon Yöntemi Kullanılarak Elde Edilen İnhibisyon Zonlarının Görünümü (Soldaki besiyeri pH: 7,3 - sağdaki besiyeri pH: 5,6`dır)



Şekil 4.74. Geliştirilen Krem Formülasyonları için *MRSA ATCC 43300* Bakterisi ile Disk Difüzyon Yöntemi Kullanılarak Elde Edilen İnhibisyon Zonlarının Görünümü (Soldaki besiyeri pH: 7,3 - sağdaki besiyeripH: 5,6`dır)



Şekil 4.75. Geliştirilen Krem Formülasyonları için *Staphylococcus Epidermidis ATTC 35984* Bakterisi ile Disk Difüzyon Yöntemi Kullanılarak Elde Edilen İnhibisyon Zonlarının Görünümü (Soldaki besiyeri pH: 7,3 - sağdaki besiyeripH: 5,6`dır)



Şekil 4.76. Geliştirilen Krem Formülasyonları için *Staphylococcus Epidermidis ATTC 12228* Bakterisi ile Disk Difüzyon Yöntemi Kullanılarak Elde Edilen İnhibisyon Zonlarının Görünümü (Soldaki besiyeri pH: 7,3 - sağdaki besiyeripH: 5,6`dır)

Disk difüzyon yöntemi ile elde edilen inhibisyon zonları incelendiğinde (**Şekil 4.73. – Şekil 4.76.)**; çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan Klaritromisin (CLR, 15 mcg) antibiyotiğinin, beklenildiği gibi *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ve *Staphylococcus epidermidis* ATTC 12228 bakterilerini inhibe ettiği, MRSA *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 ve *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 bakterileri üzerinde ise herhangi bir etkinlik göstermediği görülmüştür. Negatif kontrol olarak kullanılan DMSO için gözlenen veriler ise, sadece çözücü olarak ortama ilave edilen bu maddenin, yine beklenildiği gibi herhangi bir aktivitesi olmadığını doğrulamıştır.

Tez kapsamında elde edilen farklı içeriklere sahip olan kremlerin (A, B, C, D, E ve F) antibakteriyel aktivitelerinin değerlendirilmesinde ise; yine oluşturmuş oldukları inhibisyon bölgeleri dikkate alınmış, özellikle F koduna sahip olan (% 10 AA içeren) kremin, deney prosedüründe kullanılan 4 farklı bakteri için de, çalışılan her iki pH değerinde (pH= 5,6 ve pH= 7,3) inhibisyon bölgesi oluşturduğu gözlendiğinden, en fazla antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Bunun yanı sıra; antibakteriyel aktivitelerinin değerlendirilmesinde, bir kumpas/cetvel yardımıyla ölçülerek sayısal hale dönüştürülen inhibisyon bölgelerine ait çap değerlerinden de faydalanılmılmıştır. Disk difüzyon yöntemi ile antibakteriyel aktivitesi incelenen kremler için belirlenen inhibisyon bölgelerine ait çap değerleri **Tablo 4.56.`de** toplu olarak verilmiştir.

Tablo 4.56. Geliştirilen Krem Formülasyonları İçin Disk Difüzyon Yöntemi ile Antibakteriyel Aktivitesi İncelenen Maddeler İçin Belirlenen İnhibisyon Bölgelerine Ait Çap Değerleri

	Bakteri Türleri							
Madde Kodları	***S.a*** **pH 7,3**	***S.a*** **pH 5,6**	**MRSA pH 7,3**	**MRSA pH 5,6**	***S.e*** **pH 7,3**	***S.e*** **pH 5,6**	***S.e**** **pH 7,3**	***S.e**** **pH 5,6**
A	-	-	-	-	-	-	-	-
B	-	-	-	-	-	-	-	-
C	-	-	-	-	-	-	-	-
D	-	9,0	-	-	-	-	9,8	-
E	-	13,7	-	7,0	-	-	-	-
F	9,3	16,5	9,0	17,0	7,4	13,5	10,2	14,7
G	29,0	24,0	-	-	-	-	36,0	26,0

Değerler, 6 mm'lik disk çapı dâhil inhibisyon bölgelerinin çaplarını (mm) göstermektedir.

— ***S.a*****:** *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, **MRSA:** Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, ***S.e*****:** *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, ***S.e****:** *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228

—**A:** Etken madde olmayan krem formülasyonu, **B:** % 0,5 SA içeren krem formülasyonu, **C:** % 0,5 AA içeren krem formülasyonu, **D:** % 1 AA içeren krem formülasyonu, **E:** % 0,5 AA içeren krem formülasyonu + % 0,5 SA içeren krem formülasyonu, **F:** % 10 AA içeren krem formülasyonu, **G:** Klaritromisin (CLR, 15 mcg)

**Tablo 4.56.`**dan da görüleceği üzere; A, B ve C kodlarına sahip krem formülasyonları, çalışılan her iki pH değerinde de, kullanılan bakteriler üzerinde herhangi bir etkinlik göstermezken, D ve E kodlu kremlerin belli pH`larda bazı bakteri türleri üzerinde aktivite gösterdikleri tespit edilmiştir. F kodlu krem formülasyonu (% 10 AA içereğine sahip) ise, daha önce de beliritldiği gibi en fazla antibakteriyel aktiviteye sahip krem olarak belirlenmiştir. Piyasada ticari satışı bulunan AA içeriğine sahip kremlerin, % 10-20 civarında AA içerdikleri dikkate alındığında, bu şekilde bir

sonucun elde edilmiş olması olağandır. Bununla birlikte F kodlu krem formülasyonunun, cilt pH`sı aralığında yer alan besiyerinde (pH 5,6 değerine sahip) daha fazla etkinlik gösterdiği tespit edilmiştir.

Antibakteriyel aktivitesi incelelen madde türlerinin, 4 farklı bakteri türü üzerindeki etkinlikleri dikkate alındığında ise;

— *Staphylococcus aureus ATCC 25923* bakterisi (S.a) üzerinde en fazla antibakteriyel aktivite gösteren türün; 16,5 mm`lik inhibisyon bölge çapına sahip olan F kodlu krem (% 10 AA içren) olduğu, F kodlu krem kadar olmasa da D ve E kodlu kremlerin de antibakteriyel aktivite gösterdikleri tespit edilmiştir.

— Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus ATCC 43300* bakterisi (MRSA) üzerinde en fazla antibakteriyel aktivite gösteren türün; 17,0 mm`lik inhibisyon bölge çapına sahip olan F kodlu kremin (% 10 AA içren) olduğu görülmüştür.

— *Staphylococcus epidermidis ATCC 35984* bakterisi (S.e) üzerinde en fazla antibakteriyel aktivite gösteren türün; 13,5 mm`lik inhibisyon bölge çapına sahip F kodlu kremin (% 10 AA içren) olduğu görülmektedir.

— *Staphylococcus epidermidis ATCC 12228* (S.e*) üzerinde en fazla antibakteriyel aktivite gösteren türün yine; 14,7 mm`lik inhibisyon bölge çapına sahip olan F kodlu kremin (% 10 AA içren) olduğunu göstermektedir.

4.4.7.2. Krem formülasyonlarının mikrodilüsyon broth yöntemi ile antibakteriyel aktivite tayini

Bölüm 3.9.4.2.`de yer alan deneysel prosedür doğrultusunda yürütülen çalışmalarda, 37 °C`de 24 saat süreyle gerçekleştirilen inkübasyon işleminden sonra 600 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerleri, herbir kuyucuktaki krem konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirilerek MİK değerleri hesaplanmaya çalışılmıştır. MİK değerlerinin doğrulanması amacıyla kullanılan TTC yönteminde ise, bakteri üremesinin görülmediği (kırmızı renklenmenin olmadığı) en düşük konsantrasyonu temsil eden kuyucuklar MİK değerleri olarak kabul edilmiştir (Eloff, 1998; Kang ve ark., 2008). Antibakteriyel aktivite tayinleri sırasında mikroplaka kuyucukları içerisine ilave edilen maddelere ilişkin kodlamalar şöyledir:

A : Etken madde olmayan krem

B : % 0,5 SA içren krem

C : % 0,5 AA içeren krem

D : % 1 AA içeren krem

E : % 0,5 AA + % 0,5 SA içeren krem

F : % 10 AA içeren krem

G : % 20 AA içeren ticari olarak satılan krem (AZELDERM)**,**

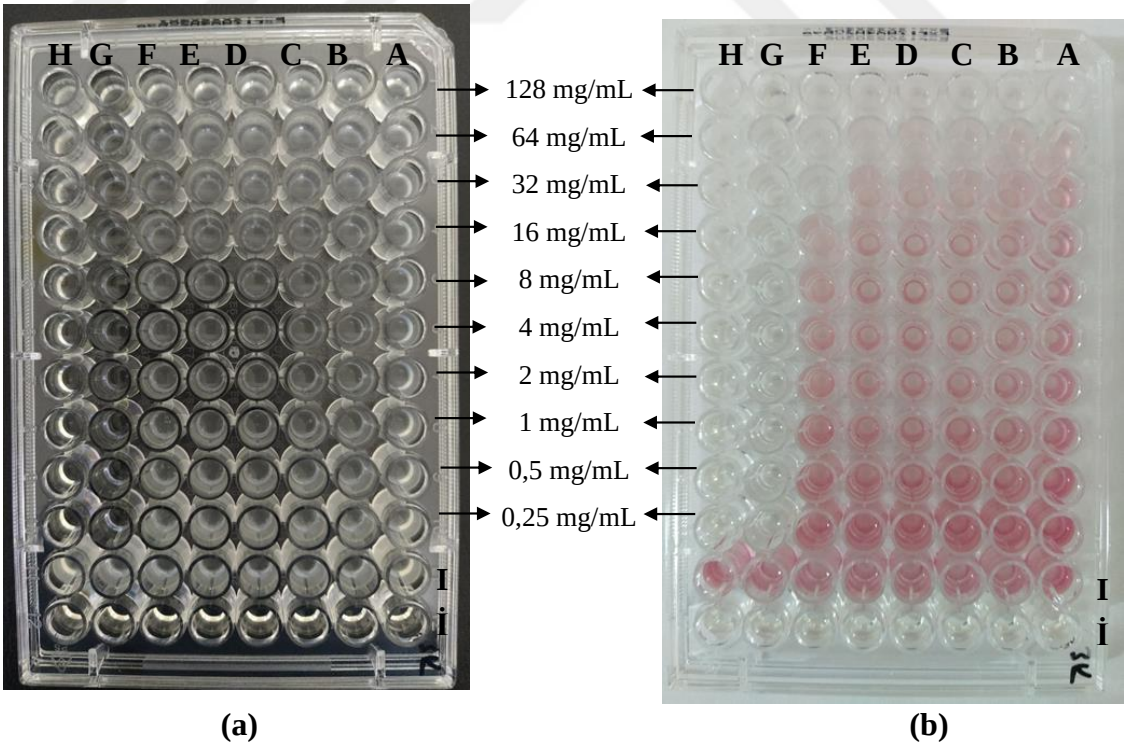
H : % 1 AA içeren ticari olarak satılan kremin seyreltilmesi ile elde edilen krem

