

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KONJUGE LİNOLEİK ASİT VE L-KARNİTİN İÇEREN SIVI DOZAJ
FORMUNUN GELİŞTİRİLMESİ

Biyofarmasötik ve Farmakokinetik Bilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Kim. Veysel Umut ÇELENK

DANIŞMAN
Prof.Dr. Ercüment KARASULU

İZMİR
2015

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KONJUGE LİNOLEİK ASİT VE L-KARNİTİN İÇEREN SIVI DOZAJ
FORMUNUN GELİŞTİRİLMESİ

Biyofarmasötik ve Farmakokinetik Bilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Kim. Veysel Umut ÇELENK

DANIŞMAN
Prof.Dr. Ercüment KARASULU

İZMİR
2015

DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ

Adı Soyadı

(İmza)

Başkan : Prof. Dr. Ercüment KARASULU
(Danışman)

Üye : Prof. Dr. Levent KIRILMAZ

Üye : Yrd.Doç.Dr. İbrahim Eren AKÇİÇEK

Yüksek Lisans Tezinin kabul edildiği tarih :

ÖNSÖZ

Tez çalışmam boyunca bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Ercüment KARASULU'ya,

Biyofarmasotik ve Farmakokinetik Bilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Levent KIRILMAZ'a,

Ders dönemi boyunca katkılarını hiç esirgemeyen Doç.Dr.Emel Öykü Çetin UYANIKGİL'e,

Kendisinden her konuda çok şey öğrendiğim değerli arkadaşım Dr.Kim.Zinar Pınar GÜMÜŞ'e,

GC-MS analizleri için Kim.Demir Hasan KARADEMİR'e,

Süspansiyon testleri için Kim.Selim GİRGİN ve Kim.Serkan PEKTAŞ'a

Mikrobiyolojik analizler için Dr.Biyo.Çinel Köksal KARAYILDIRIM ve Biyo.Ebru ŞANCI'ya

Yıllardır beraber yol aldığımız tüm ARGEFAR ailesine,

Her zaman yanımda olan ve en önemli anları beraber yaşayıp, beraber öğrendiğim yoldaşım Biyo.Simge UFACIK'a

Ve tüm dostlarıma,

Sonsuz Teşekkürler.

Kim.Veyssel Umut ÇELENK

İZMİR, 2015

ÖZET

KONJUGE LİNOLEİK ASİT VE L-KARNİTİN İÇEREN SIVI DOZAJ FORMUNUN GELİŞTİRİLMESİ

Kim. Veysel Umut ÇELENK

Yüksek Lisans Tezi, Biyofarmasötik ve Farmakokinetik B.D.

Tez Yöneticisi : Prof. Dr. Ercüment KARASULU

Eylül 2015, 122 sayfa

Bu çalışmada, yağ yakımını hızlandırmak ve kas kütlesini artırmak amacıyla sıkça kullanılan konjuge linoleik asit ve L-karnitin tek bir sıvı dozaj formunda aspir yağı içerisinde hazırlanmıştır. Ülkemizde ithal olarak bulunan bu tür besin desteklerinin yerel olarak üretilmesi ve desteklenmesi için yenilikçi bir çalışma sunulmaya çalışılmıştır.

Hazırlanan ürünün içerdiği etkin maddeler olan 9c,11t konjuge linoleik asit, 10t,12c konjuge linoleik asit ve L-karnitin için yapılan kalite kontrol çalışmalarının güvenilirliği analitik validasyonlarla desteklenmiş ve söz konusu kalite kontrol çalışmalarının nasıl yapıldığına ilişkin özgün yöntemler tanımlanmıştır.

Süspansiyon formunda hazırlanan ürünün, 40 °C $\pm$ 2 °C ve 75 % $\pm$ 5 % nem oranına ayarlanmış inkübatörde 6 aylık kısa süreli kimyasal stabilite testi ile etkin madde olarak kullanılan 9c,11t konjuge linoleik asit, 10t,12c konjuge linoleik asit ve L-karnitin'nin kimyasal stabilitesi ispatlanmıştır.

Ayrıca, 40 °C $\pm$ 2 °C ve 75 % $\pm$ 5 % nem oranına ayarlanmış inkübatörde 6 ay boyunca muhafaza edilen süspansiyon ürünün fiziksel stabilite testine yönelik partikül boyutu, zeta potansiyeli, viskozite, sedimentasyon hacmi ve mikrobiyolojik analizleri yapılmış, süspansiyonun fiziksel stabilitesi ispatlanmıştır.

İlerleyen zamanlarda süspansiyon formunda üretilen bu formülasyonun hayvan denemeleri yapılması planlanmaktadır.

Anahtar sözcükler : Linoleik Asit, Konjuge; Karnitin; Aspir Yağı; Süspansiyonlar; Besin Takviyeleri

e-mail: veyselcelenk@gmail.com

ABSTRACT (İNGİLİZCE ÖZET)

DEVELOPMENT OF LIQUID DOSAGE FORM CONTAINING CONJUGATED LINOLEIC ACID AND L-CARNITINE

Chem. Veysel Umut ÇELENK

Master Thesis in Department of Biopharmaceutic and Pharmacokinetic

Supervisor : Prof. Dr. Ercüment KARASULU

September 2015, 122 pages

In this study, in order to accelerate fat burning and to increase muscle mass, commonly used conjugated linoleic acid and L-carnitine are prepared as a single liquid dosage form in safflower oil. It has been attempted to present an innovative study to produce locally and support such nutritional supplements which are imported in our country.

Reliability of quality control studies which is for 9c,11t conjugated linoleic acid, 10t,12c conjugated linoleic acid and L-carnitine supported by analytical validations and specific methods are described for the application of those quality control studies.

The chemical stability of 9c,11t conjugated linoleic acid, 10t,12c conjugated linoleic acid and L-carnitine as a active ingredient has been proven by 6 month short term chemical stability testing the product prepared in the form of suspension, in an incubator which is set $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $75\% \pm 5\%$ humidity.

Besides, particle size, zeta potential, viscosity, sedimentation volume and microbiological analysis has been made for physical stability testing of the product suspension conserved for 6 months in an incubator which is set $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $75\% \pm 5\%$ humidity and physical stability was proven.

Later on, animal experiments are planned for the formulation prepared in the form of suspension.

Key words : Linoleic Acid, Conjugated; Carnitine; Safflower Oil; Suspensions; Dietary Supplements

e-mail: veyselcelenk@gmail.com

İçindekiler

ÖZET.....	III
ABSTRACT (İNGİLİZCE ÖZET).....	IV
İçindekiler.....	V
Şekiller Listesi	X
Tablolar Listesi	XIV
Kısaltmalar Listesi.....	XVI
BÖLÜM I.....	1
1 GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER.....	1
1.1 Giriş.....	1
1.2 Genel Bilgiler.....	2
1.2.1 Konjuge Linoleik Asit.....	2
1.2.1.1 Konjuge Linoleik Asidin Kimyasal Yapısı.....	2
1.2.1.2 Konjuge Linoleik Asit Kaynakları	3
1.2.1.3 Konjuge Linoleik Asidin Biyosentezi	5
1.2.1.3.1 Rumende Biyohidrojenasyon	5
1.2.1.3.2 Dokuda Sentez	7
1.2.1.4 Konjuge Linoleik Asidin Kimyasal Sentezi.....	8
1.2.1.5 Konjuge Linoleik Asidin Fizyolojik Etkileri	9
1.2.1.5.1 Antikarsinojenik Etkisi	10
1.2.1.5.2 İmmunolojik Etkileri.....	11
1.2.1.5.3 Kan İnsülin ve Leptin Düzeyleri Üzerine Etkileri.....	12
1.2.1.5.4 Arterisklerozis Üzerine Etkisi	12
1.2.1.5.5 Vucüt Kompozisyonu ve Enerji Metabolizmasına Etkisi....	12
1.2.1.6 KLA Kullanımının Toksikolojik İncelemesi, Dozaj ve Yan Etkiler	17
1.2.1.7 Konjuge Linoleik Asit Miktarının Belirlenmesi İçin Analitik Metotlar	18
1.2.1.7.1 Gaz Kromatografisi İle Analizler	19
1.2.1.7.2 Gümüş İyon Kromatografisi İle Analizler.....	21
1.2.2 L-karnitin	22
1.2.2.1 L-karnitin'in Kimyasal Yapısı.....	22

1.2.2.2	L-karnitin Kaynakları	23
1.2.2.3	L-karnitin'in Biyosentezi	25
1.2.2.4	L-karnitin'in Biyoteknolojik ve Kimyasal Sentezi.....	26
1.2.2.5	L-karnitin'in Fizyolojik Etkileri.....	27
1.2.2.5.1	Uzun Zincirli Yağ Asitlerinin Mitokondrial Matrikse Taşınması.....	28
1.2.2.5.2	CoA Havuzunun Tamponu ve Açıl Gruplarının Detoksifikasyonu	28
1.2.2.5.3	Kısa ve Orta Zincirli Yağ Asitlerinin Mitokondriden Taşınması.....	29
1.2.2.6	L-karnitin ve Egzersiz.....	29
1.2.2.7	L-karnitin Kullanımının Toksikolojik İncelemesi, Dozaj ve Yan Etkiler	29
1.2.2.8	L-karnitin Miktarının Belirlenmesi İçin Analitik Metotlar	30
1.2.2.8.1	Enzimatik Assay	30
1.2.2.8.2	Kromatografik Metotlar	30
1.2.3	Aspir (Carthamus tinctorius L.).....	32
1.2.3.1	Aspir Yağı	33
1.2.3.2	Aspir Yağının Kalite ve Safılık Kriterleri	34
1.2.4	Süspansiyonlar	37
1.2.4.1	Süspansiyonların Avantaj ve Dezavantajları.....	37
1.2.4.2	Süspansiyonların Sınıflandırılması	38
1.2.4.2.1	Oral Süspansiyonlar	38
1.2.4.2.2	Rekonstitüye (Yeniden Oluşturulan) Süspansiyonlar	38
1.2.4.2.3	Topik Süspansiyonlar	38
1.2.4.2.4	Parenteral Süspansiyonlar	39
1.2.4.2.5	Oftalmik Süspansiyonlar.....	39
1.2.4.2.6	Aerosol Süspansiyonlar	39
1.2.4.3	Süspansiyonlarda Beklenen Özellikler	39
1.2.4.4	Süspansiyon Formülasyonları	41
1.2.4.4.1	Etkin Madde	41
1.2.4.4.2	Dispersiyon Ortamı	41
1.2.4.4.3	Islatma Ajanları.....	41

1.2.4.4.4	Süspansiyon Ajanları	41
1.2.4.4.5	Flokülasyon ajanları.....	43
1.2.4.4.6	Renk vericiler	44
1.2.4.4.7	Tampon ajanları.....	44
1.2.4.4.8	Koruyucular	44
1.2.4.5	Süspansiyonların Stabilitesi.....	44
1.2.4.5.1	Kimyasal Stabilité.....	44
1.2.4.5.2	Fiziksel Stabilité.....	45
1.2.4.5.2.1	Zeta Potansiyel (Elektrokinetik)	45
1.2.4.5.2.2	Partikül Boyutu	45
1.2.4.5.2.3	Viskozite	46
1.2.4.5.2.4	Sedimentasyon Hacmi	46
1.2.4.5.3	Mikrobiyolojik Testler	47
1.2.4.5.3.1	TEMPO® TVC Testi ile Aerobik Mezofilik Bakteri (Toplam Bakteri) Sayımı.....	47
1.2.4.5.3.2	TEMPO® YM Testi ile Maya-Küf Sayımı.....	47
1.2.4.5.3.3	TEMPO® EC Testi ile <i>Escherichia coli</i> Sayımı.....	47
BÖLÜM II		48
2	GEREÇ VE YÖNTEM.....	48
2.1	Kullanılan Gereçler	48
2.1.1	Kullanılan Kimyasal Maddeler	48
2.1.2	Kullanılan Ekipman ve Cihazlar.....	49
2.2	Kullanılan Yöntemler	50
2.2.1	Konjuge Linoleik Asit Analizi	50
2.2.1.1	Ana Stok ve Standart Çözeltilerinin Hazırlanması	50
2.2.1.2	GC-MS Analizi İçin Kromatografik Cihaz Şartları	51
2.2.1.3	Konjuge Linoleik Asidin Miktar Tayini için Analitik Metot Validasyonu	52
2.2.1.3.1	Doğrusallık.....	52
2.2.1.3.2	Enjeksiyon Tekrarlanabilirliği.....	52
2.2.1.3.3	Ekstraksiyon Tekrarlanabilirliği ve Geri Kazanım	53
2.2.1.3.4	Seçicilik	53
2.2.1.3.5	Seçimlilik.....	53