I : MHB + bakteri içeren karışım (üreme kontrol)

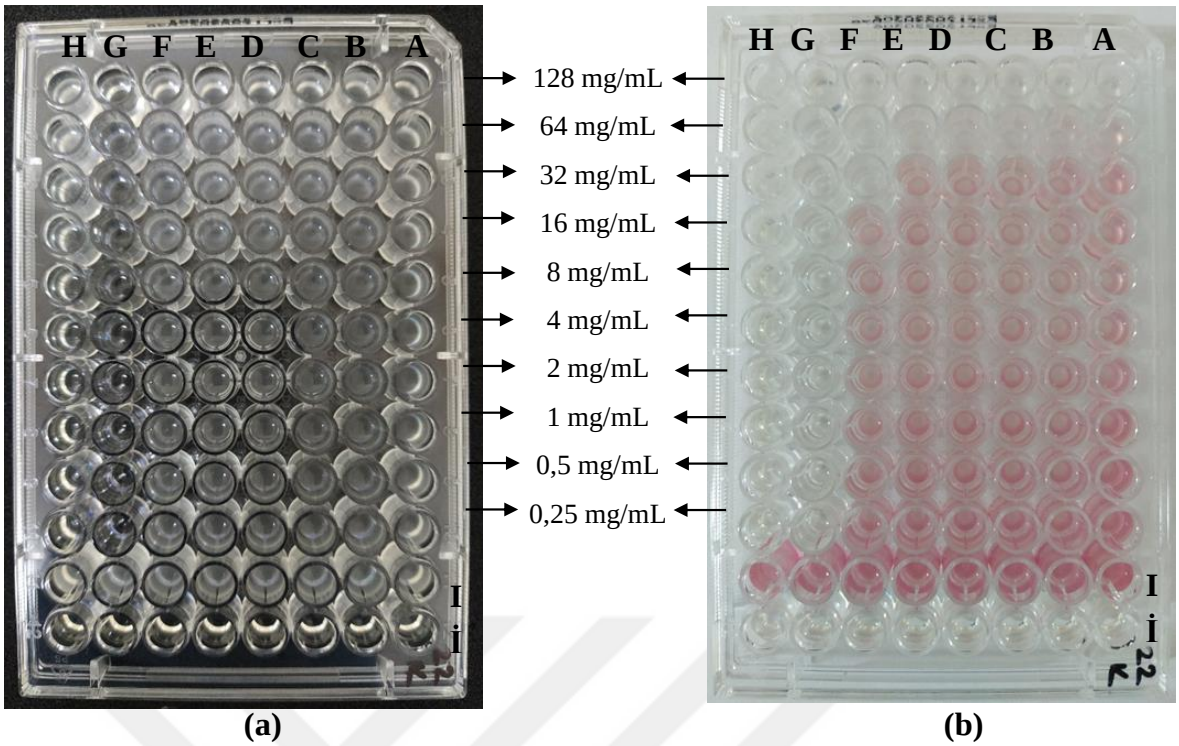
İ : MHB çözeltisi (besiyeri)

Farklı bakteri türleri kullanılarak, farklı pH değerlerine sahip (pH= 5,6 ve pH= 7,3) besiyerleri ile gerçekleştirilen aktivite tayini çalışmaları sonunda; bakterilerin sadece pH= 7,3`e sahip besiyerinde üredikleri gözlemlendiğinden, asidik ortam şartlarında gerçekleştirilen çalışma sonuçları değerlendirilme kapsamına alınmamıştır.

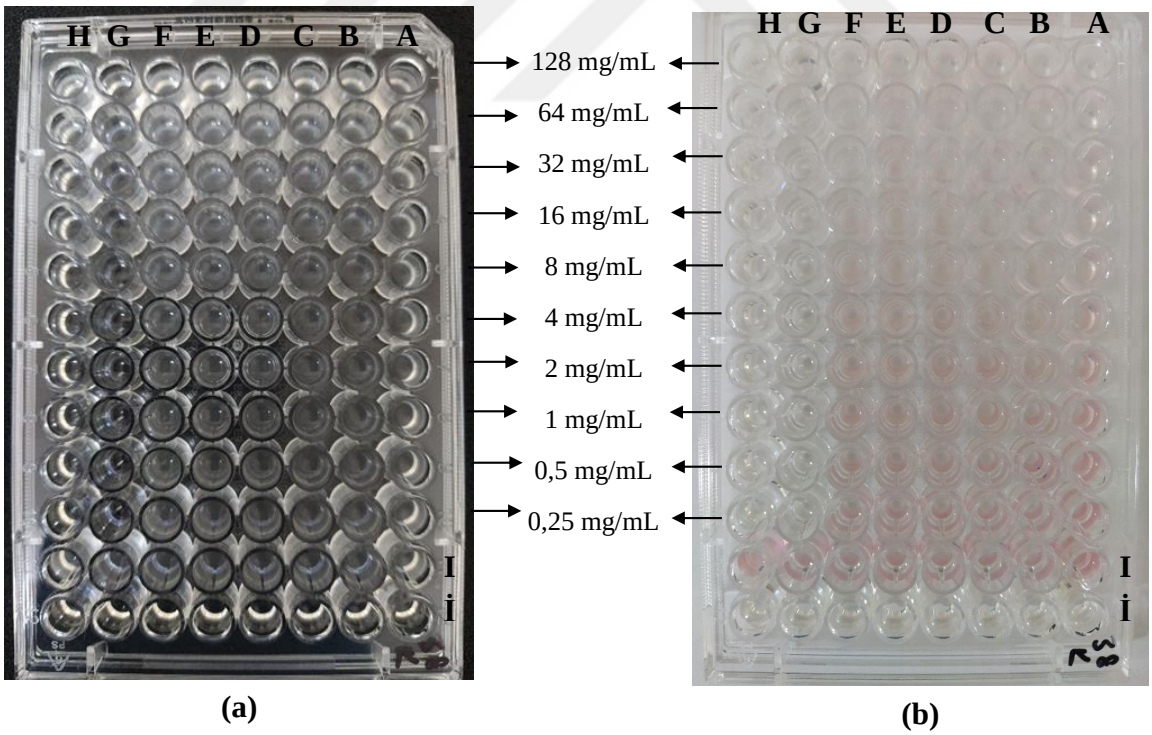
Mikrodilüsyon Broth yöntemi ile antibakteriyel aktivitesi incelenen maddeler için belirlenen MİK değerlerine ait mikroplakaların 24 saat inhibisyon sonrası ve TTC ile boyama sonrasına ait görüntüler **Şekil 4.77.- Şekil 4.80.** de, verilmiştir.



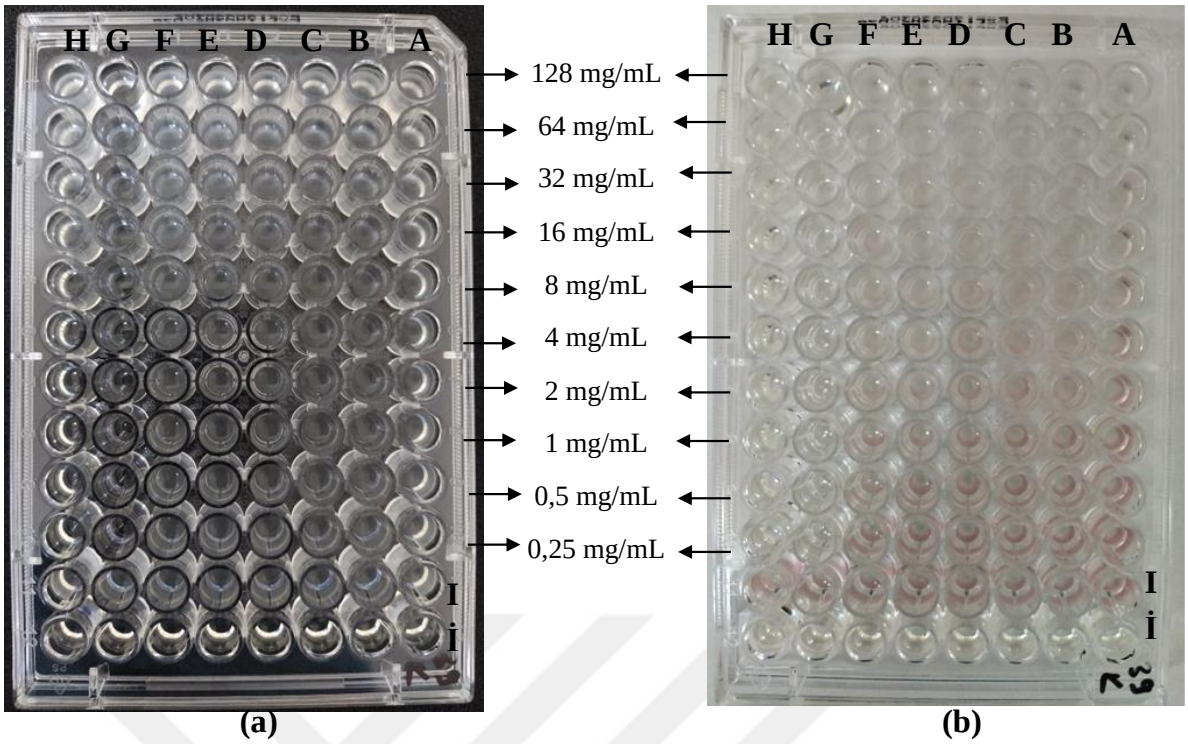
Şekil 4.77. Geliştirilen Krem Formülasyonları İçin *Staphylococcus Aureus* ATCC 25923 Bakterisine Ait (**a)** 24 Saat İnkübasyon Sonrası (**b)** TTC ile Boyanma Sonrası Mikroplaka Görüntüleri



Şekil 4.78. Geliştirilen Krem Formülasyonları İçin MRSA ATCC 43300 Bakterisine Ait **a)** 24 Saat İnkübasyon Sonrası **b)** TTC ile Boyanma Sonrası Mikroplaka Görüntüleri



Şekil 4.79. Geliştirilen Krem Formülasyonları İçin *Staphylococcus Epidermidis* ATTC 35984 Bakterisine Ait **(a)** 24 Saat İnkübasyon Sonrası **(b)** TTC ile Boyanma Sonrası Mikroplaka Görüntüleri



Şekil 4.80. Geliştirilen Krem Formülasyonları İçin *Staphylococcus Epidermidis* ATTC 12228 Bakterisine Ait **(a)** 24 Saat İnkübasyon Sonrası **(b)** TTC ile Boyanma Sonrası Mikroplaka Görüntüleri

Tez kapsamında elde edilen krem formülasyonları ve karşılaştırma amaçlı kullanılan % 20 ve % 1 AA içeriğine sahip ticari krem çözeltileri için, 37 °C`de 24 saat boyunca 96 kuyucuklu mikroplakalarda gerçekleştirilen inkübasyon deneyleri sonrasında yapılan spektroskopik ölçümler ve TTC yöntemi ile doğrulama işlemi sonunda elde edilen MİK değerleri **Tablo. 4.57.**`da verilmiştir.

Tablo 4.57. Geliştirilen Krem Formülasyonları İçin Mikrodilüsyon Broth Yöntemi ile Antibakteriyel Aktivitesi İncelenen Krem Formülasyonları İçin Belirlenen MİK Değerleri (µg/mL)

	Bakteriler			
Kremler	***S. a***	**MRSA**	***S. e***	***S.e****
A	>16000	>16000	>16000	>16000
B	>16000	>16000	>16000	>16000
C	>16000	>16000	>16000	>16000
D	>16000	>16000	>16000	>16000
E	>16000	>16000	>16000	>16000
F	16000	16000	16000	16000
G	<62,5	<62,5	<62,5	<62,5
H	<62,5	<62,5	<62,5	<62,5

S. a: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, **MRSA**: Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, ***S. e*:** *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, ***S. e**:** *Staphylococcus epidermidis* ATCC 1222

A: Etken madde olmayan krem, **B:** % 0,5 SA içren krem, **C:** % 0,5 AA içeren krem, **D:** % 1 AA içeren krem, **E:** % 0,5 AA + % 0,5 SA içeren krem, **F:** % 10 AA içeren krem, **G:** % 20 AA içeren ticari olarak satılan krem (AZELDERM), **H:** AZELDERM`in seyreltilmesi ile elde edilen % 1 AA içeren krem

Tablo 4.57.`den de görüleceği üzere; sadece % 10 ve % 1 AA içeriğine sahip olan ticari krem numunelerinin 16000 µg/mL MİK değerinden düşük bir antibakteriyel etkiye sahip olduğu (< 62,5 µg/mL), tez kapsamında hazırlanan diğer krem formülasyonlarına ait MİK değerlerinin ise >16000 µg/mL olduğu tespit edilmiştir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Sunulan tez çalışmasında; fonksiyonel bir gıda olarak hayatımızda önemli bir yer teşkil eden zeytinyağından, akne başta olmak üzere; yara, yanık, rozasea, melazma, hatta bazı kanser tümörleri üzerinde birçok farmasötik ve kozmesötik etkilere sahip olduğu bilinen AA`nın elde edilmesi, saflaştırılması ve topikal krem formülasyonlarının geliştirilerek, antibakteriyel özelliklerinin *in-vitro* koşullarda incelenmesi amaçlanmıştır.

Belirtilen amaca yönelik tez çalışmasında yer alan her bir aşamadan elde edilen sonuçlar aşağıda kısaca özetlenmiştir:

(i) Zeytinyağı numunelerinden serbest yağ asitlerinin eldesi:

A Naturel Sızma, *B Naturel Sızma* ve *C Riviera* şeklinde kodlandırılan zeytinyağı numunelerinin, etanollü KOH ile sabunlaştırması işleminden elde edilen ve OA eldesinde çıkış maddesi olarak kullanılacak olan serbest yağ asitleri karışımı için % verim değeri; ~120 g yağ numunesinden yola çıkılmış ve zeytinyağı türüne bağlı olmaksızın ~95-103 g serbest yağ asidi elde edilmiş olması dikkate alınarak % 79-86 olarak hesaplanmıştır.

(ii) Serbest yağ asidi karışımlarından OA`nın eldesi ve saflaştırılması:

Farklı çalışma prensibine sahip 3 metodun ***(düşük sıcaklıkta direk kristalizasyon***, ***üre fraksiyonlama*** *ve* ***düşük sıcaklıkta çözücü kristalizasyonu)*** kullanılması ile yürütülen OA eldesi çalışmalarından;

- Yağ asitlerinin, farklı erime noktasına sahip olmaları esasına dayanarak gerçekleştirilen ***düşük sıcaklıkta direk kristalizasyon*** deneyleri sonunda; elde edilen katı kısımda artması, sıvı kısımda ise azalması beklenen doymuş ve tekli doymamış (OA) yağ asidi miktarlarının, hem katı hem de sıvı kısımda birbirlerine oldukça yakın miktarlarda (sırasıyla % 54,40 ve % 52,54) bulundukları görülmüş, ***1. kristalizasyon işlemi*** olarak nitelendirilen bu basamaktan istenilen düzeyde bir ayırma veriminin sağlanamamış olması sebebiyle de, bir ileri ayırma basamağı olan OA`nın doymuş yağ asitlerinden ayrılması basamağına **(*2. kristalizasyon işlemi*)** geçilmemiştir. **Sonuç olarak, DSDKM`nin serbest yağ asidi karışımından OA izolasyonu için uygun bir metot olmadığına karar verilmiştir.**

➢ Tekli doymamış yağ asitlerinin, çoklu doymamış yağ asitlerine kıyasla üre ile daha kararlı kompleksler oluşturması esasına dayanarak gerçekleştirilen ***üre fraksiyonlama*** deneyleri sonunda; doymuş ve tekli doymamış (OA) yağ asitlerinin çoklu doymamış yağ asitlerinden ayrılmasını sağlamak amacıyla gerçekleştirilen ***1. fraksiyonlama işlemi*** sonunda elde edilen katı kısımda (~% 56,81) yer alması beklenen OA`nın sıvı kısımda da büyük oranda kaldığı tespit edilmiş (~% 62,97), istenilen düzeyde bir ön ayırmanın sağlanamamış olması sebebiyle de, bir ileri ayırma basamağı olan OA`nın doymuş yağ asitlerinden ayrılması basamağına (***2. fraksiyonlama işlemi***) geçilmemiştir. **Dolayısıyla, ÜFM`nin serbest yağ asidi karışımından OA izolasyonu için uygun bir metot olmadığına karar verilmiştir.**

➢ Yağ asitlerinin farklı çözücülerde farklı derecelerde çözünmeleri esasına dayanan ve ***çapraz çözücü kristalizasyonu*** ve ***çoklu çözücü kristalizasyonu*** olmak üzere iki farklı prosedüre göre gerçekleştirilen ***düşük sıcaklıkta çözücü kristalizasyonu*** deneylerinden:

- ***Çapraz çözücü kristalizasyonu*** deneylerinde; *aseton* yerine *% 90 metanol çözeltisi* (suda) kullanıldığı durumlarda, biraz daha yüksek saflığa sahip OA`nın elde edilebildiği görülmüş (*aseton* ve *% 90 metanol çözeltisi* ile gerçekleştirilen *1. kristalizasyon işlemi* sonunda elde edilen OA saflığı sırasıyla % 56,99 ve % 61,55) fakat uygulama sırasında; süzme işleminde zorluk yaşanması, su varlığı sebebiyle çok düşük sıcaklık değerlerinde çalışılamaması ve madde miktarında önemli kayıplar meydana gelmesi gibi istenmeyen bazı durumlarla karşılaşıldığı için, **çözücü kristalizasyonu ile OA eldesi için *% 90 metanol çözeltisi* kullanımının uygun olmadığı sonucuna varılmıştır.**

- *Aseton* kullanılarak 4 kez ard arda gerçekleştirilen ***çoklu çözücü kristalizasyonu*** deneylerinde (-80 °C'de) ise, kristalizasyon işlem sayısı arttıkça elde edilen OA`nın saflık derecesinin de arttığı görülmüş; ***1. kristalizasyon işlemi*** *sonunda* % 60,82 olan OA saflık derecesinin, ***4. kristalizasyon işlemi*** sonunda % 83,04 değerine ulaştığı tespit edilmiştir. Standart OA`nın saflık derecesine (% 90,85) oldukça yakın bir değer olan % 83,04 saflık derecesine ulaşılmasını sağlayan ve diğer metotlara kıyasla basit, kolay uygulanabilir ve çevre dostu (çözücülerin geri kazanılabilmesi sebebiyle) bir yöntem olan ***çoklu çözücü kristalizasyonu*** **metodunun, sunulan tez çalışmasında, serbest yağ asidi karışımlarından OA eldesi için en uygun ve verimli metot olduğuna karar verilmiştir**.

(iii) OA`dan AA eldesi ve saflaştırılması:

2 farklı metodun ***(ozon jeneratörü yardımıyla ozonizasyon/parçalama*** ve ***H_2O_2/bir katalizör varlığında oksidasyon/parçalama***) kullanılması ile gerçekleştirilen OA`dan AA eldesi çalışmalarından;

- 0,2 L/dk akış hızına sahip bir ozon jeneratörü ile gerçekleştirilen 36 saatlik ***ozonizasyon/parçalama*** deneyleri sonunda; reaksiyon karışımı içerisinde bulunan AA miktarının oldukça az olduğu (% 0,19), OA`nın % 12,64`lük bir kısmının ise parçalanmadan ortamda kaldığı GC-MS analizleri yardımıyla tespit edilmiştir. Elde edilen reaksiyon karışımı içerinde bulunan AA`nın saflaştırılması amacıyla gerçekleştirilen fraksiyonlu distilasyon prosesi (~295 °C sıcaklıkta, 5-6 saat boyunca) sonunda ise; toplama kabında herhangi bir ürün elde edilememiş, ayrıca uzun süre yüksek sıcaklığa maruz kalan reaksiyon karışımında yanma ve kararmalar görüldüğü için distilasyon işlemine son verilmek zorunda kalınmıştır. Söz konusu sebeplerden dolayı, ***ozon jeneratörü yardımıyla ozonizasyon/parçalama*** **işleminin OA`dan AA eldesi için uygun bir yöntem olmadığına karar verilmiştir.**

- Bir katalizör varlığında, yükseltgen özelliğe sahip maddelerin kullanılması ile OA`nın yapısında bulunan çift bağın ***oksidasyonu/parçalanması*** esasına dayanarak gerçekleştirilen deneylerden;

  - ***OA`nın $H_2O_2/WO_3$ varlığında oksidasyonu/parçalanması*** ve reaksiyon karışımı içerindeki ***AA`nın EtOAc/sıcak su ile saflaştırılması*** basamaklarından oluşan deneyler sonunda; sadece asit ilaveli yürütülen deneylerden oldukça az miktarda ürün elde edildiği gözlenmiş, yapısal kimlik aydınlatılması için gerçekleştirilen ^{1}H-NMR`de analizi sonunda ise, ürünün oldukça fazla safsızlık içerdiği ve saf AA spektrumuna sahip olmadığı görülmüştür. Bu sebeple; ***OA`nın H_2O_2/WO_3 varlığında oksidasyonu/parçalanması sonrası reaksiyon karışımı içerisindeki AA`nın EtOAc/sıcak su ile saflaştırılması gerçekleştirilen prosedürün uygun bir yöntem olmadığına karar verilmiştir.***