2.2.1.3.6	Belirtme ve Tayin Sınırları / (LOD-LOQ).....	54
2.2.1.3.7	Yöntem Dayanıklılığı.....	55
2.2.1.4	Konjuge Linoleik Asit Analizi	55
2.2.1.5	Konjuge Linoleik Asidin Çalışma Sonuçlarının Değerlendirilmesi	55
2.2.2	L-Karnitin Analizi	56
2.2.2.1	Ana Stok Çözeltilisinin, Standart Çözeltilisinin ve Mobil Fazın Hazırlanması	56
2.2.2.2	L-Karnitin Analizi İçin Kromatografik Cihaz Şartları.....	57
2.2.2.3	L-Karnitin Miktar Tayini için Analitik Metot Validasyonu	58
2.2.2.3.1	Doğrusallık.....	59
2.2.2.3.2	Enjeksiyon Tekrarlanabilirliği.....	59
2.2.2.3.3	Ekstraksiyon Tekrarlanabilirliği ve Geri Kazanım	59
2.2.2.3.4	Seçicilik	59
2.2.2.3.5	Seçimlilik.....	59
2.2.2.3.6	Belirtme ve Tayin Sınırları / (LOD-LOQ).....	60
2.2.2.4	L-Karnitin Analizi	60
2.2.2.5	L-Karnitin için Çalışma Sonuçlarının Değerlendirilmesi	60
2.2.2.6	Yöntem Dayanıklılığı	61
2.2.2.7	KLA ve L-Karnitin İçeren Formülasyonun Hazırlanması.....	61
2.2.2.8	Formülasyonun Kimyasal Stabilitesi	61
2.2.2.9	Formülasyonun Fiziksel Stabilitesi	61
2.2.2.9.1	Zeta Potansiyel (Elektrokinetik)	62
2.2.2.9.2	Partikül Boyutu Ölçümü	63
2.2.2.9.3	Viskozite Ölçümü	64
2.2.2.9.4	Sedimentasyon Hacmi Ölçümü	65
2.2.2.9.5	Görünüş	65
2.2.2.9.6	Renk.....	66
2.2.2.9.7	Koku.....	66
2.2.2.9.8	Tat	66
2.2.2.10	Mikrobiyolojik Analizler	67
2.2.2.10.1	TEMPO® TVC Testi ile Aerobik Mezofilik Bakteri (Toplam Bakteri) Sayımı.....	69

2.2.2.10.2 TEMPO® YM Testi ile Maya-Küf Sayımı	70
2.2.2.10.3 TEMPO® EC Testi ile <i>Escherichia coli</i> Sayımı.....	70
2.2.2.11 Hazırlanan Formülasyonun Yağ Asitleri Kompozisyonunun Belirlenmesi	71
BÖLÜM III.....	72
3 BULGULAR	72
3.1 Konjuge Linoleik Asidin Analitik Metot Validasyonu	72
3.1.1 Doğrusallık.....	72
3.1.2 Enjeksiyon Tekrarlanabilirliği	74
3.1.3 Ekstraksiyon Tekrarlanabilirliği ve Geri Kazanım	75
3.1.4 Seçicilik	78
3.1.5 Seçimlilik.....	78
3.1.6 Belirtme ve Tayin Sınırları / (LOD-LOQ)	80
3.1.7 Yöntem Dayanıklılığı.....	80
3.2 L-Karnitin Analitik Metot Validasyonu	82
3.2.1 Doğrusallık.....	82
3.2.2 Enjeksiyon Tekrarlanabilirliği	83
3.2.3 Ekstraksiyon Tekrarlanabilirliği ve Geri Kazanım	84
3.2.4 Seçicilik	85
3.2.5 Seçimlilik.....	85
3.2.6 Belirtme ve Tayin Sınırları / (LOD-LOQ).....	86
3.2.7 Yöntem Dayanıklılığı.....	86
3.3 Formülasyonun Kimyasal Stabilite Testinin Sonuçları.....	87
3.4 Formülasyonun Fiziksel Stabilite Testlerinin Sonuçları	108
3.5 Son Ürüne İlişkin Mikrobiyolojik Testlerin Sonuçları.....	109
3.6 Hazırlanan Formülasyonun Yağ Asitleri Kompozisyonu Sonuçları	110
BÖLÜM IV	113
4 TARTIŞMA.....	113
BÖLÜM V.....	116
5 SONUÇ VE ÖNERİLER.....	116
KAYNAKLAR	117
ÖZGEÇMİŞ.....	122

Şekiller Listesi

Şekil 1 : KLA'nın biyolojik aktif izomerlerinin (cis 9, trans-11 ve trans-10, cis-12 oktadekadienoik asit) ve linoleik asidin (cis-9,cis-12 oktadekadienoik asit) kimyasal yapısı (çizgi-bağ formülü ile).....	2
Şekil 2 : Ruminantlarda cis-9,trans-11 konjuge linoleik asit oluşumunda, rumen biyohidrojenasyonunun ve doku Δ^9 -desaturazın rolü	6
Şekil 3 : Cis-9,trans-11 KLA izomerinin, Δ^9 -desaturaz yoluyla endojen sentezinin biyokimyasal yolları	7
Şekil 4 : KLA izomerlerinin α -linolenik asit ve γ -linolenik asitten sentezinde kullanılan prosedür	8
Şekil 5 : Konjuge linoleik asit (1.8 g/gün) uygulanan grup ile plasebo (hidrojel) uygulanan grup arasındaki % vücut yağı değişimlerinin karşılaştırılması.....	14
Şekil 6 : 12 ay boyunca KLA-FFA, KLA-TAG ve plasebo uygulanan gruplar arasındaki % BFM değişimlerinin karşılaştırılması.....	15
Şekil 7 : A) Triaçilgliserit formunun (TGA- triacylglyceride) ve B) serbest yağ asidi formunun (FFA-free fatty acid) genel gösterimi.	17
Şekil 8 : KLA metil esterlerinin BPX70 (120 m x 0.25 mm; 0.25 μ m) kapiler kolondaki kromatogramı.	19
Şekil 9 : (a) 6,8-18:2, (b) 7,9-18:2 ve (c) 13,15-18:2 KLA izomerlerinin DMOX türevlerine ait EI (Electron Impact) kütle spekturumu.....	20
Şekil 10 : Yağ asidi metil esterlerinin ters faz sıvı kromatografisi ile ayrılmasına ilişkin kromatogram. (dalga boyu : 234 nm, Kolon : A Nucleosil C18 (250 x 10mm ID; 5 μ m), akış hızı 4: mL/dk, mobil faz : asetonitril).	21
Şekil 11 : L-karnitin'nin (β -hidroksi- γ -trimetilaminobutirat) kimyasal yapısı.	22
Şekil 12 : L-karnitin ve D-Karnitin'nin kimyasal yapıları	23
Şekil 13 : L-karnitin'in biyosentez yolu	26
Şekil 14 : 4-butirotetain'in kimyasal yapısı	26
Şekil 15 : L-karnitin tartarat ve Asetil-L-karnitin'in kimyasal yapısı	27
Şekil 16 : Yağ asitlerinin mitokondri içine taşınması (KZYA: Kısa zincirli yağ asitleri, OZYA: Orta zincirli yağ asitleri, UZYA: Uzun zincirli yağ asitleri, CPT: Karnitil palmitoil transferaz I, II)	28
Şekil 17 : L-karnitin (L) ve D-karnitin (D) için 235 nm'de alınan HPLC kromatogramı	31

Şekil 18 : Compositae (Asteraceae) familyasından tek yıllık bir bitki olan aspir (<i>Carthamus tinctorius</i> L.).....	32
Şekil 19 : KLA ve aspir yağı suplemantasyonunun VKİ (BMI) üzerine etkisi	34
Şekil 20 : GC-MS Sistemi (Shimadzu QP-2010 Plus).....	51
Şekil 21 : HPLC-UV Sistemi (Agilent 1290-Infinity).....	58
Şekil 22 : Stabilite testleri için hazırlanan ürün ve inkübatör	62
Şekil 23 : Zetametre (Zetasizer Nano ZSP)	62
Şekil 24 : Partikül boyutu ölçüm cihazı (Mastersizer 3000).....	63
Şekil 25 : Viskozimetre (Brookfield DV-II Pro).....	64
Şekil 26 : 100 mL'lik mezür içerisindeki formülasyon	65
Şekil 27 : Lovibond Tintometresi	66
Şekil 28 : TEMPO® doldurucu ve okuyucu.	67
Şekil 29 : TEMPO® kitleri ve besiyerleri.....	68
Şekil 30 : Stomacher cihazı ve tartım işlemi.....	68
Şekil 31 : TEMPO® torbasına tartılan formülasyon	69
Şekil 32 : 9c,11t-Konjuge Linoleik Asidin doğrusallık grafiği.....	73
Şekil 33 : 10t,12c-Konjuge Linoleik Asidin doğrusallık grafiği.....	74
Şekil 34 : L-Karnitin'in doğrusallık grafiği.....	83
Şekil 35 : 9c,11t- ve 10t,12c- Konjuge Linoleik Asidin 0. gün kimyasal stabilite testinin 1. paralel çalışması için m/z=81, m/z=95 ve m/z=294 iyonlarına ait GC- MS kromatogramları.	89
Şekil 36 : 9c,11t- ve 10t,12c- Konjuge Linoleik Asidin 0. gün kimyasal stabilite testinin 2. paralel çalışması için m/z=81, m/z=95 ve m/z=294 iyonlarına ait GC- MS kromatogramları.	90
Şekil 37 : 9c,11t- ve 10t,12c- Konjuge Linoleik Asidin 0. gün kimyasal stabilite testinin 3. paralel çalışması için m/z=81, m/z=95 ve m/z=294 iyonlarına ait GC- MS kromatogramları.	91
Şekil 38 : 9c,11t- ve 10t,12c- Konjuge Linoleik Asidin 3. ay kimyasal stabilite testinin 1. paralel çalışması için m/z=81, m/z=95 ve m/z=294 iyonlarına ait GC- MS kromatogramları.	92
Şekil 39 : 9c,11t- ve 10t,12c- Konjuge Linoleik Asidin 3. ay kimyasal stabilite testinin 2. paralel çalışması için m/z=81, m/z=95 ve m/z=294 iyonlarına ait GC- MS kromatogramları.	93

Şekil 40 : 9c,11t- ve 10t,12c- Konjuge Linoleik Asidin 3. ay kimyasal stabilite testinin 3. paralel çalışması için m/z=81, m/z=95 ve m/z=294 iyonlarına ait GC-MS kromatogramları.	94
Şekil 41 : 9c,11t- ve 10t,12c- Konjuge Linoleik Asidin 6. ay kimyasal stabilite testinin 1. paralel çalışması için m/z=81, m/z=95 ve m/z=294 iyonlarına ait GC-MS kromatogramları.	95
Şekil 42 : 9c,11t- ve 10t,12c- Konjuge Linoleik Asidin 6. ay kimyasal stabilite testinin 2. paralel çalışması için m/z=81, m/z=95 ve m/z=294 iyonlarına ait GC-MS kromatogramları.	96
Şekil 43 : 9c,11t- ve 10t,12c- Konjuge Linoleik Asidin 6. ay kimyasal stabilite testinin 3. paralel çalışması için m/z=81, m/z=95 ve m/z=294 iyonlarına ait GC-MS kromatogramları.	97
Şekil 44 : L-Karnitinin 0. gün kimyasal stabilite testinin 1. paralel çalışması için HPLC-UV cihazının 235 nm dalgaboyundaki kromatogramı.	99
Şekil 45 : L-Karnitinin 0. gün kimyasal stabilite testinin 2. paralel çalışması için HPLC-UV cihazının 235 nm dalgaboyundaki kromatogramı.	100
Şekil 46 : L-Karnitinin 0. gün kimyasal stabilite testinin 3. paralel çalışması için HPLC-UV cihazının 235 nm dalgaboyundaki kromatogramı.	101
Şekil 47 : L-Karnitinin 3. ay kimyasal stabilite testinin 1. paralel çalışması için HPLC-UV cihazının 235 nm dalgaboyundaki kromatogramı.	102
Şekil 48 : L-Karnitinin 3. ay kimyasal stabilite testinin 2. paralel çalışması için HPLC-UV cihazının 235 nm dalgaboyundaki kromatogramı.	103
Şekil 49 : L-Karnitinin 3. ay kimyasal stabilite testinin 3. paralel çalışması için HPLC-UV cihazının 235 nm dalgaboyundaki kromatogramı.	104
Şekil 50 : L-Karnitinin 6. ay kimyasal stabilite testinin 1. paralel çalışması için HPLC-UV cihazının 235 nm dalgaboyundaki kromatogramı.	105
Şekil 51 : L-Karnitinin 6. ay kimyasal stabilite testinin 2. paralel çalışması için HPLC-UV cihazının 235 nm dalgaboyundaki kromatogramı.	106
Şekil 52 : L-Karnitinin 6. ay kimyasal stabilite testinin 3. paralel çalışması için HPLC-UV cihazının 235 nm dalgaboyundaki kromatogramı.	107
Şekil 53 : Hazırlanan formülasyonun 0. Gün yağ asitleri kompozisyonuna ilişkin kromatogram.....	111