  - ***OA`nın $H_2O_2/H_2WO_4$ varlığında oksidasyonu/parçalanması*** ve reaksiyon karışımı içerindeki ***AA`nın $CHCl_3$/sıcak su ile saflaştırılması*** basamaklarından oluşan deneyler sonunda; oksidasyon/parçalama işleminden elde edilen reaksiyon karışımı içerisinde oldukça az miktarda AA bulunduğu (% 0,80), OA`nın % 15,69`lık bir kısmının ise parçalanmadan ortamda kaldığı tespit edilmiştir. AA`nın bu kadar az

miktarda bulunmasının, karışım içerisinde oldukça yüksek miktarlarda olduğu tespit edilen (% 27,96 ve % 22,82) dihidroksi stearik asit (DSA) varlığından kaynaklı olabileceği düşünülmüş ve reaksiyon karışımı içerisindeki DSA varlığı, OA için oksidasyon işleminin gerçekleştiğinin fakat parçalanma işleminin tam olarak gerçekleşmediğinin göstergesi olarak kabul edilmiştir. ***AA`nın $CHCl_3$/sıcak su ile saflaştırılması*** işlemi sonunda ise; iki farklı saflık derecesine sahip AA bileşiği elde edilmiş (*1. kademe*: % 72,68 ; *2. kademe*: % 67,77), AA eldesi için % verim düzeyleri ise sırasıyla; % 2,19 ve % 0,99 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen AA bileşiklerinin yapısal kimliği, ^{1}H-NMR ve ATR-FTIR yöntemlerinin kullanıldığı karakterizasyon çalışmaları ile doğrulanmıştır. **Yürütülen çalışmalar sonunda; su fazından beklendiği gibi yüksek saflıkta AA elde edilebildiği, fakat AA`nın büyük bir kısmının $CHCl_3$ fazına kaçması sebebiyle, elde edilen madde miktarının (% verimin) oldukça düşük olduğu görülmüştür. Bu sebeple; $CHCl_3$ yerine, reaksiyon sonunda elde edilen karışım içerisinde yer alan maddeleri çözecek (AA dışındaki maddeler) fakat AA`yı çözmeyerek sadece su fazında kalmasını sağlayan başka bir çözücü seçiminin yapılması gerektiğine karar verilmiştir.**

- ***OA`nın $H_2O_2$/$H_2WO_4$ varlığında oksidasyonu/parçalanması*** ve reaksiyon karışımı içerindeki ***AA`nın X/sıcak su ile saflaştırılması*** basamaklarından oluşan deneyler sonunda; oksidasyon/parçalama işleminden elde edilen reaksiyon karışımı içerisinde oldukça az miktarda AA bulunduğu (% 17,02), OA`nın % 9,10`luk bir kısmının ise parçalanmadan ortamda kaldığı, AA`ya yakın bir oranda bulunması beklenen PA miktarının ise % 16,64 olduğu tespit edilmiştir. Söz konusu karışım içerisindeki ***AA`nın X/sıcak su ile saflaştırılması*** işlemi sonunda ise (3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir); % 89,34; % 83,03 ve % 98,73 saflık derecesi ve sırasıyla % 12,50; % 10,50 ve % 9,28 verim düzeyine sahip AA bileşikleri elde edilmiştir. Elde edilen AA bileşiklerinin yapısal kimliği, ^{1}H-NMR ve ATR-FTIR yöntemlerinin kullanıldığı karakterizasyon çalışmaları ile doğrulanmıştır. **Yürütülen çalışmalar sonunda; *X/sıcak su ile saflaştırma* prosedürünün oldukça etkili olduğu ve yüksek miktarda & saflıkta AA bileşikleri elde edilebildiği görülmüş, bu sebeple söz konusu metodun, sunulan tez çalışmasında, OA`dan AA eldesi için en uygun ve verimli metot olduğuna karar verilmiştir. AA eldesi ve saflaştırılması için tarafımızdan geliştirilmiş olan bu metot için patent başvurusunda bulunulması düşünülmektedir.**

(iv) Saflaştırılan AA bileşiklerinin antibakteriyel aktivitelerinin in-vitro koşullarda incelenmesi:

OA`nın H_2O_2/H_2WO_4 varlığında oksidasyonu/parçalanması ve sonrasında X/sıcak su ile saflaştırılması prosedürlerinden elde edilen saf AA bileşiğinin antibakteriyel aktivitesi, ***disk difüzyon*** ve ***Mikrodilüsyon Broth yöntemleri*** kullanılarak tayin edilmeye çalışılmış ve elde edilen sonuçlar standart AA ve standart OA`dan elde edilen AA için elde edilen aktivite sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır. Söz konusu antibakteriyel aktivite deneylerinden;

- **Bölüm 3.9.4.1.**`de yer alan deneysel prosedür doğrultusunda yürütülen çalışmalarda, 37 °C`de 24 saat süreyle iki tekrarlı olarak gerçekleştirilen ***Disk difüzyon yöntemi ile antibakteriyel aktivite tayini*** deneyleri sonunda; tez kapsamında elde edilen herbir AA bileşiğinin, incelenen bakteriler için inhibisyon zon bölgesi oluşturduğu gözlenmiş ve antibakteriyel aktiviteye sahip oldukları sonucuna varılmıştır.

İki farklı besiyerinde (pH`sı 5,6 ve 7,3 olan) gerçekleştirilen deneyler sonunda; pH`sı 5,6 olan besiyerinde gözlenen inhibisyon bölgesi çap değerlerinin, pH`sı 7,3 olana kıyasla daha fazla olduğu görülmüş; bu sebeple **aktivitesi incelenen AA bileşiklerinin, cilt pH`sı aralığında daha fazla aktivite gösterdikleri sonucuna varılmıştır.** Ayrıca, inhibisyon bölgeleri için elde edilen çap değerleri değerlendirildiğinde; **tez kapsamında elde edilen tüm AA türlerinin (B, C, D), standart AA`dan (A) daha fazla antibakteriyel aktiviteye sahip oldukları da görülmüştür.**

- ***Mikrodilüsyon Broth yöntemi ile antibakteriyel aktivite tayini***nde, aktivitesi incelenen farklı içerik/konsantrasyona sahip madde (AA bileşikleri) dilüsyonlarının, belirli konsantrasyondaki mikroorganizmalara karşı olan etkisi, 96 kuyucuklu mikroplakalar kullanılarak bir seri seyreltme yöntemi ile incelenmiş ve bakteriyostatik etki gücünün göstergesi olan minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri tespit edilmeye çalışılmıştır. Tez kapsamında elde edilen AA türlerinin antibakteriyel aktivite derecesinin belirlenmesinde karşılaştırma değeri olarak ise, standart AA ve standart OA`dan elde edilen AA için elde edilen aktivite sonuçları kullanılmıştır.

Bölüm 3.9.4.2`de yer alan deneysel prosedür doğrultusunda yürütülen çalışmalarda, 37 °C`de 24 saat süreyle gerçekleştirilen inkübasyon işleminden sonra 600 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerleri, herbir kuyucuktaki madde konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirilmiş ve elde edilen grafikler MİK değerlerinin hesaplanmasında

kullanılmıştır. Ayrıca, MİK değerleri TTC yöntemiyle de doğrulanmış, bakteri üremesinin görülmediği (kırmızı renklenmenin olmadığı) en düşük konsantrasyonu temsil eden kuyucuklar MİK değerleri olarak kabul edilmiştir.

Farklı bakteri türleri kullanılarak, farklı pH değerlerine sahip (pH= 5,6 ve pH= 7,3) besiyerleri ile gerçekleştirilen aktivite tayini çalışmaları sonunda; **bakterilerin asidik besiyeri ortamında üreyemedikleri görülmüş ve MİK değerlerini belirlemede kullanılabilecek kayda değer veriler elde edilememiştir.** Bu sebeple, MİK değerlerinin belirlenmesinde sadece pH= 7,3`e sahip besiyerinin kullanıldığı çalışmalardan elde edilen sonuçlar dikkate alınmıştır.

Gerçekleştirilen deneyler sonunda; tez kapsamında elde edilen AA bileşikleri (B, C ve D) için hesaplanan MİK değerlerinin (1000 µg/mL), standart AA için bulunan MİK değeri ile aynı olduğu görülmüştür. Pozitif kontrol olarak kullanılan Klaritromisin`in MİK değerinin ise; dirençli bakteriler için >128 µg/mL, duyarlı bakteriler için ise <0,25 µg/mL olarak bulunmuştur.

(v) Saflaştırılan AA bileşiklerinin kullanılmasıyla farklı içeriklere sahip topikal krem formülasyonlarının geliştirilmesi ve organoleptik ve fiziksel/kimyasal özelliklerinin incelenmesi:

Tez çalışması kapsamında; etkin madde içeriği bakımından; ***(i)*** sadece AA içeren ***(ii)*** sadece SA içeren ***(iii)*** AA ve SA kombinasyonunu içeren formülasyonlar olmak üzere değişik şekillerde hazırlanan 6 farklı krem formülasyonu geliştirilmiştir; ***Formül-1:*** Etkin madde içermeyen krem, ***Formül-2:*** % 0,5 AA içeren Krem, ***Formül-3:*** % 0,5 SA içeren Krem, ***Formül-4:*** % 0,5 AA + % 0,5 SA içeren Krem, ***Formül-5:*** %1 AA içeren Krem, ***Formül-6:*** %10 AA içeren Krem.

Hazırlanan topikal krem formülasyonları, organoleptik ve fiziksel/kimyasal özelliklerinin belirlenmesi amacıyla, hızlandırılmış stabilite testlerine tabii tutulmuş, 3 aylık bir sürede (12.02.2020-15.05.2020 tarihleri arasında) tamamlanan testler, Dağlar Kozmetik Ürünleri İmalat ve Gıda San. Tic. A.Ş`nin destekleri ile geçekleştirilmiştir.

Herbir krem formülasyonu için, oda şartlarında (25 °C ± 2 sıcaklık ve doğal oda nemi) ve stabilite dolabında (40 °C ± 5 sıcaklık, % 65 ±3 nem ve floresan ışıkta) olmak üzere iki farklı ortamda yürütülen çalışmalar sonunda;

➢ ***Etkin Madde İçermeyen Krem Formülasyonu (Formül-1) için*** test edilen tüm parametrelerin her iki koşulda da ürünün spesifikasyonuna uygun olduğu gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, test edilen parametrelerden ürün viskozitesi, numunenin minimum miktar altında kalması sebebiyle ölçülememiş, diğer parametre değerlerinde ise 4. haftaya kadar majör bir değişiklik gözlemlenmemiştir. 4. haftadan sonra pH ve ağırlık değişiminin kabul kriterinin dışına çıktığı görüldüğü için, **herhangi bir etkin madde içermeyen ürünün maksimum raf ömrünün 12 ay (1 yıl) olarak belirlenmesi ön görülmüştür.**

➢ ***% 0,5 AA içeren krem formülasyonu (Formül-2) için*** test edilen tüm parametrelerin her iki koşulda da ürünün spesifikasyonuna uygun olduğu gözlemlenmiştir. Test edilen parametrelerden ürün viskozitesi dışındaki herhangi bir parametrede değişiklik gözlenmemiş olup, 8. haftaya kadar majör bir değişikliğin olmadığı viskozite değerinin ise, bu haftadan sonra kabul kriterinin dışına çıktığı tespit edilmiştir. Bu sebeple, **% 0,5 AA içeren ürünün maksimum raf ömrünün 18 ay (1,5 yıl) olarak belirlenmesi ön görülmüştür.**

➢ ***% 0,5 SA içeren krem formülasyonu (Formül-3) için*** test edilen tüm parametrelerin her iki koşulda da ürünün spesifikasyonuna uygun olduğu gözlemlenmiştir. Test edilen parametrelerden ürün viskozitesi, numunenin minimum miktar altında kalması sebebiyle ölçülememiş, diğer parametre değerlerinde ise 4. haftaya kadar majör bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Ancak 4. haftadan sonra her iki ortamda da ağırlık değişiminin kabul kriterinin dışına çıktığı görülmüş, bu sebeple **% 0,5 SA içeren ürünün maksimum raf ömrünün 12 ay (1,5 yıl) olarak belirlenmesi ön görülmüştür.**

➢ ***% 0,5 AA + % 0,5 SA içeren Krem Formülasyonu (Formül-4) için*** test edilen tüm parametrelerin her iki koşulda da ürünün spesifikasyonuna uygun olduğu gözlemlenmiştir. Test edilen parametrelerden ürün viskozitesi, numunenin minimum miktar altında kalması sebebiyle ölçülememiş, diğer parametre değerlerinde ise 8. haftaya kadar majör bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Ancak 8. haftadan sonra pH ve ağırlık değişiminin kabul kriterinin dışına çıktığı görülmüş, bu sebeple **% 0,5 AA + % 0,5 SA içeren ürünün maksimum raf ömrünün 18 ay (1,5 yıl) olarak belirlenmesi ön görülmüştür.**

➢ ***% 1 AA içeren Krem Formülasyonu (Formül-5) için*** test edilen tüm parametrelerin her iki koşulda da ürünün spesifikasyonuna uygun olduğu

gözlemlenmiştir. Test edilen parametrelerden ürün viskozitesi, numunenin minimum miktar altında kalması sebebiyle ölçülememiş, diğer parametre değerlerinde ise 12. haftaya kadar majör bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Ancak 12. haftadan sonra her iki ortamda da ağırlık değişiminin kabul kriterinin dışına çıktığı görülmüş, bu sebeple **% 1 AA içeren ürünün maksimum raf ömrünün 24 ay olarak belirlenmesi ön görülmüştür.**

➢ ***% 10 AA içeren Krem Formülasyonu (Formül-5) için*** test edilen tüm parametrelerin her iki koşulda da ürünün spesifikasyonuna uygun olduğu gözlemlenmiştir. Test edilen parametrelerden ürün viskozitesi, numunenin minimum miktar altında kalması sebebiyle ölçülememiştir. Oda koşullarında bekletilen ürünün parametre değerlerinin 12 hafta boyunca kabul kriterinin dışına çıkmadığı görülürken, stabilite kabininde bekletilen ürünün pH ve ağırlık değişimi verilerinde ise 8. hafta itibariyle majör değişiklikler olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca 8. hafta itibariyle, stabilite kabininde bekletilen üründe ayrışmanın olduğu da saptanmıştır. Söz konusu sebeplerle, **% 10 AA içeren ürünün maksimum raf ömrünün 18 ay olarak belirlenmesi ön görülmüştür.**

(vi) **Geliştirilen topikal krem formülasyonlarının antibakteriyel aktivitelerinin *in-vitro* koşullarda incelenmesi**

Tez kapsamında geliştirilen krem formülasyonlarının antibakteriyel aktivite tayinleri de ***disk difüzyon*** ve ***Mikrodilüsyon Broth yöntemleri*** kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

➢ Farklı içeriklere sahip krem formülasyonlarının (A, B, C, D, E ve F) ***Disk difüzyon yöntemi ile antibakteriyel aktivite tayinlerinde;*** yine oluşturmuş oldukları inhibisyon zon bölgeleri dikkate alınmış, özellikle **F koduna sahip olan (% 10 AA içeren) kremin, deney prosedüründe kullanılan 4 farklı bakteri için de, çalışılan her iki pH değerinde (pH= 7,3`e kıyasla pH 5,6 değerinde daha etkin) inhibisyon zon bölgesi oluşturduğu gözlendiğinden, en fazla antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu sonucuna varılmıştır.** Piyasada ticari satışı bulunan AA içeriğine sahip kremlerin, % 10-20 civarında AA içerdikleri dikkate alındığında, böyle bir sonucun elde edilmiş olması normal karşılanmıştır.

Ayrıca, aktivitelerin değerlendirilmesinde, bir kumpas/cetvel yardımıyla ölçülerek sayısal hale dönüştürülen inhibisyon bölgelerine ait çap değerlerinden de faydalanılmış, elde edilen inhibisyon bölgesi çap değerleri dikkate alındığında; **A, B ve C kodlarına sahip krem formülasyonlarının, çalışılan her iki pH değerinde de, kullanılan**

bakteriler üzerinde herhangi bir etkinlik göstermediği, D ve E kodlu kremlerin ise belli pH`larda bazı bakteri türleri üzerinde aktivite gösterdikleri tespit edilmiştir.

➢ Geliştirilen krem formülasyonlarının (A, B, C, D, E ve F) ***Mikrodilüsyon Broth yöntemi ile antibakteriyel aktivite tayini***nde, % 20 ve % 1 AA içeriğine sahip ticari krem çözeltileri karşılaştırma amaçlı kullanılmıştır. Farklı pH değerlerinde gerçekleştirilen deneylerde, bakterilerin sadece pH= 7,3`e sahip besiyerinde üredikleri gözlemlendiğinden, asidik ortam şartlarında (pH= 5,6) gerçekleştirilen çalışma sonuçları değerlendirilme kapsamına alınmamıştır. Gerçekleştirilen deneyler sonunda; **sadece % 10 ve % 1 AA içeriğine sahip olan ticari krem numunelerinin 16000 µg/mL MİK değerinden düşük bir antibakteriyel aktivite değerine sahip olduğu (< 62,5 µg/mL), tez kapsamında hazırlanan diğer krem formülasyonlarına ait MİK değerlerinin ise >16000 µg/mL olduğu tespit edilmiştir.**

5.2. Öneriler

Doğal bir kaynak ve fonksiyonel bir gıda olarak hayatımızda önemli bir yer teşkil eden zeytinyağından, farklı terapötik ve kozmesötik etkilere sahip olduğu bilinen azelaik asidin (AA) elde edilmesi, saflaştırılması ve topikal krem formülasyonlarının geliştirilerek, antibakteriyel özelliklerinin *in-vitro* koşullarda incelenmesi amacıyla gerçekleştirilen bu tez çalışması; konusu itibariyle, hem son zamanların önemli ilgi alanlarından biri olan doğal kaynakların etkin bir şekilde değerlendirilmesinin önemi ve gerekliliğine vurgu yapmakta, hem de Ülkemizin hammadde bakımından dışa bağlı olduğu ilaç ve kozmetik sektörlerine yeni bir hammadde kazandırma gibi milli bir sorumluluğu yerine getirmektedir. Azelaik asidin yanı sıra tez kapsamında elde edilen bir diğer hammadde ise; gıda, sağlık ve kozmetik gibi sektörlerde önemli bir kullanım potansiyeline sahip olan oleik asittir.

Görüldüğü üzere, sunulan bu tez çalışması kapsamında; çoğunlukla bir gıda maddesi olarak değerlendirilen zeytinyağından, değişik alanlarda kullanılabilecek özellikte iki farklı hammadde elde edilmiş, ayrıca bu maddelerden azelaik asidin etkin madde olarak yer aldığı; akne, rozasea, malezma gibi birçok cilt rahatsızlıklarının tedavisinde/iyileştirilmesinde kullanılabilecek nitelikte kozmesötik bir ürün de geliştirilmiştir. Ayrıca, tez kapsamında azelaik asit izolasyonu için kullanılan yöntemlerden biri ilk kez tarafımızdan uygulanmış olup, kayıt altına alınması için patent başvurusunda bulunulması da düşünülmektedir.

Azelaik asidin, endüstriyel ölçekte, oleik asitten üretilen bir bileşik olduğu göz önünde bulundurulduğunda; bu tez kapsamında elde edilen yüksek saflıktaki AA bileşiğinin, oleik asit içeriği yüksek olan başka doğal kaynaklardan (kanola yağı, fındık yağı vb.) ve/veya bazı proseslerde yan ürün olarak elde edilen atıklardan (deodorize distilat vb.) da elde edilebileceği öngörülmektedir.

Sunulan bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar ve literatürde yer alan benzer çalışmalar göstermektedir ki; hayatımızda farklı amaçlar için kullanmakta olduğumuz birçok doğal kaynak; ilaç, gıda, tarım ve kozmetik gibi potansiyel sektörler için hammadde olabilecek nitelikte birçok değerli bileşeni bünyesinde bulundurmaktadır. Dolayısıyla, söz konusu değerli bileşenleri içeren bu kaynakların doğru olarak tespitlerinin yapılması ve etkin & akılcı bir şekilde değerlendirilerek, ticari potansiyeli yüksek ürünlere dönüştürülmesi gerekmektedir. Bu bağlamda; doğal kaynaklar bakımından oldukça zengin bir potansiyele sahip olan Ülkemiz kaynaklarının da doğru ve etkin bir biçimde kullanılması gerektiği aşikardır. Böylece, Türkiye'nin 2023 vizyonuna ulaşmasına katkı sağlayacak ve milli & yerli üretim kapasitesinin artırılmasına destek verecek yüksek katma değerli bileşiklerin/ürünlerin elde edilebilmesi ve ülke ekonomisine önemli katkılarda bulunulması da mümkün olabilecektir.

KAYNAKLAR

Ab Rani, M. A., Asim, N., Lazim, N. A., Badiei, M. ve Yarmo, M. A., 2008a, Ozonolysis of oleic acid over a nanovanadium pentoxide (V 2 O 5) catalyst, *European Journal of Scientific Research*, 24 (3), 428-432.

Ab Rani, M. A., Asim, N., Lazim, N. A., Badiei, M. ve Yarmo, M. A. J. E. J. o. S. R., 2008b, Ozonolysis of oleic acid over a nanovanadium pentoxide (V 2 O 5) catalyst, 24 (3), 428-432.

Abidi, S., 2001, Chromatographic analysis of plant sterols in foods and vegetable oils, *Journal of chromatography A*, 935 (1-2), 173-201.

Akamatsu, H., Komura, J., Asada, Y., Miyachi, Y. ve Niwa, Y., 1991, Inhibitory effect of azelaic acid on neutrophil functions: a possible cause for its efficacy in treating pathogenetically unrelated diseases, 283 (3), 162-166.

Al-Azzawie, H. F. ve Alhamdani, M.-S. S., 2006, Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits, 78 (12), 1371-1377.

Al-Rimawi, F., Abadi, J. ve Afaneh, I., 2015, Development and Validation of a Reversed-Phase HPLC Method for Determination of Elaidic Acid in Oils and Fats.

Aladedunye, F. ve Przybylski, R., 2013, Frying stability of high oleic sunflower oils as affected by composition of tocopherol isomers and linoleic acid content, *Food chemistry*, 141 (3), 2373-2378.