Şekil 54 : Hazırlanan formülasyonun 3. Ay yağ asitleri kompozisyonuna ilişkin kromatogram.....	111
Şekil 55 : Hazırlanan formülasyonun 6. Ay yağ asitleri kompozisyonuna ilişkin kromatogram.....	112



Tablolar Listesi

Tablo 1 : Pişmemiş besinlerin konjuge linoleik asit içerikleri (mg/g yağ)	4
Tablo 2 : Hayvansal ve bitkisel kaynaklardaki L-karnitin miktarları	24
Tablo 3 : Türk Gıda Kodeksi Bitki Adıyla Anılan Yemeklik Yağlar Tebliği'ne (Tebliğ No:2012/29) göre aspir yağı için gaz kromatografisi ile tespit edilen yağ asitleri kompozisyonuna ilişkin değerler. (TED : Tespit Edilemeyen Düzey (< % 0.05))	35
Tablo 4 : Türk Gıda Kodeksi Bitki Adıyla Anılan Yemeklik Yağlar Tebliği'ne (Tebliğ No:2012/29) göre aspir yağı için sterol kompozisyonuna ilişkin değerler. (TED : Tespit Edilemeyen Düzey (< % 0.05))	36
Tablo 5 : Türk Gıda Kodeksi Bitki Adıyla Anılan Yemeklik Yağlar Tebliği'ne (Tebliğ No:2012/29) göre aspir yağının fiziksel ve kimyasal özelliklerine ilişkin değerler.	36
Tablo 6 : Codex Alimentarius'a göre aspir yağındaki tokoferol ve tokotrienol miktarlarına ilişkin değerler. (TED : Tespit Edilemeyen Düzey (< % 0.05)) ..	37
Tablo 7 : Farmasötik süspansiyonların tedavideki uygulamaları	40
Tablo 8 : Süspansiyonlarda sıklıkla kullanılmakta olan süspansiyon ajanlarının bazı özellikleri (50).....	42
Tablo 9 : Süspansiyonlarda sıklıkla kullanılmakta olan flokülasyon ajanları.....	43
Tablo 10 : Konjuge Linoleik Asit ve L-Karnitin Analizinde Kullanılan Kimyasallar ve Tedarikçileri	48
Tablo 11 : Konjuge Linoleik Asit ve L-Karnitin Analizinde Kullanılan Ekipmanlar ve Tedarikçileri	49
Tablo 12 : 9c,11t-Konjuge Linoleik Asit ve 10t,12c-Konjuge Linoleik Asit standart çözelti hazırlama tablosu	50
Tablo 13 : Konjuge Linoleik Asit Analizi İçin Cihaz Parametreleri	51
Tablo 14 : L-karnitin standart çözelti hazırlama tablosu	57
Tablo 15 : L-karnitin analizi için cihaz parametreleri	57
Tablo 16 : Yağ asitleri kompozisyonunun belirlenmesi için kullanılan cihaz parametreleri	71
Tablo 17 : 9c,11t-Konjuge Linoleik Asidin doğrusalılık değerleri (m/z = 81)	72
Tablo 18 : 10t,12c-Konjuge Linoleik Asidin doğrusalılık değerleri (m/z = 81)	73

Tablo 19 : 9c,11t- Konjuge Linoleik Asit (100 µg/mL) için enjeksiyon tekrarlanabilirliği değerleri	74
Tablo 20 : 10t,12c-Konjuge Linoleik Asit (100 µg/mL) için enjeksiyon tekrarlanabilirliği değerleri	75
Tablo 21 : 9c,11t-Konjuge Linoleik Asidin ekstraksiyon tekrarlanabilirliği ve geri kazanım değerleri	76
Tablo 22 : 10t,12c-Konjuge Linoleik Asidin ekstraksiyon tekrarlanabilirliği ve geri kazanım değerleri	77
Tablo 23 : 9c,11t-Konjuge Linoleik Asidin seçicilik değerleri	78
Tablo 24 : 10t,12c -Konjuge Linoleik Asidin seçicilik değerleri	78
Tablo 25 : 9c,11t-Konjuge Linoleik Asidin seçimlilik değerleri	79
Tablo 26 : 10t,12c-Konjuge Linoleik Asidin seçimlilik değerleri	79
Tablo 27 : 9c,11t -Konjuge Linoleik Asidin LOD-LOQ değerleri	80
Tablo 28 : 10t,12c-Konjuge Linoleik Asidin LOD-LOQ değerleri	80
Tablo 29 : 9c,11t-Konjuge Linoleik Asidin yöntem dayanıklılığı	81
Tablo 30 : 10t,12c-Konjuge Linoleik Asidin yöntem dayanıklılığı	81
Tablo 31 : L-Karnitin'in doğrusallık değerleri	82
Tablo 32 : L-Karnitin'in enjeksiyon tekrarlanabilirliği değerleri	83
Tablo 33 : L-Karnitin için ekstraksiyon tekrarlanabilirliği ve geri kazanım değerleri	84
Tablo 34 : L-Karnitin'in seçicilik değerleri	85
Tablo 35 : L-Karnitin'in seçimlilik değerleri	85
Tablo 36 : L-Karnitin İçin LOD-LOQ değerleri	86
Tablo 37 : L-Karnitin'in yöntem dayanıklılığı	86
Tablo 38 : 9c,11t-Konjuge Linoleik Asidin kimyasal stabilite sonuçları	87
Tablo 39 : 10t,12c-Konjuge Linoleik Asidin kimyasal stabilite sonuçları	88
Tablo 40 : L-Karnitin'in kimyasal stabilite sonuçları	98
Tablo 41 : Son ürünün fiziksel stabilite sonuçları	108
Tablo 42 : Son ürünün mikrobiyolojik testlerinin sonuçları	109
Tablo 43 : Hazırlanan formülasyonun 0., 3., ve 6. aylardaki yağ asitleri kompozisyonunun sonuçları	110

Kısaltmalar Listesi

KLA : Konjuge Linoleik Asit

LA : Linoleik Asit

HPLC : Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography)

Ag⁺-HPLC : Gümüş İyon Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

MS : Kütle Spektrometresi (Mass Spectrometry)

TG : Trigliserit

YAAE : Yağ Asitleri Etil Esterleri

PGE₂ : Prostaglandin E₂

COX : Siklooksijenaz

AA : Araşidonik Asit

LDL : Düşük Yoğunluklu Lipoprotein (Low Density Lipoprotein)

HDL : Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein (High Density Lipoprotein)

VKİ (BMI) : Vücut Kitle İndeksi (Body Mass Index)

FFA : Serbest Yağ Asiti (Free Fatty Acid)

TAG : Triasilgliserid (Triacylglyceride)

BFM : Vücut Yağ Kitlesi (Body Fat Mass)

WHR : Bel-Kalça Oranı (Waist to Hip Ratio)

PPARs : Peroksizom Proliferatör-Aktive Reseptörleri (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors)

Lp : Lipoprotein

DMOX : 4,4-dimethyloxazoline

MTAD : 4-methyl-1,2,4-triazoline-3,5-dione

RP : Ters Faz (Reverse Phase)

FID : Alev İyonlaşma Dedektörü (Flame Ionization Dedector)

RT : Geliş Zamanı (Retention Time)

UV : Ultraviyole

NAD : Nikotinamid Adenin Dinükleotit

CPT I : Karnitin-Palmitoil Transferaz I

CPT II : Karnitin-Palmitoil Transferaz II

CT : Açilkarnitin Translokaz

KZYA : Kısa Zincirli Yağ Asitleri

OZYA : Orta Zincirli Yağ Asitleri

UZYA : Uzun Zincirli Yağ Asitleri

EFSA : Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (European Food Safety Authority)

DTNB : 3,3'-ditiyobis(6-nitrobenzoik asit)

TNB : 3-tiyo-6-nitrobenzoik asit

TED : Tespit Edilemeyen Düzey

Na CMC : Sodyum Karboksimetil Selüloz

RRT : Göreceli Alıkonma Zamanları (Relative Retention Time)

LOD : Belirtme Sınırı (Limit of Detection)

LOQ : Tayin Sınırı (Limit of Quantification)

RSD : Göreceli Standart Sapma (Relative Standard Deviation)

R_s : Ayrılma (Resolution)

N : Plaka Sayısı

TVC : Toplam Bakteri (Total Viable Count)

EC : *Escherichia coli*

YM : Maya & Küf (Yeast & Mold)

Kob : Koloni oluşturan birim

CDER : İlaç Değerlendirme ve Araştırma Merkezi (The Center for Drug Evaluation and Research)

BÖLÜM I

1 GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER

1.1 Giriş

Konjuge Linoleik Asit (KLA) ve L-karnitin metabolizmayı hızlandırarak vücuttaki yağ dokusunun yakımını hızlandırmak ve bunun sonucunda kas dokusunu arttırmak amacı ile mono preparatları halinde kullanılmaktadır. Bu etkinin artması için günlük diyetle alınan bu preperatların egzersiz ile birlikte kullanılması gerekmektedir.

Fonksiyonel bir gıda bileşeni olan KLA ve L-karnitin, oluşabilecek tedavisi uzun ve zor olan hastalıkların önlenmesi için koruyucu tıpta yerini ön sıralardan almıştır. Bu nedenle KLA'nın biyolojik aktif izomerlerinin ve L-karnitin'in besin desteği olarak yaygınlaştırılması önem arz etmektedir.

Bu çalışmanın amacı her iki molekülü bir dozaj formunda kullanıcılara sunacak bir preparat hazırlamak, hazırlanan ürünün kalite kontrol analizlerini ve stabilite testlerini yapmaktır.

Birbirinden ayrı ortamlarda hazırlanabilen L-karnitin ve KLA moleküllerinin tek bir formülasyonda hazırlanıp standardizasyonunun ve stabilizasyonunun ortaya konulması ile piyasadaki besin desteklerine yenilikçi ve alternatif bir bakış açısı sunulmaktadır.

Söz konusu dozaj formu kombine olarak süspansiyon şeklinde hazırlanmıştır. Ülkemizde böyle bir ürünün üretimi yapılmamaktadır.

1.2 Genel Bilgiler

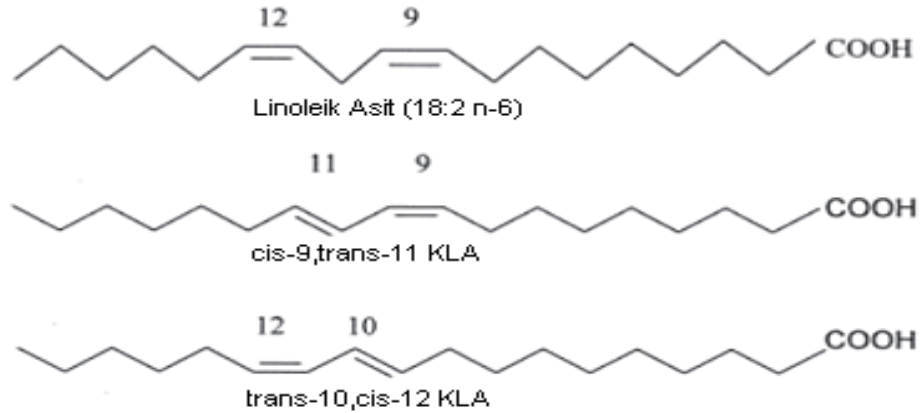
1.2.1 Konjuge Linoleik Asit

1.2.1.1 Konjuge Linoleik Asidin Kimyasal Yapısı

Konjuge linoleik asit (KLA), bir omega-6 esansiyel yağ asiti olan linoleik asidin (LA) (cis-9,cis-12, C18:2n-6) konjuge olmuş, pozisyonel ve geometrik izomerlerini belirtir. Linoleik asidin yapısına kıyasla KLA içindeki konjuge olan çift bağlar, 8-10, 9-11, ve 10-12 veya 11-13 pozisyonlarında yer almıştır. Herbir pozisyonel izomer cis-trans, trans-cis, cis-cis veya trans-trans geometrik konfigürasyonda olabilir (1).

KLA'nın başlıca izomerleri cis-9, cis-11;trans-9, cis-11; trans-9, trans-11; trans-10, trans-12 ve trans-10, cis-12 oktadekadienoik asitlerdir. Daha az bulunan izomerler ise cis-10, cis-12; cis-10, cis-12; cis-10, trans-12 ve cis-11, cis-12 oktadekadienoik asitlerdir (2).

Ruminantlardan elde edilen ürünlerde sırasıyla toplam KLA'nın % 80-90 ve %3-5'ini oluşturan Cis-9, trans-11 ve trans-10, cis-12 izomerleri fizyolojik olarak önemli izomerlerdir (3).



Şekil 1 : KLA'nın biyolojik aktif izomerlerinin (cis 9, trans-11 ve trans-10, cis-12 oktadekadienoik asit) ve linoleik asidin (cis-9,cis-12 oktadekadienoik asit) kimyasal yapısı (çizgi-bağ formülü ile)

Konjuge linoleik asit ; (c-9,t-11) KLA, rumenik asit veya (c-9,t-11) oktadekadienoik asit olarak da bilinmektedir. Ayrıca (t-10,c-12) KLA, (t-10,c-12) oktadekadienoik asit olarak da isimlendirilmektedir. Görüldüğü üzere konjuge oktadekadienoik asitler, zaman zaman KLA ile eş anlamlı olarak da kullanılmaktadır (4).

1.2.1.2 Konjuge Linoleik Asit Kaynakları

90'lı yıllarda kromatografik ve spektroskopik cihazların yaygınlaşması ve gelişmesi ile besinlerdeki KLA miktarları ile ilgili çalışmalar da yaygınlaşmıştır.

Araştırmalar sonucunda en yüksek KLA içeriğinin et ve süt ürünlerinde olduğu belirlenmiştir. Ancak süt ve et için bulunan miktarlar bu besinlerin işlenme şartlarına ve hayvanların beslenme kalitesine göre değişim göstermektedir. Hatta kırmızı etin içerdiği KLA miktarı balık veya kanatlı etinden çok daha yüksektir. Bu nedenle rumenik asit olarak da adlandırılabilen (cis-9, trans-11) KLA, ruminantlarda tek midelilere oranla fazla miktardadır.

Ruminant kaynaklı gıdaların KLA içerikleri; ürünün yağ içeriğindeki artış ve mevsimlere bağlı olarak rasyonların bileşiminin değişimi gibi çeşitli faktörlerden etkilenmektedir. Özellikle sonbahar ve kış aylarında beslenmeye bağlı olarak sütlerin yağ içerikleri artmakta ve bununla orantısız olarak da KLA içerikleri de artmaktadır. Ayrıca yüksek rakımda otlanan hayvanların çoklu doymamış yağ asitleri (ÇDYA) bakımından zengin ortamlarda beslenmelerinin bir sonucu olarak sütlerinde alçak rakımda otlananlara göre daha yüksek oranda KLA tespit edilmiştir (2).

KLA içeriği bakımından en zengin ürünler geviş getiren hayvanlardan elde edilen ürünlerdir. Özellikle kuzu eti KLA bakımından en zengin kaynaklardan biridir. Hayvan etlerini KLA içeriği bakımından kıyaslayacak olursak, 1 g yağın içermiş olduğu toplam KLA izomeri miktarlarına bakıldığında zaman, kuzu eti 5.8 mg, sığır eti 4.3 mg ve dana eti 2.7 mg KLA içermektedir. Rumeni olmayan tavukta ve domuzdaki KLA miktarı ise sırası ile 0.9 mg/g yağ ve 0.6 mg/g yağdır (2).

Konjuge linoleik asit miktarlarını karşılaştırırken sonuçların (mg/g yağ) gibi yağ miktarına bağlı olarak verilmesi gıda maddesinin içerdiği KLA miktarının tam olarak anlaşılmamasına neden olabilir. Tablo 1'de görülebileceği üzere süt ve süt ürünlerinin KLA içeriği bakımından en zengin kaynaklar olarak anlaşılması çok

kolay yapılabilen bir hatadır. Örneğin orta yağlı kıymaların yağ içerikleri yaklaşık %16- 20'dir. Homojenize sütlerde yağ oranı ise en % 3'tür. Böylece sığır kıymasının içerdiği KLA miktarı ürünün sadece yağı değil de tamamı üzerinden hesaplandığında 0.69-0.86 mg/g ve benzer şekilde homojenize sütün içerdiği KLA ise 0.17 mg/g olacaktır. Buna göre geviş getiren hayvanlardan elde edilen ürünlerde yağ miktarına göre 0.30-0.70 mg/g arasında KLA içermektedir. Bitkisel yağlarda ise en fazla KLA aspir yağında bulunmaktadır ki bu da aslında tabloda verilenlerin içinde en yüksek KLA konsantrasyonuna sahip olan gıda maddesidir (2).

Mandıra Ürünleri	mg/g yağ	Et/Balık	mg/g yağ	Bitkisel Yağlar	mg/g yağ
Homojenize süt	5.5	Sığır kıyması	4.3	Aspir yağı	0.7
% 2 Yağlı süt	4.1	Dana eti	2.7	Ayçiçek yağı	0.4
Süt yağı	6.1	Kuzu eti	5.8		
Ayran	5.4	Domuz eti	0.6		
Tereyağ	4.7	Tavuk eti	0.9		
Dondurma	3.6	Hindi kıyması	2.6		
Az yağlı yoğurt	4.4	Somon	0.3		
Donmuş yoğurt	2.8	Yumurta sarısı	0.6		
Çedar peyniri	4.1				

Tablo 1 : Pişmemiş besinlerin konjuge linoleik asit içerikleri (mg/g yağ) (5).

Gıdalardaki KLA'nın biyolojik olarak aktif izomerlerinden olan cis-9, trans-11 oktadekadienoik asit yüzdesine baktığımızda ; sığır kıyması % 85, dana eti % 79, kuzu eti % 92, domuz eti % 82, tavuk eti % 84, hindi eti % 76, homojenize süt % 92, tereyağı % 88, dondurma % 86 ve çedar peyniri % 93 oranında bu izomeri içermektedir (2).

Gıdalarda KLA'nın hemen hemen tüm olası cis ve trans izomerleri belirlenmiştir. Ancak linoleik asidin biyohidrojenasyonunda ara madde olarak oluşan cis-9 ve trans-11 oktadekanoik asit, gıdaların muhteviyatındaki KLA izomerlerinin %75-80'ini oluşturmaktadır. Linoleik asit miktarının yüksek olduğu bitkisel yağlardan her bir KLA izomerinin ayrı ayrı izolasyonu veya sentezlenmesi KLA izomerlerinin doğal bir preperat halinde karışımını oluşturmaktan oldukça zor ve pahalıdır (6).

Laboratuvar koşullarında saf linoleik asitten ya da linoleik asit miktarı yüksek olan ayçiçeği ve aspir yağı gibi bitkilerin yağından basit koşullarda ısı uygulamasıyla bu stereoizomerler elde edilmektedir. Bu metotla linoleik asit (cis-9,cis-12) %4 cis-9, trans-11 ve %44 oranında trans-10 ve cis-12 oktadekadedienoik asit izomerlerine dönüştürülebilmektedir (7).

Besin takviyesi olarak piyasada kendine pazar bulan KLA karışımları, linoleik asidin isomerizasyonu ile elde edilen cis 9, trans-11 ve trans-10, cis-12 izomerlerini eşit miktarda içermekte ve bu oran toplam izomer oranının %85-90'lık kısmını oluşturmaktadır. Geriye kalan kısım ise linoleik asittir (cis-9,cis-12, C18:2n-6).

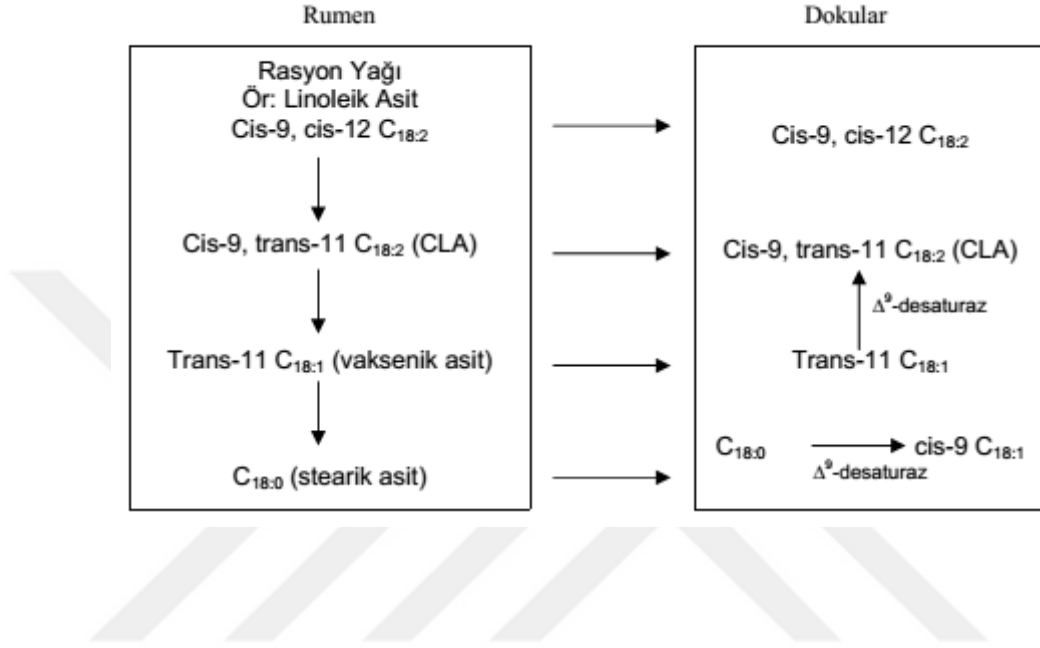
1.2.1.3 Konjuge Linoleik Asidin Biyosentezi

Günlük diyetle alınan ruminant kaynaklı konjuge linoleik asidin (cis 9,trans11) eşsizliği, doymamış yağ asitlerinin rumende tamamlanmamış biyohidrojenasyonunun bir sonucudur (8). Bu doymamış yağ asitlerinin biyohidrojenasyonundan bakteriler sorumludur ancak az düzeyde de olsa protozoaların da etkisi vardır. Rumende, LA'nın biyohidrojenasyonu sonucu oluşan cis-9,trans-11 KLA, *butyrivibrio fibrisolvens*'in eseridir (4). Ruminantların süt ve etlerinin yağında bulunan KLA, rumende ve endojen olarak dokularda olmak üzere iki kaynaktan oluşmaktadır. KLA, İlk kaynak olarak rumende linoleik asitin biyohidrojenasyonu ile oluşur. Diğeri ise hayvanların dokularında trans-11 C18:1 (vaksenik) asitten sentezidir (9).

1.2.1.3.1 Rumende Biyohidrojenasyon

Yemlerdeki yağların kompozisyonunu, glikolipit ve fosfolipitlerin dışında, doymamış yağ asitleri olan linoleik asit (cis-9,cis-12 C18:2) ve linolenik asit (cis-9,cis-12,cis-15 C18:3) içermektedir. Bu yemlerin ruminantlar tarafından tüketilmesi sonucu alınan yağlar rumende iki önemli transformasyona uğrar. Transformasyonun

başlangıcında, mikrobiyal lipaz katalizi ile ester bağları hidroliz edilir ve yağ asitleri rumen sıvısına geçer. Bu basamak doymamış yağ asitlerinin rumen bakterisi tarafından biyohidrojenasyonu için önşarttır (8).



Şekil 2 : Ruminantlarda cis-9,trans-11 konjuge linoleik asit oluşumunda, rumen biyohidrojenasyonunun ve doku Δ⁹-desaturazın rolü (9).

Cis-12 pozisyonundaki çiftli bağın izomerizasyonu, cis-9,trans-11 KLA oluşumu ile sonuçlanır. Ardından gerçekleşen reaksiyonla cis-9,trans-11 izomerinin, trans-11 C_{18:1}'e (vaksenik asit) indirgenmesi ve tekrar bir indirgenme ile doymuş bir yağ asiti olan C_{18:0}'ın (stearik asit) oluşumu gerçekleşir. Burdaki ilk iki reaksiyon (cis-9,trans-11 KLA ve trans-11 C_{18:1} oluşumu) hızlıdır, ancak tepkşmenin hızını belirleyen basamak olan stearik asit oluşumu yavaştır. Bu nedenle ara ürünler rumende birikir ve absorbsiyon için elverişli bir ortam oluşturulmuş olur (8).

Linoleik asidin biyohidrojenasyonuna benzer olarak, linolenik asidin biyohidrojenasyonu da bir dizi indirgenme reaksiyonunu ve ardından stearik asit oluşumunu içerir. Yemlerde en fazla bulunan α-linolenic asitin (cis-9, cis-12, cis-15 oktadekatrienoic asit) biyohidrojenasyonu ile cis-9, trans-11, cis-15 konjuge oktadekatrienoik asit ana ürün olarak üretilmekte ve bunu cis pozisyonundaki çift

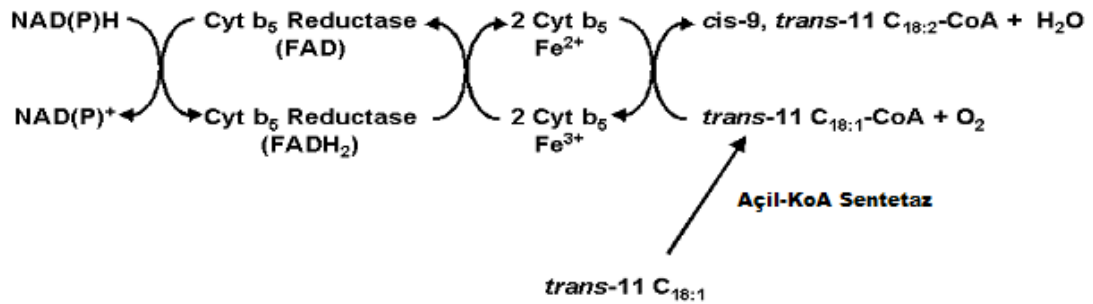
bağlarının indirgenmesi izlemektedir. Sonuç olarak, trans-11 oktadekatrienoik asit, α -linolenik asit ile linoleik asitin biyohidrojenasyonunda ortak bir ara üründür (9).