Alonso, A., Ruiz-Gutierrez, V. ve Martínez-González, M. Á. J. P. h. n., 2006, Monounsaturated fatty acids, olive oil and blood pressure: epidemiological, clinical and experimental evidence, 9 (2), 251-257.

AOCS, O., 1998, methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society, *American Oil Chemists' Society, Champaign, IL, USA*.

Armstrong, E. ve Hilditch, T., 1925, A new method of ascertaining the position of the ethylenic linkage in acids of the oleic series, 44, 43-47.

Bahadi, M., Yusoff, M. F., Salimon, J., Japir, A. A.-W. ve Darfizzi, D., 2019, Optimization of Low-Temperature Methanol Crystallization for Unsaturated Fatty Acids Separation from Crude Palm Fatty Acids Mixture Using Response Surface Methodology, *Asian Journal of Chemistry*.

Barberger-Gateau, P., Raffaitin, C., Letenneur, L., Berr, C., Tzourio, C., Dartigues, J.-F. ve Alpérovitch, A., 2007, Dietary patterns and risk of dementia: the Three-City cohort study, 69 (20), 1921-1930.

Bauer, A., 1966, Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method, *Am J clin pathol*, 45, 149-158.

Bauer, A., Kirby, W., Sherris, J. C. ve Turck, M., 1966, Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method, *American journal of clinical pathology*, 45 (4_ts), 493-496.

Bayram, B. ve Özçelik, B., 2012, Zeytinyağının biyoaktif bileşenleri ve sağlık üzerine yararları, 10 (1), 77-84.

Benessere, V., Cucciolito, M. E., De Santis, A., Di Serio, M., Esposito, R., Ruffo, F. ve Turco, R., 2015, Sustainable process for production of azelaic acid through oxidative cleavage of oleic acid, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 92 (11-12), 1701-1707.

Bershad, S. V. J. T. M. S. J. o. M., 2001, The modern age of acne therapy.

Bianco, A. ve Uccella, N., 2000, Biophenolic components of olives, *Food Research International*, 33 (6), 475-485.

Boskou, D., 2000, Olive oil, *World review of nutrition*, 87, 56-77.

Boskou, D., Blekas, G. ve Tsimidou, M., 2006, Olive oil composition, In: Olive Oil, Eds: Elsevier, p. 41-72.

Bozdoğan, D., Ünsal, S. ve Tatlı, A., 2010, Zeytinyağı Tağşişinin Belirlenmesinde Kullanılan Kriterler.

Breathnach, A., 1999, Azelaic acid: potential as a general antitumoural agent, 52 (3), 221-226.

Brenna, E., Colombo, D., Di Lecce, G., Gatti, F. G., Ghezzi, M. C., Tentori, F., Tessaro, D. ve Viola, M., 2020, Conversion of Oleic Acid into Azelaic and Pelargonic Acid by a Chemo-Enzymatic Route, *Molecules*, 25 (8), 1882.

Brown, J. ve Shinowara, G., 1937, Studies on the Chemistry of the Fatty Acids. II. The Preparation of Pure Oleic Acid by a Simplified Method1, *Journal of the American Chemical Society*, 59 (1), 6-8.

Brown, J., 1941, Low-temperature Crystallization of the Fatty Acids and Glycerides, *Chemical Reviews*, 29 (2), 333-354.

Burchacka, E., Potaczek, P., Paduszyński, P., Karłowicz-Bodalska, K., Han, T. ve Han, S., 2016a, New effective azelaic acid liposomal gel formulation of enhanced pharmaceutical bioavailability, *Biomedicine Pharmacotherapy*, 83, 771-775.

Burchacka, E., Potaczek, P., Paduszyński, P., Karłowicz-Bodalska, K., Han, T., Han, S. J. B. ve Pharmacotherapy, 2016b, New effective azelaic acid liposomal gel formulation of enhanced pharmaceutical bioavailability, 83, 771-775.

Canbaş, A., 1983, Şaraplarda fenol bileşikleri ve bunların analiz yöntemleri, (279).

Capuzzi, L. ve Digioia, F., 2020, Process for the preparation of purified dicarboxylic acids, Google Patents.

Cavicchini, S. ve Caputo, R., 1989, Long-term treatment of acne with 20% azelaic acid cream, 143, 40-44.

Cemeroğlu, B., Yemenicioğlu, A. ve Özkan, M., 2009, Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi: Meyve ve Sebzelerin Bileşimi, Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları.

Chien, A. L., Qi, J., Rainer, B., Sachs, D. L. ve Helfrich, Y. R., 2016, Treatment of acne in pregnancy, *The Journal of the American Board of Family Medicine*, 29 (2), 254-262.

Christie, W. W., Fatty Acid Analysis by HPLC.

Cicerale, S., Conlan, X. A., Sinclair, A. J. ve Keast, R. S., 2008, Chemistry and health of olive oil phenolics, 49 (3), 218-236.

Cohen, A. F. ve Tiemstra, J. D., 2002, Diagnosis and treatment of rosacea, *The Journal of the American Board of Family Practice*, 15 (3), 214-217.

Dağlıoğlu, M. ve Taşan, O., Trans Yağ Asitlerinin Yapısı, Oluşumu ve Gıdalarla Alınması, *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 2 (1), 79-88.

Davidson, W. S., Saxena, R. ve Gupta, R., 1999, The fungistatic action of oleic acid, 1137-1140.

De la Torre-Carbot, K., Jauregui, O., Gimeno, E., Castellote, A. I., Lamuela-Raventós, R. M. ve López-Sabater, M. C., 2005, Characterization and quantification of phenolic compounds in olive oils by solid-phase extraction, HPLC-DAD, and HPLC-MS/MS, *Journal of agricultural food chemistry*, 53 (11), 4331-4340.

Devaraj, S., Autret, B. C. ve Jialal, I., 2006, Reduced-calorie orange juice beverage with plant sterols lowers C-reactive protein concentrations and improves the lipid profile in human volunteers, *The American journal of clinical nutrition*, 84 (4), 756-761.

Dubois, V., Breton, S., Linder, M., Fanni, J. ve Parmentier, M., 2007, Fatty acid profiles of 80 vegetable oils with regard to their nutritional potential, *European Journal of Lipid Science Technology*, 109 (7), 710-732.

Earle, F. ve Milner, R., 1940, A crystallization method for the determination of saturated fatty acids in soybean oil, *Oil and Soap*, 17 (5), 106-108.

Ellingboe, E. K., 1940, Nitric acid oxidation of oleic and other fatty acids, Google Patents.

Eloff, J. N., 1998, A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria, *Planta medica*, 64 (08), 711-713.

Enferadi-Kerenkan, A., Ello, A. S. ve Do, T.-O., 2017, Synthesis, organo-functionalization, and catalytic properties of tungsten oxide nanoparticles as heterogeneous catalyst for oxidative cleavage of oleic acid as a model fatty acid into diacids, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 56 (38), 10639-10647.

Erinç, H., İşler, İ. H. ve Salur, F., 2019, Linoleik Asidin Saflaştırılmasında Düşük Sıcaklık Kristalizasyon Yönteminin Etkinliği, *Food Health*, 5 (1), 30-38.

Evans, P. W., 1958, Separation of mixed fatty acids, Google Patents.

Fala, L., Finacea (Azelaic Acid) Foam the Newest Topical Treatment FDA Approved for the Treatment of Inflammatory Lesions of Rosacea.

Faydaoğlu, E. S., Metin Saip 2011, Geçmişten günümüze tıbbi ve aromatik bitkilerin kullanılması ve ekonomik önemi, *Kastamonu Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, 11 (1), 52-67.

Fernandez-Martinez, J., Jimenez Ramirez, A., Dominguez Gimenez, J. ve Alcántara, M., 1986, Temperature effect on the oleic and linoleic acids of three genotypes in sunflower.

Fitzpatrick, J. ve Myers, L. D., 1948, Method of oxidizing unsaturated fatty bodies, Google Patents.

Gamel, T., Kiritsakis, A. ve Petrakis, C., 1999, Efecto de extractos fenólicos en la formación de ácidos grasos trans durante la fritura: Effect of phenolic extracts on trans fatty acid formation during frying, 50 (6), 421-425.

Gezgin, D., 2007, Bitki mitosları, Sel Yayıncılık, p.

Ghoreishi, K. B., Nilofar, A. ve Yarmo, M. A., 2012, V2O5-Polyaniline nanocomposite as a catalyst for heterogeneous ozonolysis of oleic acid, *Advanced Materials Research*, 217-221.

Godard, A., De Caro, P., Thiebaud-Roux, S., Vedrenne, E. ve Mouloungui, Z. J. J. o. t. A. O. C. S., 2013, New environmentally friendly oxidative scission of oleic acid into azelaic acid and pelargonic acid, 90 (1), 133-140.

Goebel, C. G., Brown, A. C., Oehlschlaeger, H. F. ve Rolfes, R. P., 1957, Method of making azelaic acid, Google Patents.

Göğüş, F., Özkaya, M. T. ve Ötleş, S., 2009, Zeytinyağı, *Maltepe/ANKARA*, Eflatun yayinevi, p.

Gölükcü, M., Tokgöz, H., Toker, R., Çelikyurt, M. ve Tuğrulay, S. J. B., Antalya, 2012, Tıbbi ve aromatik bitki işletmelerinin yapısal analizi.

Granados-Principal, S., Quiles, J. L., Ramirez-Tortosa, C. L., Sanchez-Rovira, P. ve Ramirez-Tortosa, M. C., 2010, Hydroxytyrosol: from laboratory investigations to future clinical trials, 68 (4), 191-206.

Grimes, P. E., 1995, Melasma: etiologic and therapeutic considerations, *Archives of dermatology*, 131 (12), 1453-1457.

Gümüş, C. E., 2012, Presleme ve çözgen ekstraksiyonu ile elde edilen fındık yağlarının sterol ve mumsu madde bileşimlerinin karşılaştırılması, *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı*.

Gümüşkesen, A., 1999, Bitkisel Yağ Teknolojisi. Asya Tıp Yayıncılık Ltd. Şti, *ISBN 975-941208-0-5*.

Gupta, A. K. ve Gover, M. D., 2007, Azelaic acid (15% gel) in the treatment of acne rosacea, *International journal of Dermatology*, 46 (5), 533-538.

Güzel, M., 2016, Aspir ıslahında klasik ve moleküler yöntemlerden yararlanılarak oleik asit oranının kalıtımının belirlenmesi, *Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*.

Hallikainen, M., Lyyra-Laitinen, T., Laitinen, T., Ågren, J. J., Pihlajamäki, J., Rauramaa, R., Miettinen, T. A. ve Gylling, H., 2006, Endothelial function in hypercholesterolemic subjects: effects of plant stanol and sterol esters, 188 (2), 425-432.

Hao, J., Shen, W., Yu, G., Jia, H., Li, X., Feng, Z., Wang, Y., Weber, P., Wertz, K. ve Sharman, E., 2010, Hydroxytyrosol promotes mitochondrial biogenesis and mitochondrial function in 3T3-L1 adipocytes, *The Journal of nutritional biochemistry*, 21 (7), 634-644.