1.2.1.3.2 Dokuda Sentez

Süt yağındaki trans-oktadekanoik asit ile konjuge dienoik asitler arasındaki doğrusal orantı ilk kez diferansiyel kızılötesi spektrometresi ile gözlenmiştir. Sonraki çalışmalar da gösteriyor ki, süt yağında ve diğer birçok besinde trans-11 C18:1 izomerinin cis-9, trans-11 KLA izomeri ile lineer bir ilişkisi vardır. Trans-11 C18:1 ve cis-9,trans-11 KLA arasındaki bu ilişki aynı zamanda prekürsör-ürün ilişkisiyle uyumludur (9).

Endojen cis-9,trans-11 KLA, Δ^9 -desaturaz aracılığıyla trans-11 C18:1'in desaturasyonu sonucu oluşmaktadır. Tam desaturaz inhibasyonu olmaması göz önüne alındığında, Δ^9 -desaturaz yoluyla endojen sentezi KLA'yı baskın kılar. Bir anlamda cis-9,trans-11 KLA izomerinin endojen sentezi ruminantların vücut yağındaki KLA'nın major kaynağıdır (9).

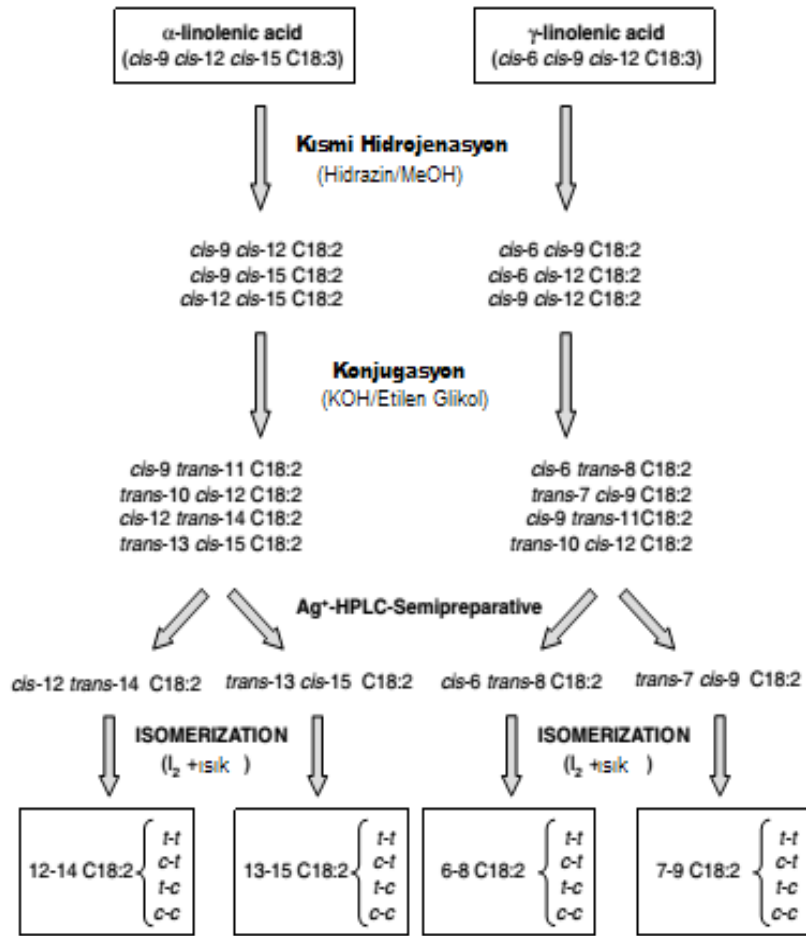
Bu desaturaz sistemine NADH-sitokrom b₅ redüktaz, sitokrom b₅, açıl-KoA sentetaz ve Δ^9 -desaturaz gibi bir çok enzim kompleksi katılmaktadır (9).



Şekil 3 : Cis-9,trans-11 KLA izomerinin, Δ^9 -desaturaz yoluyla endojen sentezinin biyokimyasal yolları (9).

1.2.1.4 Konjuge Linoleik Asidin Kimyasal Sentezi

KLA'nın kimyasal sentezinin asıl amacı, maksimum biyolojik aktiviteye sahip ve tam olarak karakterize edilmiş konjuge linoleik asit kompozisyonunun eldesidir. Buna göre, geliştirilen laboratuvar metotları linoleik asitten, cis-9,trans-11 and trans-10,cis-12 KLA izomerlerinin sentezine yöneliktir. Deneysel çalışmalar için kullanılan KLA'nın üretim metodu, cis-9,trans-11 (40.8-41.1%), trans-10,cis-12 (43.5-44.9%), ve trans-9,trans-11/trans-10,trans-12 (4.6-10%) izomerlerinin eldesine yöneliktir. Piyasadaki KLA izomerlerinin 8,10 ve 11,13 pozisyonlarında konjuge çift bağ içeren diğer izomerleri de içerebileceğini belirtmekte yarar vardır (10).



Şekil 4 : KLA izomerlerinin α -linolenik asit ve γ -linolenik asitten sentezinde kullanılan prosedür (11).

Şekil 4’de gösterildiği gibi, γ -linolenik asidin hidrazinle hidrojenasyonunun ardından, etilen glikol içinde KOH ile konjugasyonu ve sonunda Ag^+ -HPLC (Gümüş iyon-yüksek performanslı sıvı kromatografisi) ile izolasyonuna dayanan proste cis-6,trans-8 KLA, trans-7,cis-9 KLA, cis-9,trans-11 KLA ve trans-10,cis-12 KLA izomerleri sentezlenir. Aynı prosedür α -linolenik asite uygulandığında ise cis-9,trans-11 KLA, trans-10,cis-12 KLA, cis-12,trans-14 KLA ve trans-13,cis-15 KLA izomerleri sentezlenmiş olur (11).

Piyasadaki en yaygın ürün olan ve aynı zamanda bu çalışma için de kullanılan Tonalin[®] TG 80, aspir yağından üretilen ve KLA içeriği zenginleştirilmiş bir üründür. Bu ürünün eldesinde, yağ asitleri transesterifikasyonla etanol içersinde yağ asitleri etil esterlerine (YAEE) dönüştürülmüştür. Alkali şartlar altında izomerizasyonu sağlandıktan sonra ise etil esterler hidroliz edilmiştir. Ardından yapılan destilasyonla ayırma ve KLA’nın gliserol ile lipaz katalizli re-esterifikasyonu, cis-9,trans-11 ve trans-10,cis-12 izomerlerini eşit oranda içeren bir ürün verir (12).

1.2.1.5 Konjuge Linoleik Asidin Fizyolojik Etkileri

Konjuge linoleik asidin, pişirilmiş sığır etinde antikarsinojenik ve antimutajenik etkilerinin keşfinden sonra (1979), vücutta yağ birikimini azaltıcı etkisi, antidiabetik etkileri, arteriosklerozis riskini azaltıcı, kemik mineralizasyonunu artırıcı ve immün sistemi kuvvetlendirici etkileri de keşfedilmiştir. Bu nedenle besin desteklerinin popüler olduğu son zamanlarda ise besin takviyesi amacıyla kullanılan fonksiyonel gıda üretiminde sıkça rol oynamaktadır (4).

Genel beslenme alışkanlıkları sadece günlük ortalama 200 mg cis-9, trans-11 izomerinin vücuda girişine olanak tanırken, söz konusu fizyolojik etkilerin görülmesi için günde ortalama 400 mg’dan daha fazla cis-9, trans-11 izomeri alınmalıdır (3). Diğer bir aktif izomer olan trans-10, cis-12 izomeri ise günlük diyetle nadir karşılaşılır. Konjuge linoleik asidin fizyolojik etkilerini şu başlıklar altında toplayabiliriz ;

1.2.1.5.1 Antikarsinojenik Etkisi

Geçtiğimiz otuz yılda, çeşitli kanser oluşumlarıyla diyetle alınan yağ arasındaki ilişkiye yönelik birçok epidemiyolojik çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda yağın kanserin etiolojisindeki yeri hala tartışma konusu olmaktadır (13).

In vitro çalışmalar gösteriyor ki KLA'nın antikanser aktivitesi, KLA'nın lipit peroksidasyonunu düşürmesinden ileri gelmektedir (06). Ayrıca *in vitro* KLA'nın akciğer adenokarsinom ve glioblastom, östrojen reseptörü pozitif MCF-7 ve insan prostat kanser hücrelerinin proliferasyonunu azalttığı göstermiştir (14).

In vivo çalışmalarda ise KLA'nın karsinogenlere maruz kalmış dişi ratların diyetine eklenmesinin sonucu olarak, yağ peroksidasyonunun son ürünü olan malondialdehit düşük miktarlarda saptanmıştır. Bu da KLA'nın *in vivo* antioksidan özellik göstermesinin bir sonucudur. Ancak şu ana kadar hedef dokuda artmış olan lipit peroksidasyonuna yönelik kesin bir bulgu yoktur.

Bulgular sonucunda eikosanoidlerin aktivitesinin KLA tarafından düzenlendiği düşünülmektedir. *In vivo* kanıtlar KLA'nın apoptozisi (programlanmış hücre ölümünün ana tiplerinden biridir) uyarması sonucu tümör kütleindeki azalma, programlanmış hücre ölümlerini uyarmasının bir sonucudur (6). Yapılan çalışmalara göre onkogen regülasyonu ve eikozanoid üretimi ile indüklenen apoptozise iki majör KLA izomerinin farklı etki gösterdiği belirtilmiştir. 10-trans,12-cis izomeri en çok eikozanoid oluşumu ve COX-2 enzimini etkilerken, 9-cis, 11 trans izomeri onkogenlerin ekspresyonunda etkilidir (13).

Hayvan deneylerinde diyetle alınan KLA'nın, yani cis-9, trans-11 izomerinin, prostat ve kolon kanserlerinde antikanserojen ve akciğer metastazında antimetastatik etkisi bulunduğu, fakat 10-trans,12-cis izomerinin ise kolon kanserlerini indükleyici etki gösterdiği kaydedilmiştir. Ayrıca doza bağlı olarak meme kanseri insidansını azalttığı ratlarla yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Memenin gelişim süresince alındığında ise tümör gelişimini engellediği belirtilmiştir (14).

Kemirgenlerde kimyasal ajanlarla oluşturulmuş olan meme kanserini 10-trans,12-cis ve 9-cis,11-trans izomerlerinin ikisi de başarılı bir şekilde inhibe ederken (14), MCF-7 meme kanseri hücrelerin proliferasyonunu inhibe etmede 10-trans,12-cis izomeri 9-cis,11-trans izomerinden daha etkilidir (15).

KLA'nın memede epitel yoğunluğu azaltmasına karşın meme dokusunda total ve nötral fosfolipit seviyesine bir etkisi yoktur. Son çalışmalar KLA alımının artması

ile meme ve karaciğer dokularında da bir artış görülmüş ve bunun antikanserojen etkide rol oynayabileceği belirtilmiştir. Yalnızca meme kanseri değil bütün tümörlerde KLA kullanımı araştırma konusudur ve bu konu açıklığa kavuşturulmaya çalışılmaktadır. Bunun sebebi ise KLA kanlanmayı inhibe ederek tümör gelişimini engeller ve bu da meme kanserinde anjiogenezisi inhibe ettiğini göstermektedir (14).

KLA'nın hayvanlarda tümör büyüme/metastaz inhibisyonu, hücrelerde kanser hücre proliferasyonunun inhibisyonu ve hayvanlarda anjiogenezis inhibisyonu anti-kanser aktivitesinin sonuçlarıdır (13).

Prostat kanseriyle KLA kullanımı arasındaki ilişkiye yönelik epidemiyolojik bir çalışma yapılmamıştır. Ancak yapılan hayvan denemelerinde, meme kanserine benzer olarak prostat kanserinde de anti-tümör etki KLA kullanımına bağlı olarak gözlenmiştir (13).

1.2.1.5.2 İmmunolojik Etkileri

Fizyolojik ve patolojik durumlarda yağ asitlerinin immün sistem üzerinde etkili olduğu bilinmektedir, ancak KLA ile ilgili bu konuda az çalışma vardır.

Hücrelerdeki ve kandaki yağ asiti profili diyetle alınan yağ asidi profilini yansıtır. İmmün sistemin endotoksin gibi enfeksiyöz bir ajana cevabı aktive olmuş lökositlerden interlökin-1 (IL-1) ve tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α) gibi pek çok sitokini salgılatmaktır (14).

İmmün sistemi kontrol altında tutan sitokinler, hücresel büyüme, immün sistem, doku onarımı gibi biyolojik olaylarda rol oynayan bir glikoproteindir. Sitokinler tarafından lenfosit çoğalması uyarılarak makrofajlar tarafından immün sistemin hormonları sentezlenmekte ve serbest bırakılmaktadır. Ayrıca eikosinoidlerden bir omega 6 yağ asidi olan arasonik asit (C20:4 n-6) sentezini sağlayan KLA antiinflamatuvar etki göstermektedir (4). Araşidonik asit sentezinden sonra eikozanoid sentezi için üç yol vardır. Birisi, prostaglandinler ve tromboksanları oluşturan siklooksijenaz yoludur. İkincisi lökotrienleri oluşturan lipooksijenaz yolu ve üçüncüsünde epoksit ve dioller oluşturan sitokrom P450 epooksijenaz yoludur. Genelde hücreler her üç yolu birden içermezler, hücrelerin çoğu tek bir temel ürün yaparlar.

İn vivo ve hücre kültürlerinde KLA'nın eikozanoidlerin özellikle de ağrı, ödem ve ateş gibi inflamatuvar semptomların oluşmasında önemli rolü olan

prostoglandin E_2 (PGE_2) sentezini azalttığı belirtilmiştir. KLA'nın bu etkisi COX (siklooksijenaz) için AA (araşidonik asit) ile yarışıyor olmasından ve TNF- α 'nın eikozanoidler üzerine olan etkisinden kaynaklanıyor olabilir (14).

1.2.1.5.3 Kan İnsülin ve Leptin Düzeyleri Üzerine Etkileri

Yapılan çalışmalarda, KLA'nın hayvanlarda ve insanlarda insülin direncini arttırdığının bildirilmiştir (14). Ancak, yapılan bir çalışmada ise 16 genç sedanter bireyin 10 tanesine günde 4 g KLA karışımı (35.5% cis-9, trans-11; 36.8% trans-10, cis-12), diğer 6 bireye ise plasebo verilmiş olup 8 hafta sonunda KLA karışımının açlık insülin konsantrasyonunu azalttığı ve insülin duyarlılığını arttırdığı gösterilmiştir (16). Kullanılan metabolik durumun en önemli faktör olmasının yanı sıra, KLA'nın insülin direncine ve glukoz kontrolüne olan etkileri doza, izomer çeşidine ve türe bağlıdır (14).

Bağlı olduğu etmenler bakımından yine benzer şekilde, KLA izomerleri türe, izomere ve konsantrasyonuna bağlı olarak adipoz yağ birikimini ve leptin üretimini ya inhibe etmekte ya da teşvik etmektedir. Daha çok t-10, c-12 izomeri leptin salgılanmasını azaltırken, c-9, t-11 izomeri ise daha çok insülin rezistansının gelişmesinde rol oynamaktadır (4).

1.2.1.5.4 Arteriosklerozis Üzerine Etkisi

Kronik kalp rahatsızlıklarının gelişmesinde, plazmadaki yüksek kolesterol seviyesi en büyük risk faktörlerinden biridir. Hamsterlar ve tavşanlar üzerinde yapılan bir çalışmaya göre; KLA, LDL (Düşük yoğunluklu lipoprotein) kolesterolü azaltmakta ve arteriosklerozisin gelişimini inhibe etmektedir. Bu arteriosklerozis için risk teşkil eden LDL kolesterol : HDL (Yüksek yoğunluklu lipoprotein) kolesterol oranını ve toplam kolesterol : HDL kolesterol oranını önemli ölçüde düşürmesinden kaynaklanmaktadır (17).

1.2.1.5.5 Vücut Kompozisyonu ve Enerji Metabolizmasına Etkisi

KLA'nın vücutta yağ birikimine olan etkisi doza bağlı olmakla beraber diyetteki yağın içeriğinden bağımsızdır. Beslenmedeki farklılıklardan bağımsız olarak, gelişmekte olan sıçan, rat ve domuzda, 0.5 g-2.0 g / 100 g diyetle alınan KLA'nın yağ içeriğini azalttığı belirtilmiştir (13). Ratlarda, yağ hücrelerinin sayısının

değil de boyutundaki azalma KLA bakımından zengin bir diyetin sonucudur. KLA'nın vücut kompozisyonuna etkisi en çok sıçanlarda görülmekle beraber hamster ve ratlar peşisıra gelmektedir. Sıçanlarda vücut ağırlığı değişmeden yağ dokusunda ortalama % 58 bir azalma söz konusudur. Ve bu çalışma başka deneylerle de desteklemektedir.

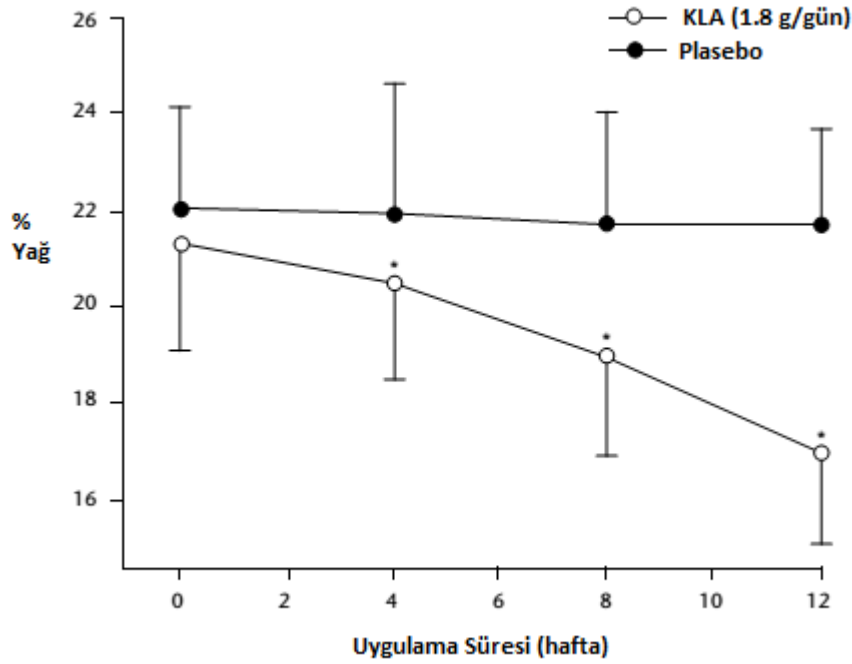
İzomer karışımları kullanılarak yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlar 10-trans,12-cis ve 9-cis, 11-trans izomerlerinden hangisinin yağ metabolizması üzerine daha etkili olduğunu gösteremez. Ancak son zamanlarda yapılan çalışmalarda, bu iki izomerin hangisinin daha aktif olduğuna ilişkin sonuçlar paylaşılmıştır. Bu sonuçlara göre 10-trans,12-cis izomerinin 9-cis, 11-trans izomerine göre yağ metabolizması üzerinde daha etkili olduğu, dolayısı ile vücut yağının azaltılmasında daha aktif rol aldığı sonucuna ulaşılmıştır.

Fast food kültürünün giderek yaygınlaşmasıyla beraber obezitenin artması yüzünden KLA'nın insanlarda vücut yağını azaltmasına yönelik çalışmalar önem kazanmıştır. Ama hala bu çalışmaların sayısı yetersizdir (14).

2000 yılında Blankson ve ark.'nın fazla kilolu ve obez bireylerde yaptığı çalışma KLA'nın vücut kompozisyonu üzerine doza bağlı etkilerinin araştırıldığı ilk çalışmadır. Randomize, çift kör olan bu çalışmada vücut kitle indeksi (VKİ) (BMI-Body Mass Index) 25-35 kg/m² arası olan 60 tane obez gönüllü 5 gruba ayrılmış ve plasebo grubuna 9 g/gün zeytinyağı, diğer gruplara ise 1.7 g/gün - 3.4 g/gün - 5.1 g/gün ve 6.8 g/gün KLA izomer karışımı 12 hafta süreyle verilmiştir. X-ray absorpsiyometresi kullanılarak yapılan ölçümde 3.4 g/gün ve 6.8 g/gün KLA alan gönüllülerde vücut ağırlığı değişmemekle beraber plasebo ile karşılaştırıldığında vücut yağ kitlesinde azalma görülmüştür ve 3.4 g/gün KLA alımının obez ya da fazla kilolu bireylerde vücut yağ kitlesini azaltmakta yeterli olacağı görüşüne varılmıştır (18).

Günlük alınan KLA'nın sağlıklı ve egzersis yapan bireylere olan yararını anlamak için yapılan, randomize, çift-kör ve plasebo kontrollü bir çalışmada ise vücut kitle indeksi 25 kg/m² 'den az olan 20 adet gönüllüye haftada 3 kez 90 dk egzersiz yaptırılmıştır. Deney grubuna 1.8 g/gün KLA karışımı, kontrol grubuna ise plasebo olarak hidrojel verilmiştir. 12 hafta sonunda bu iki grup arasında vücut ağırlığı bakımından bir fark gözlenmemiştir ancak deney grubunun vücut yağ

oranında kontrol grubuna göre % 4 azalma gözlenmiştir. Sonuç olarak KLA alımının egzersiz ile vücut yağını azalttığı sonucuna varılmıştır (19).

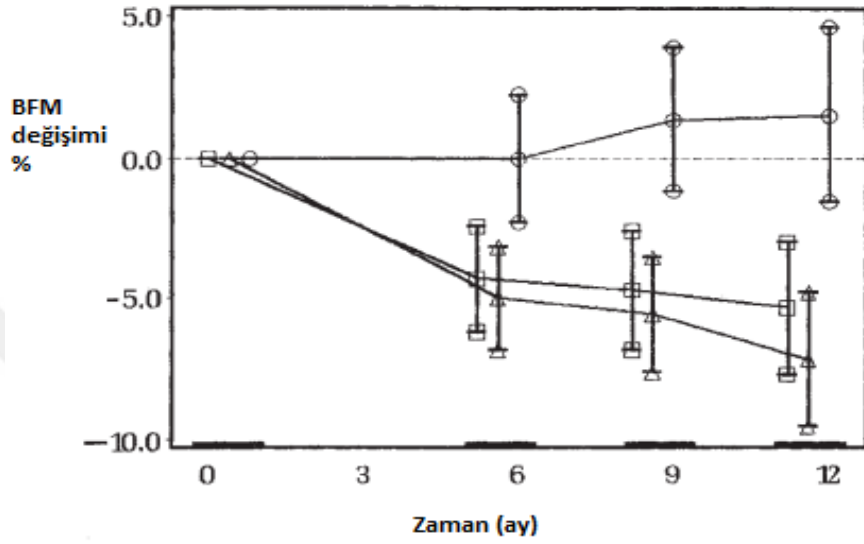


Şekil 5 : Konjuge linoleik asit (1.8 g/gün) uygulanan grup ile plasebo (hidrojel) uygulanan grup arasındaki % vücut yağı değişimlerinin karşılaştırılması (19).

Mougios ve ark.'nın 22 gönüllü üzerinde yaptığı denemede ise kontrol grubuna plasebo verilirken, deney grubuna ilk 4 hafta boyunca 0.7 g/gün KLA karışımı verilmiş olup ikinci 4 haftada bu doz 1.4 g/gün'e çıkarılmıştır. Çalışma sonucu, gönüllülerin vücut ağırlıkları ve BMI'leri (Vücut Kitle İndeksi) değişmezken vücut yağ oranlarında % 3'lük bir azalma görülmüştür (20).

Gaullier ve ark. ise BMI'leri 25-30 kg/m² olan sağlıklı gönüllülerle çift kör ve plasebo kontrollü bir çalışma yaparak KLA'nın uzun süreli etkilerini incelemişlerdir. Bu çalışmada, 180 kadın ve erkek gönüllü üç gruba ayrılmış, birinci gruba KLA'nın FFA formu (Free Fatty Acid-Serbest Yağ Asiti), ikinci gruba ise KLA'nın TAG formu (Triacylglyceride-Triaçilgliserid) ve plasebo grubuna ise zeytinyağı

vermişlerdir. Sonuç olarak KLA kullanımının vücut yağ kitlesinde (BFM) önemli bir azalmaya sebep olduğunu göstermişlerdir (21).



Şekil 6 : 12 ay boyunca KLA-FFA (□), KLA-TAG (△) ve plasebo (○) uygulanan gruplar arasındaki % BFM değişimlerinin karşılaştırılması (21).

Orta yaşlı ve metabolik düzensizlikleri olan gönüllülerde yapılan bu çalışmada ise, KLA'nın abdominal yağ üzerine kısa süreli etkileri araştırılmıştır. Yaşları 39 ile 64 arası olan abdominal obez erkeklerle yapılan bu çalışmada WHR (Waist to Hip Ratio-Bel-Kalça oranı), 1.05 ve BMI değeri 32 kg/m^2 çift kör çalışılmış olup 4 hafta sürmüştür. 14 gönüllüye 4.2 g KLA/gün, 10 gönüllüye ise plasebo verilmiştir. Sonuçta KLA'nın abdominal çevreyi azalttığı görülmüş ve bunun visseral yağı azaltması ile ilgili olduğu sonucuna varılmıştır (22).