Hashim, Y. Z., Eng, M., Gill, C. I., McGlynn, H. ve Rowland, I. R., 2005, Components of olive oil and chemoprevention of colorectal cancer, *Nutrition reviews*, 63 (11), 374-386.

İlyasoğlu, H., 2010, Ayvalık Ve Memecik Zeytinyağlarının Coğrafi İşaretleme Amacıyla Karakterizasyonu, *Fen Bilimleri Enstitüsü*, 10-12.

İriş, E., 2008, Çeşitli çözücülerle ayçiçek yağı içeren binari karışımların yoğunlukları, aşırı molar hacimleri ve sıcaklık bağımlılıkları.

Jang, Y.-W., Jung, J.-Y., Lee, I.-K., Kang, S.-Y. ve Yun, B.-S., 2012, Nonanoic acid, an antifungal compound from Hibiscus syriacus Ggoma, *Mycobiology*, 40 (2), 145-146.

Japir, A., Salimon, J., Derawi, D., Yahaya, B., Jamil, M. ve Yusop, M., 2018a, Optimization of methanol crystallization for highly efficient separation of palmitic acid from palm fatty acid mixture using response surface methodology, *Grasas y Aceites*, 68 (4), 224.

Japir, A. A.-W., Salimon, J., Derawi, D., Yahaya, B. H., Bahadi, M., Al-Shuja'a, S. ve Yusop, M. R., 2018b, A highly efficient separation and physicochemical characteristics of saturated fatty acids from crude palm oil fatty acids mixture using methanol crystallisation method, *OCL*, 25 (2), A203.

Johnson, R., 1984, The chemistry of dibasic and polybasic fatty acids, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 61 (2), 241-246.

Kadhum, A. A. H., Wasmi, B. A., Mohamad, A. B., Al-Amiery, A. A. ve Takriff, M. S. J. R. o. C. I., 2012, Preparation, characterization, and theoretical studies of azelaic acid derived from oleic acid by use of a novel ozonolysis method, 38 (2), 659-668.

Kakita, L., 1997, Azelaic acid in the treatment of acne, rosacea, and hyperpigmentary skin diseases, 14, 251-266.

Kang, M.-S., Choi, E.-K., Choi, D.-H., Ryu, S.-Y., Lee, H.-H., Kang, H.-C., Koh, J.-T., Kim, O.-S., Hwang, Y.-C. ve Yoon, S.-J., 2008, Antibacterial activity of pyrrolidine dithiocarbamate, *FEMS microbiology letters*, 280 (2), 250-254.

Kar, S. E., 2009, Mısır Yağından Konjuge Linoleik Asit Üretimi Ve Zenginleştirilmesi, *Fen Bilimleri Enstitüsü*.

Kara, H. H., 2011, Farklı hasat dönemlerinde ve günün belli saatlerinde toplanan zeytin çeşitlerinden elde edilen yağların Uçucu aroma bileşenleri değişiminin araştırılması, *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı*.

Katsambas, A., Graupe, K. ve Stratigos, J., 1989, Clinical studies of 20% azelaic acid cream in the treatment of acne vulgaris. Comparison with vehicle and topical tretinoin, *Acta dermato-venereologica. Supplementum*, 143, 35-39.

Kayahan, M., 2003, Yağ Kimyası, ODTÜ Yayıncılık, Ankara.

Keçeli, T. ve Demirtaş, E. T., 2008, Zeytinyağinin beslenme ve biyolojik değeri.

Keykubat, B., 2016, Tibbi aromatik bitkiler ve iyi yaşam, *Ticaret Borsası Ar-Ge Müdürlüğü, İZMİR*.

Kiriş, B., 2008, Oleik asitin dimerizasyonu ve reaksiyon kinetiğinin incelenmesi, *İstanbul Üniversitesi* Fen Bilimleri Enstitüsü, 18-19.

Kiritsakis, A. K., 1998, Olive oil: from the tree to the table, Food & Nutrition Press, p.

Köckritz, A., Blumenstein, M. ve Martin, A., 2010, Catalytic cleavage of methyl oleate or oleic acid, *European journal of lipid science and technology*, 112 (1), 58-63.

Koçyiğit, M., 2005, Yalova İlinde Etnobotanik Bir Araştırma, , *İstanbul Üniversitesi* Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

Konuşkan, D. B. ve Altan, A. J. G., 2008, Zeytin ve zeytinyağında doğal olarak bulunan biyoaktif bileşikler ve fizyolojik etkileri, 33 (6), 297-302.

Konuşkan, D. B. ve Canbaş, A., 2008, HATAY'DA YETİŞTİRİLEN HALHALI, SARI HAŞEBİ VE GEMLİK ZEYTİN ÇEŞİTLERİNİN BAZI FİZİKSEL ÖZELLİKLERİNİN VE YAĞ VERİMLERİNİN BELİRLENMESİ.

Krautheim, A. ve Gollnick, H. P. J. C. i. d., 2004, Acne: topical treatment, 22 (5), 398-407.

Kuceski, V. P., 1962, Removal of nitrogen compounds, Google Patents.

Lajara, J. R., Diaz, U. ve Quidiello, R. D., 1990, Definite influence of location and climatic conditions on the fatty acid composition of sunflower seed oil, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 67 (10), 618-623.

Lazim, N. A., Asim, N., Ab Rani, M. A., Ahmadzadeh, A., Yarmo, M. A. ve Radiman, S., 2008, Investigation of nanoscale tungsten (VI) Oxide as a catalyst for the ozonolysis of oleic acid, *European Journal of Scientific Research*, 24 (4), 463-467.

Le Floch, F., Tena, M., Rıos, A. ve Valcarcel, M., 1998, Supercritical fluid extraction of phenol compounds from olive leaves, *Talanta*, 46 (5), 1123-1130.

Lezcano, I., Nuñez, N., Espino, M., Gómez, M. J. O. s. ve engineering, 2000, Antibacterial Activity of Ozonized Sunflower Oil, Oleozón, against Staphylococcus Aureus and Staphylococcus Epidermidis, 22 (2), 207-214.

Loder, D. J. ve Salzberg, P. L., 1942, Catalytic oxidation, Google Patents.

Maddin, S., 1999, A comparison of topical azelaic acid 20% cream and topical metronidazole 0.75% cream in the treatment of patients with papulopustular rosacea, *Journal of the American Academy of Dermatology*, 40 (6), 961-965.

Masyithah, Z., Sitohang, L. V. ve Sihombing, M. P., 2017, Synthesis of azelaic acid from oleic acid with green oxidant H2O2/H2WO4, 12, 7031-7038.

Masyithah, Z. ve Ginting, A., 2018, Optimization of A Two-Step Method to Synthesize Azelaic Acid from Oleic Acid, *Oriental Journal of Chemistry*, 34 (3), 1249.

Matos, L. C., Cunha, S. C., Amaral, J. S., Pereira, J. A., Andrade, P. B., Seabra, R. M. ve Oliveira, B. P., 2007, Chemometric characterization of three varietal olive oils (Cvs. Cobrançosa, Madural and Verdeal Transmontana) extracted from olives with different maturation indices, *Food chemistry*, 102 (1), 406-414.

Mayer-da-Silva, A., 1989, Azelaic acid: pharmacology, toxicology and mechanism of action in acne, 1 (sup1), 11-15.

Mazurek, K. ve Pierzchała, E., 2016a, Comparison of efficacy of products containing azelaic acid in melasma treatment, *Journal of cosmetic dermatology*, 15 (3), 269-282.

Mazurek, K. ve Pierzchała, E. J. J. o. c. d., 2016b, Comparison of efficacy of products containing azelaic acid in melasma treatment, 15 (3), 269-282.

Min, D. B. S., Thomas H. Chang, Stephen S., 1989, Flavor chemistry of lipid foods, The American Oil Chemists Society, p.

Mingrone, G., Greco, A., Nazzaro-Porro, M. ve Passi, S., 1983, Toxicity of azelaic acid, *Drugs under Experimental and Clinical Research*, 9 (6), 447-455.

Mistry, A. ve Ravikumar, P., 2016, Development and evaluation of azelaic acid based ethosomes for topical delivery for the treatment of acne, *Indian J Pharm Educ Res*, 50 (3), S232-243.

Monomers, C., 1972, JK Stille, TW Campbell, Wiley, New Yokr.

Morelló, J.-R., Motilva, M. a.-J., Tovar, M. a.-J. ve Romero, M. a.-P., 2004, Changes in commercial virgin olive oil (cv Arbequina) during storage, with special emphasis on the phenolic fraction, *Food Chemistry*, 85 (3), 357-364.

Mularczyk, E. ve Drzymala, J., 1989, Separation of oleic acid from fatty acid impurities, *Separation Science and Technology*, 24 (1-2), 151-155.

Mumkaya, G., 2012, Antik çağda Batı Anadolu'da zeytin ve zeytincilik, *Selçuk Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü*.

Nas, S. ve Gökalp, H. Y., 2001, Bitkisel yağ teknolojisi, Atatürk Üniversitesi Yayınları, p.

Nazzaro-Porro, M., 1983, Process for the treatment of acne, Google Patents.

Nazzaro-Porro, M., 1987, Azelaic acid, *Journal of the American Academy of Dermatology*, 17 (6), 1033-1041.

Nicolosi, R. J., Stucchi, A. F. ve Loscalzo, J., 1991, Effect of dietary fat saturation on low-density lipoprotein metabolism, 77-82.

Oehlschlaeger, H. F. ve Rodenberg, H. G., 1968, Process for the production of a purified grade of azelaic acid by treatment with ozone during purification, Google Patents.

Ortíz, C. L., Moya, M. P. ve Navarro, V. B., 2006, A rapid chromatographic method for simultaneous determination of β-sitosterol and tocopherol homologues in vegetable oils, *journal of Food Composition Analysis*, 19 (2-3), 141-149.

Owen, R., Giacosa, A., Hull, W., Haubner, R., Spiegelhalder, B. ve Bartsch, H., 2000a, The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil, *European Journal of Cancer*, 36 (10), 1235-1247.

Owen, R., Mier, W., Giacosa, A., Hull, W., Spiegelhalder, B. ve Bartsch, H., 2000b, Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignansand squalene, *Food Chemical Toxicology*, 38 (8), 647-659.

Özata, E. ve Cömert, M., 2016, Zeytinyağı ve Sağlıklı Yaşam, *Zeytin Bilimi*, 6 (2), 105-110.

Özdemir, N. ve Denkbaş, E., 2003, Hayat veren yağlar: Omega yağları, *Bilim ve Teknik Dergisi*, 427, 78-80.

Özmen, Ö., 2013, Omega-3 Ve Omega-6 Yağ Asitlerinin Üre Fraksiyonlama Ve Enzimatik Yöntemler İle Konsantrasyonu, *Fen Bilimleri Enstitüsü*.

Parthasarathy, S., Khoo, J. C., Miller, E., Barnett, J., Witztum, J. L. ve Steinberg, D., 1990, Low density lipoprotein rich in oleic acid is protected against oxidative modification: implications for dietary prevention of atherosclerosis, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87 (10), 3894-3898.

Passi, S., Picardo, M., Mingrone, G., Breathnach, A. ve Nazzaro-Porro, M., 1989a, Azelaic acid--biochemistry and metabolism, *Acta dermato-venereologica. Supplementum*, 143, 8-13.

Passi, S., Picardo, M., Mingrone, G., Breathnach, A. ve Nazzaro-Porro, M., 1989b, Azelaic acid--biochemistry and metabolism, 143, 8-13.

Pérez-Jiménez, F., López-Miranda, J. ve Mata, P., 2002, Protective effect of dietary monounsaturated fat on arteriosclerosis: beyond cholesterol, 163 (2), 385-398.

Perona, J. S., Cabello-Moruno, R. ve Ruiz-Gutierrez, V., 2006, The role of virgin olive oil components in the modulation of endothelial function, *Journal of nutritional biochemistry*, 17 (7), 429-445.

Pfrang, C., Sebastiani, F., Lucas, C. O., King, M. D., Hoare, I. D., Chang, D. ve Campbell, R. A., 2014, Ozonolysis of methyl oleate monolayers at the air–water interface: oxidation kinetics, reaction products and atmospheric implications, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 16 (26), 13220-13228.

Psomiadou, E., Tsimidou, M. ve Boskou, D., 2000, α-Tocopherol content of Greek virgin olive oils, *Journal of agricultural food chemistry*, 48 (5), 1770-1775.

Quaresma, S., Andre, V., Antunes, A. M., Vilela, S. M., Amariei, G., Arenas-Vivo, A., Rosal, R., Horcajada, P. ve Duarte, M. T., 2019, Novel Antibacterial Azelaic Acid BioMOFs, *Crystal Growth & Design*, 20 (1), 370-382.

Rabasco Álvarez, Antonio María, González Rodríguez ve Luisa, M., 2000, Lipids in pharmaceutical and cosmetic preparations, 51, 74-96.

Reynolds, J., 1989, Martindale: The extra pharmacopoeia.(ed) The Pharmaceutical Press, 1015-1020.

Reynolds, J., Last, D., McGillen, M., Nijs, A., Horn, A., Percival, C., Carpenter, L., Lewis, A. J. E. s. ve technology, 2006, Structural analysis of oligomeric molecules formed from the reaction products of oleic acid ozonolysis, 40 (21), 6674-6681.

Rincón-Cervera, M. Á. ve Guil-Guerrero, J. L., 2010, Preparation of stearidonic acid-enriched triacylglycerols from Echium plantagineum seed oil, *European journal of lipid science technology*, 112 (2), 227-232.

Roe, E. T. ve Swern, D., 1960, Branched carboxylic acids from long-chain unsaturated compounds and carbon monoxide at atmospheric pressure, *Journal of the American Oil Chemists Society*, 37 (12), 661-668.

Rosan, A. M., 2001, Organic Chemistry. A Brief Survey of Concepts and Applications, , ACS Publications.

Ruiz-Gutiérrez, V. P., R,. Perona, Javier 2000, Beneficial effects of virgin olive oil on health, *Recent research developments in nutrition*, 3, 173-197.

Sadowska, J., Johansson, B., Johannessen, E., Friman, R., Broniarz-Press, L., Rosenholm, J. B. J. C. ve lipids, p. o., 2008, Characterization of ozonated vegetable oils by spectroscopic and chromatographic methods, 151 (2), 85-91.

Sağında, A., 2014, Silifke bölgesindeki bitkisel halk ilaçlarının araştırılması, *Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*.

Schallreuter, K. ve Wood, J., 1990, A possible mechanism of action for azelaic acid in the human epidermis, 282 (3), 168-171.

Setyawardhani, D. A., Sulistyo, H., Sediawan, W. B. ve Fahrurrozi, M., 2015, Separating poly-unsaturated fatty acids from vegetable oil using urea complexation: The crystallisation temperature effects, *J. Eng. Sci. Technol*, 10, 41-49.

Setyawardhani, D. A., Sulistyo, H., Sediawan, W. B. ve Fahrurrozi, M., 2018, Adsorption of saturated fatty acid in urea complexation: Kinetics and equilibrium studies, *AIP Conference Proceedings*, 030013.

Shi, C. W., Zhang, X. Y., Zhao, S. L., Chen, P. ve Bai, Y. T., 2013, Double Oxidants Combined Oxidation of Oleic Acid Preparation of Azelaic Acid, *Advanced Materials Research*, 94-97.

Stark, A. H. ve Madar, Z., 2002, Olive oil as a functional food: epidemiology and nutritional approaches, *Nutrition Reviews*, 60 (6), 170-176.

Swern, D. ve Parker, W. E., 1952, Application of urea complexes in the purification of fatty acids, esters, and alcohols. I. Oleic acid from inedible animal fats, *Journal of the American Oil Chemists Society*, 29 (10), 431-434.

Tebliğ, Z., 2017, Türk Gıda Kodeksi Zeytinyağı ve Pirina Yağı Tebliği.

Thompson, G. A., Scherer, D. E., Foxall-van Aken, S., Kenny, J. W., Young, H. L., Shintani, D. K., Kridl, J. C. ve Knauf, V. C., 1991, Primary structures of the precursor and mature forms of stearoyl-acyl carrier protein desaturase from safflower embryos and requirement of ferredoxin for enzyme activity, 88 (6), 2578-2582.

Tınmaz, M. Z., 2013, Dünyada tedavi amaçlı kullanılan bazı tıbbi bitkilerin Marmara bölgesi koşullarında bitkisel özelliklerinin belirlenmesi, *Namık Kemal Üniversitesi*.

Töpert, M., Rach, P. ve Siegmund, F., 1989a, Pharmacology and toxicology of azelaic acid, *Acta dermato-venereologica. Supplementum*, 143, 14-19.

Töpert, M., Rach, P. ve Siegmund, F., 1989b, Pharmacology and toxicology of azelaic acid, 143, 14-19.

Tuck, K. L. ve Hayball, P. J., 2002, Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects, *The Journal of nutritional biochemistry*, 13 (11), 636-644.

Tüzün, Y. ve Dolar, N. J. D., 2004, Güncel akne tedavisi, 3 (4), 220-229.

Verallo-Rowell, V., Verallo, V., Graupe, K., Lopez-Villafuerte, L. ve Garcia-Lopez, M., 1989, Double-blind comparison of azelaic acid and hydroquinone in the treatment of melasma, 143, 58-61.

Vrânceanu, A., Soare, G. ve Craiciu, D., 1995, Ameliorarea florii-soarelui pentru conþinut ridicat în acid oleic (Breeding Sunflower for High Oleic Acid Content), 62 (1), 97-96.

Wallace, W., 2019, Mass Spectra in NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database Number 69, *Linstrom, PJ, Mallard, WG, Eds*.

Wanasundara, U. N. ve Shahidi, F., 1998, Lipase-assisted concentration of n-3 polyunsaturated fatty acids in acylglycerols from marine oils, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75 (8), 945-951.

Warner, K., Orr, P. ve Glynn, M., 1997, Effect of fatty acid composition of oils on flavor and stability of fried foods, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 74 (4), 347-356.

Warner, K., Neff, W. E., Byrdwell, W. C. ve Gardner, H. W., 2001, Effect of oleic and linoleic acids on the production of deep-fried odor in heated triolein and trilinolein, *Journal of agricultural food chemistry*, 49 (2), 899-905.

Win, D. T., 2005, Oleic acid-The anti-breast cancer component in olive oil, 9 (2), 75-78.

Wu, M., Ding, H., Wang, S. ve Xu, S., 2008, Optimizing conditions for the purification of linoleic acid from sunflower oil by urea complex fractionation, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85 (7), 677.

Yamaki, T., Yano, T., Satoh, H., Endo, T., Matsuyama, C., Kumagai, H., Miyahara, M., Sakurai, H., Pokorny, J. ve Shin, S. J., 2002, High oleic acid oil suppresses lung tumorigenesis in mice through the modulation of extracellular signal-regulated kinase cascade, 37 (8), 783.

Yamaner, N. J., 2008, Akne vulgarisin topikal tedavisinde Tretinoin, Eritromisin ve Tretinoin+ Eritromisinin etkinliği.

Yıldırım, S. S., 2015, Naturel sızma zeytinyağına rafine fındık yağı ile yapılan tağşişin yağ asitleri ve sterol dağılımları ile belirlenmesi, *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı*.

Young, J. A., 2002, Chemical laboratory information profile: oleic acid, *Journal of Chemical Education*, 79 (1), 24.

Yücer, A. A., 2012, Türkiye'nin Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Dış Ticareti, 13-15.

Zhang, X., Cao, J. ve Zhong, L., 2009, Hydroxytyrosol inhibits pro-inflammatory cytokines, iNOS, and COX-2 expression in human monocytic cells, 379 (6), 581.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı	**:**	Sibel CARI
Uyruğu	**:**	T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi	**:**	Karatay/ 23.01.1996
Telefon	**:**	-
Faks	**:**	-
e-mail	**:**	sibellcari@gmail.com

EĞİTİM

Derece	**Adı, İlçe, İl**	**Bitirme Yılı**
Lise:	Konevi Anadolu Lisesi, Selçuklu/ Konya	**2013**
Üniversite:	Selçuk Üniversitesi. Fen Fakültesi Kimya Bölümü Selçuklu/Konya	**2017**
Yüksek Lisans (tezsiz):	Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü İş Sağlığı ve Güvenliği Anabilim Dalı, Konya/Selçuklu	**2018**
Yüksek Lisans (tezli):	Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Konya/Selçuklu	**-**
Doktora:	-	**-**

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	**Kurum**	**Görevi**
2016	Zade Vital	Stajyer
2018	Selçuk Ünivesitesi Sağlık Kültür ve Spor Daire Başkanlığı	Kısmı zamanlı öğrenci
2019	Selçuk Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi	Stajyer öğrenci

UZMANLIK ALANI

Kimya

YABANCI DİLLER

BELİRTMEK İSTEĞİNİZ DİĞER ÖZELLİKLER

YAYINLAR

- **Sibel CARI**, H. Filiz AYYILDIZ **"A Comparative Study with Three Different Methods for Separation and Purification of Oleic Acid from Natural Extra Virgin Olive Oil"** 3rd International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences-EurasianBioChem 19-20 March 2020, Ankara, Turkey (***Poster Presentation). (Yüksek Lisans tezinden yapılmıştır)***
- Fatma AYAZ, Nuraniye ERUYGUR, Yavuz BAĞCI, **Sibel CARI**, Süleyman DOĞU, Esra MALTAŞ ÇAĞIL **"Biological and Phytochemical Evauation of Endemic Salvia Hypargeia Fisch. & Mey., Collected from Different Regions of Turkey"** 6th International Conference Computational and Experimental Science and Engineering-ICCESEN 23-24 October 2019, Kemer/Antalya (***Poster Presentation).***