Hayvanlarda egzersizle birlikte KLA diyeti ilk kez 2005 yılında Bhattacharya ve ark. tarafından uygulanmıştır. Kontrol grubunda, plasebo olarak % 0.5 oranında aspir yağının ve deney grubunda ise % 0.4 oranında KLA karışımının kullanıldığı çalışmada fareler yüksek yağ içerikli bir diyetle (% 20 mısır yağı) beslenmiştir. Sonuç olarak, KLA'nın vücut ağırlığını değiştirmeksizin vücut yağında önemli

derecede azalmaya neden olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca bu azalışın artan fiziksel aktiviteyle beraber maksimum seviyeye çıktığı belirtilmiştir (23).

2003 yılında Kamphuis ve ark.'nın yaptığı çalışma ise oldukça dikkat çekicidir. Çift-kör, plasebo kontrollü ve randomize dizayn edilen bu çalışmada, 13 hafta boyunca fazla kilolu gönüllülere KLA suplementasyonu yapılmıştır. Ancak bu çalışmanın en önemli özelliği bu suplementasyonun bireylerde kilo kaybını gerçekleştirdikten sonra sağlanmasıdır. Bireylere ilk 3 hafta düşük kalorili bir diyet verilmiş, ardından 13 hafta boyunca ise kontrol grubuna düşük dozda KLA (1.8 g/gün), deney grubuna ise daha yüksek dozda (3.6 g/gün) KLA suplementasyonu sağlanmıştır. 26 erkek ve 28 kadın üzerinde yapılan bu çalışmada sonuç olarak, deney grubundaki geri kazanılan yağsız kütlenin kontrol grubuna göre daha fazla olduğu görülmüştür. Yani KLA vücutta birikmiş olan yağ kütlesini azaltmaktan öte, yağlı kütlenin yeniden geri alınmasını engellemektedir (24).

KLA'nın vücuttaki bu mekanizmasına bakarak, lipit metabolizmasındaki önemli enzimlerin aktivitesini değiştirdiği söylenebilir. Deney hayvanlarında adipositlere lipit girişini sağlayan lipoprotein lipaz aktivitesinin azalması ve bazı dokularda ise palmitoil karnitin açıl transferaz aktivitesinin artması sonucu lipolizin hızlanması ve yağ mobilizasyonunun artması KLA suplementasyonun bir sonucudur. Bu mekanizmanın dışında, adiposit proliferasyonu ve farklılaşmasını azaltması ve adipositlerde apoptozisi stimule etmesinin de rolü vardır.

KLA asıl etkisini, genlerin ekspresyonunu düzenleyen yağ asiti reseptörleri olan, peroksizom proliferatör-aktive reseptörlerin (PPARs – peroxisome proliferator-activated receptors) hücre içi regülasyon yollarını değiştirerek gösterir. KLA, PPAR- α için bir ligand ve aktivatördür ve bu transkripsiyon faktörünün lipoprotein lipaz, yağ asiti bağlayıcı protein ve açıl koenzim A oksidaz gibi pek çok enzimin gen ekspresyonunu düzenliyor olması KLA'nın lipit ve glukoz metabolizması, enerji dengesi ve termogenezdeki etkilerini açıklayan bir diğer mekanizmadır.

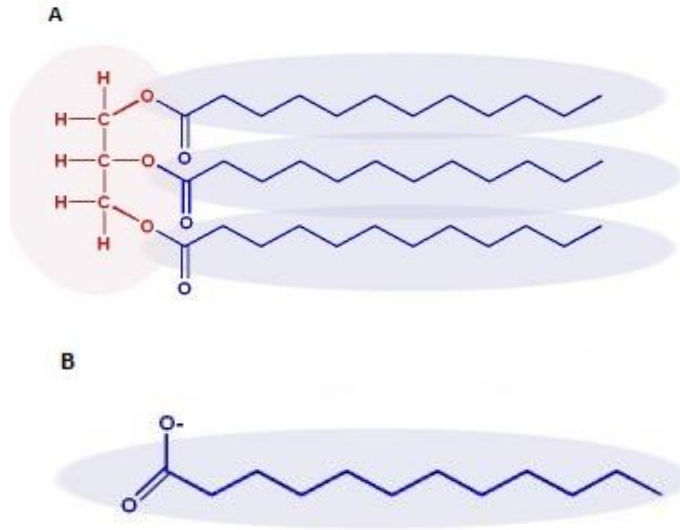
Yukarda belirtilen vücut kompozisyonu ve hormon metabolizması üzerine olan etkilerinde olduğu gibi bu izomerlerin diğer fizyolojik etkileri de farklı olmakla beraber bazen de zıttır. Kilo alımından sorumlu anabolik bir ajan gibi davranan 9-cis,11-trans izomerine karşın 10-trans,12-cis izomeri lipoliz ve yağ oksidasyonunu arttıran katabolik bir ajan gibi davranır. Yani vücuttaki yağ miktarının azaltılmasında 10-trans,12-cis izomeri etkilidir (14).

Yağ miktarının azaltılmasında, biyokimyasal mekanizmaya ilişkin için iki görüş bulunmaktadır. Bunlardan ilki, trans-10,cis-12 izomerinin direkt veya bir metabolit aracılığıyla adipozitlerde lipid birikimini düzenlemesi, diğeri ise *in vivo* olarak trans-10,cis-12 izomerinin (veya biyoaktif metabolitinin) vücut yağlanmasını kontrol etmesidir (4).

1.2.1.6 KLA Kullanımının Toksikolojik İncelemesi, Dozaj ve Yan Etkiler

Ratlardaki toksisite sonucuna göre, 36 hafta boyunca diyetin % 1.5' i kadar KLA kullanımı organlara histopatolojik bir zarar vermemiş olup, hematolojik bir anormalliğe yol açmamıştır. Ayrıca diyetle kullanılan KLA'nın anti-DNA anti-body üretimine bir etkisi yoktur.

Günlük 3 g'dan fazla KLA kullanımı, vücut kompozisyonunu istenilen yönde olumlu olarak etkilemektedir. KLA'nın absorpsiyonu ve dokuda dağılımı nedeniyle, ticari olarak daha yaygın olan KLA'nın serbest yağ asidi formunun (Şekil 7) süt yağı içeren ürünlerle suplementasyonu önerilmektedir.



Şekil 7 : A) Triaçilgliserit formunun (TGA- triacylglyceride) ve B) serbest yağ asidi formunun (FFA-free fatty acid) genel gösterimi.

Hayvan ve insan çalışmalarından hareketle, düzenli KLA suplementasyonunun glikoz seviyesini ve insülini, HDL ve Lp (a) (lipoprotein (a)) fraksiyonlarını içeren serum lipitleri kadar iyi düzenlediği söylenebilir. İnsandaki denemelerden sonra, gastrointestinal şikayetler ve yorgunluk yan etki olarak gözlenmiştir (6).

1.2.1.7 Konjuge Linoleik Asit Miktarının Belirlenmesi İçin Analitik Metotlar

Konjuge linoleik asidin analizindeki en önemli husus, pozisyonel ve geometrik izomerlerin iyi bir şekilde ayrımı ve belirlenmesidir. Türevlendirme aşamasında meydana gelebilecek olan izomerizasyon kontrol altında tutulmalı ve istenmeyen izomerlerin kontrolsüz oluşumuna dikkat edilmelidir.

Mümkün olan izomerlerin biyolojik sistemlerde farklı etkilerinin olması nedeniyle KLA'nın analitik metodolojisi çok önemlidir. Ticari olarak serbest yağ asidi formunda üretilen ve arz edilen KLA karışımlarının analizi hayvansal kaynaklardaki KLA izomerlerinin belirlenmesinden daha kolaydır. Bunun nedeni hayvansal kaynaklarda mg/kg düzeyinde bulunan KLA, ticari ürünlerde % mertebesinde dir. Ayrıca hayvansal kaynaklarda bulunan KLA'nın ester formunda bulunması, bu matrislerde analizi zorlaştırmaktadır.

Gaz kromatografisinin (GC), CP-Sil 88TM ya da BPX-70TM (100 m) gibi kapiler kolonlar ile kombinasyonu bu analizler için en yaygın yöntemdir. Kütle spektrometresi (MS) ile gaz kromatografisinin eşleşmiş bir sistem olarak kullanılması, 4,4-dimethyloxazoline (DMOX) türevleri ve/veya 4-methyl-1,2,4-triazoline-3,5-dione (MTAD) ajanlarının kullanımını gerektirir.

Son zamanlarda daha da yaygınlaşmaya başlayan Gümüş İyon Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi geometrik ve pozisyonel izomerlerin ayrılmasında elverişlidir. Ayrıca GC-MS analizinden önce, doğal kaynaklardaki KLA konsantrasyonunun belirlenmesi için gereken deriştirme işlemi, ters faz (RP-reverse phase) sıvı kromatografisi ile yapılır.

Ticari KLA'nın karakterizasyonu için en kapsamlı yol ¹³C-NMR spektrometresinin kullanılmasıdır. Bu metotla KLA'nın 7,9- karbondan 11,13- karbona pozisyonel izomerlerinin ve geometrik izomerlerinin (cis,trans-, trans,cis-, cis,cis- ve trans,trans-) yapısı belirlenebilir. Ancak bu yöntem için gereken örnek miktarı fazladır ve bu yüzden doğal kaynaklardan elde edilen ekstraktlara uygulanabilir değildir (25).

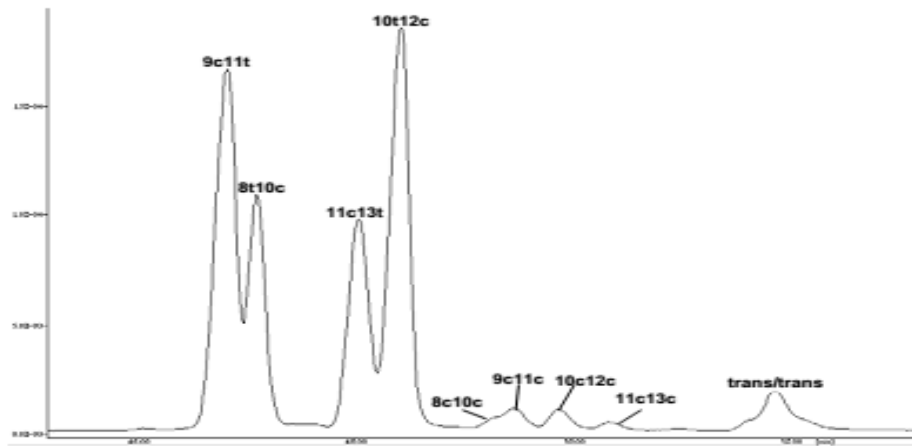
1.2.1.7.1 Gaz Kromatografisi İle Analizler

Salt uçuculaşabilen analitler için uygun bir yöntem olan GC'nin yağ asitleri analizinde kullanılabilmesi için yağ asitlerini metil esteri formuna çevirmek gerekir. Bu dönüşüm için asit katalizli metillendirme yöntemi kullanılması geometrik izomerizasyona yol açar ve trans,trans izomerlerinin oranında artış meydana gelir. Diğer yandan baz katalizli transesterifikasyon yönteminin böyle bir sakıncası yoktur. (25). Serbest yağ asitleri faz transfer katalizörleri yardımı ile metillendirilebilir. Diğer yandan en çok kullanılan türevlendirme ajanlarından biri olan trimethylsilyldiazomethane ise reaksiyon ortamında istenmeyen ürünlere yol açmaktadır (25).

Sonuç olarak baz katalizli metillendirme, lipidlerin esterifikasyonunda en iyi yöntem olarak belirtilmekle beraber, asit katalizli metillendirme ise izomerizasyona neden olmaktadır (25).

Yağ asitleri analizinin rutin analizinde yaygın olarak kullanılan carbowax tipi kapiler kolonlar, sadece cis-9,trans-11 ve trans-10,cis-12 izomerlerinin ayrılması için yeterlidir. Diğer izomerler bu kolonlarla ayrılamaz.

Yapılan çalışmalara göre en iyi ayrılma CPSil 88TM ve BPX-70TM markalı kolonlarda sağlanmıştır. Şekil 8'de gösterildiği gibi KLA izomerleri konjuge olmayan dienlerden daha sonra elüe olmuştur. İzomerlerin geliş sırası 9c,11t < 8t,10c < 11c,13t < 10t,12c gibidir (25).

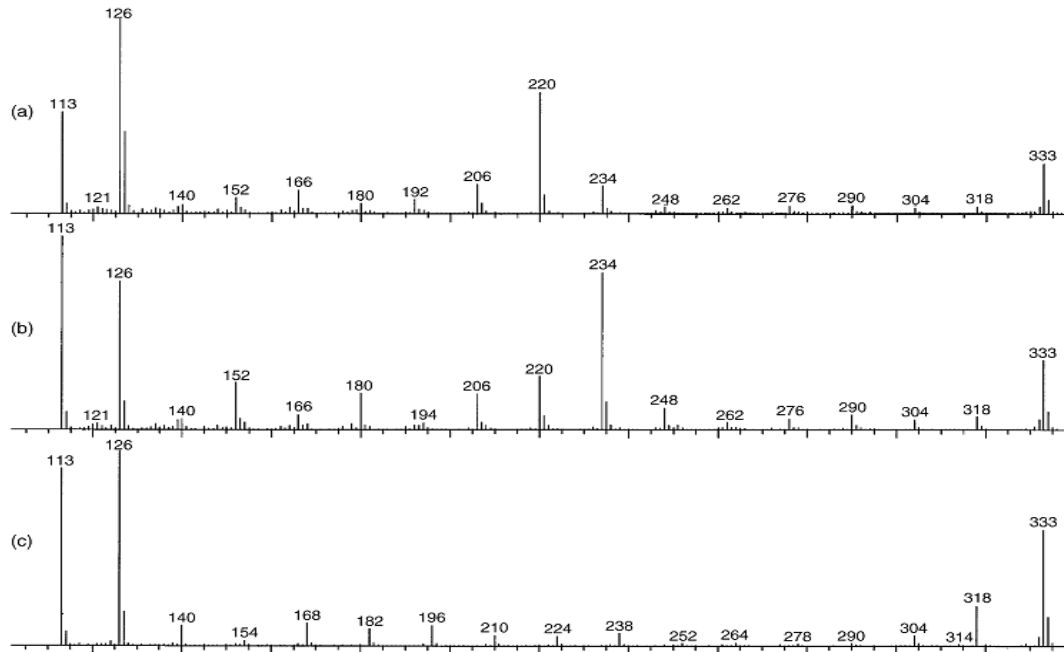


Şekil 8 : KLA metil esterlerinin BPX70 (120 m x 0.25 mm; 0.25 µm) kapiler kolondaki kromatogramı (25).

Gaz kromatografisiyle kombin bir sistem olan alev iyonlaşma dedektörü (FID), izomerlerin ayrı ayrı belirlenmesinde yetersiz bir seçiciliğe sahip olduğundan sadece toplam KLA miktarının belirlenmesi için kullanılabilir. GC-FID sisteminde sadece analitlerin geliş zamanlarına (RT) göre tanımlama yapılabilir. Pozisyonel izomerlerin elüsyon sıralaması : cis-trans, cis-cis ve trans-trans şeklindedir (11).

Gaz kromatografisiyle kütle spektrometresinin eşleştiği sistemlerde ise (GC-MS) daha yüksek seçicilik ve hassasiyetle KLA izomerlerinin analizi yapılabilir. Girişim yapabilecek diğer yağ asitlerinin de bulunduğu bir ortamda moleküler iyon olarak $m/z = 294$ iyonunun kullanılması yüksek seçicilik sağlar (11).

KLA'nın pozisyonel izomerlerini ayırmak için konjuge dien sistemini türevlendirmek gerekir. En çok kullanılan yöntem ise, doymamış yağ asitlerini 2-amino-2-metil-1-propanol kullanarak, dimethyloxazolyne (DMOX) türevlerine çevirmektir. Diğer bir yöntem ise Diels-Alder reaksiyonu ile 4-methyl-1,2,4-triazolyn-3,5-diones (MTAD) türevini oluşturmaktır (11).

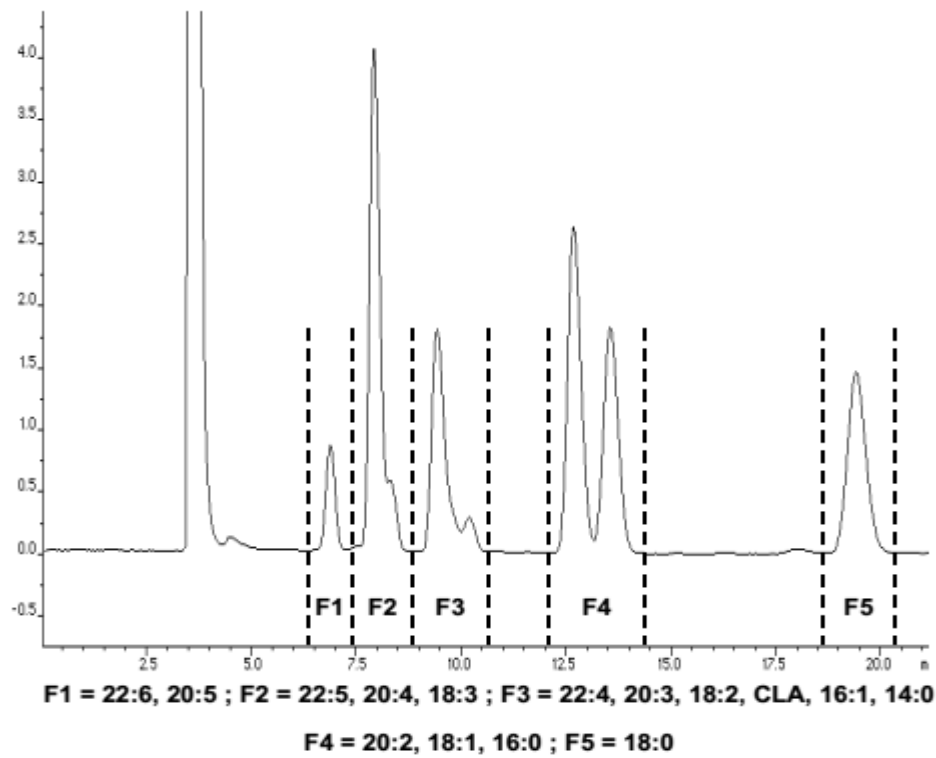


Şekil 9 : (a) 6,8-18:2, (b) 7,9-18:2 ve (c) 13,15-18:2 KLA izomerlerinin DMOX türevlerine ait EI (Electron Impact) kütle spekturumu (26).

1.2.1.7.2 Gümüş İyon Kromatografisi İle Analizler

Gümüş iyon ince tabaka kromatografisi ile konjuge dienler monoenlere yakın bir şekilde elüe olurlar. Ancak iyon-değiştiren adsorbana sahip bir kolonla gümüş iyon HPLC yöntemi daha iyi bir ayırma sağlar. Konjuge dienlerin UV absorbans değeri 230-235 nm arasında iken, izole dienlerin 206-210 nm arasındadır.

Mobil faz olarak hekzan:asetonitril:asetik asit karışımının kullanıldığı metotlarda, KLA'nın serbest yağ asidi formlarının iyi bir şekilde ayrıldığı belirtilmiştir. Konjuge çifte bağların dedeksiyonu için spesifik dalga boyu 234 nm'dir. Bu prosedür ticari olarak piyasada bulunan KLA'nın yağ asidi formu için türevlendirmeye gerek kalmadan uygulanabilir (25).



Şekil 10 : Yağ asidi metil esterlerinin ters faz sıvı kromatografisi ile ayrılmasına ilişkin kromatogram. (dalga boyu : 234 nm, Kolon : A Nucleosil C18 (250 x 10mm ID; 5µm), akış hızı 4: mL/dk, mobil faz : asetonitril) (25).

1.2.2 L-karnitin

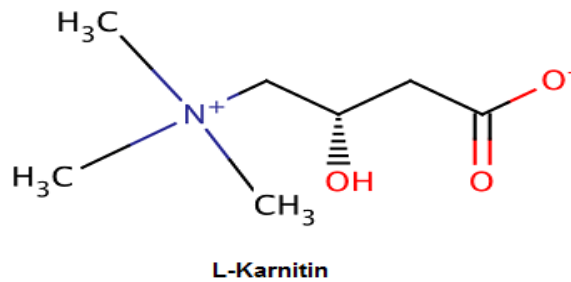
1.2.2.1 L-karnitin'in Kimyasal Yapısı

Kimyasal ismi β -hidroksi- γ -trimetilaminobutirat olan L-karnitin, memelilerin dokularında esansiyel olarak bulunan ve dış kaynaklardan endojen olarak sentezlenen bir maddedir (27).

Lisin aminoasidinin bir türevi olan L-karnitin, İlk kez 1905 yılında iki Rus bilim adamı (Gulewitsch ve Krimberg) tarafından kas dokudan izole edilmiştir ve bu nedenle latince et anlamına gelen “carnis” sözcüğünden esinlenilerek L-karnitin olarak isimlendirilmiştir (28)(29).

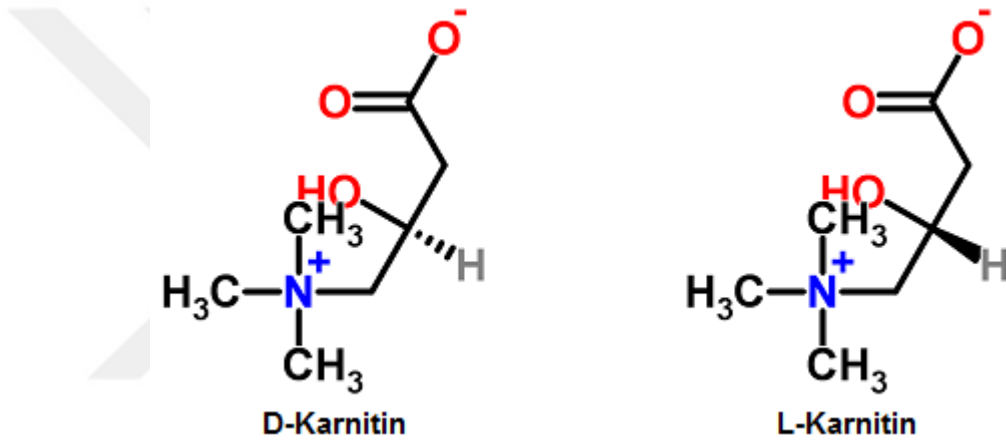
Un kurdunun (*Tenebrio molitor*) metaformoz aşamasında vitamin gibi davrandığı için önceleri B_T vitamini olarak adlandırılan L-karnitin günümüzde de yaygın olarak B_T vitamini olarak bilinmektedir. Ancak bu adlandırma genel anlamda yanlıştır. Çünkü insanlar ve çok hücreli diğer canlılar L-karnitin'i endojen olarak sentezleyebilmektedir. Ancak bazı özel beslenme durumlarında (hamilelik,bebeklik) L-karnitin dışarıdan alınması gereken zorunlu bir besin ögesi olmaktadır (05). Ko-enzim fonksiyonuna sahip olmayan L-karnitini vitamin benzeri etki yapan maddeler sınıfına sokmak daha doğru olacaktır (30).

Beyaz renkli toz şeklinde olan L-karnitin, su içinde yüksek çözünürlüğe ve 200 °C'nin üstündeki sıcaklıklarda termal kararlılığa sahiptir. Sulu çözeltisinde dipolar (zwitteryon) olarak bulunur ve iyonize grupları (COO⁻ ve N⁺ (CH₃)₃) grupları suda serbestçe çözünür (31).



Şekil 11 : L-karnitin'nin (β -hidroksi- γ -trimetilaminobutirat) kimyasal yapısı.

β -hidroksi grubunun bağılı olduğu karbon atomu kiraldır ve bu nedenle bu molekül optikçe aktif bir moleküldür. Bir asimetrik karbon atomuna sahip olması nedeniyle D ve L formlarına sahiptir. Dokularda sadece L-karnitin formu sentezlenir sadece bu formu metabolik olarak aktiftir (31). D-Karnitin ise L-karnitin'in biyolojik fonksiyonlarının birçoğunu yerine getiremez ve yüksek dozları toksik etki gösterir (32). D ve L sınıflandırılması ilk kez 1962'de Kaneko ve Yoshida tarafından yapılan Karnitinin doğal olarak bulunan L formu "fizyolojik karnitin" olarak tanımlanmıştır (28).



Şekil 12 : L-karnitin ve D-Karnitin'nin kimyasal yapıları (33).

1.2.2.2 L-karnitin Kaynakları

D formu ancak kimyasal olarak sentezlenebilen karnitin, doğada ise sadece L formunda bulunur. Bir rasemat olan D-L karışımı ise bu iki enantiyomerin yarı yarıya karışımıdır.

Bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar için esansiyel olan L-karnitin bitkisel besinlerde hayvansal besinlere göre daha az miktarda bulunur. Hidrofilik yapıda olan bu madde hayvansal ya da bitkisel yağlarda bulunmamaktadır (28).

Eksojen olarak diyetle alınan L-karnitin en fazla kırmızı et (1200-1500 mg/kg) olmak üzere balık tavuk ve süt ürünlerinde bulunmaktadır. Ayrıca en fazla L-karnitin içeriği kanguru kasında (5970 mg/kg kuru madde) ve at kasında (3010 mg/kg kuru

madde) belirlenmiştir. Tablo 2’de belirtildiği gibi bitkisel besinlerde L-karnitin miktarı düşüktür (29).

Hayvansal Kaynaklar	L-karnitin İçeriği (mg / 100g)	Bitkisel Kaynaklar	L-karnitin İçeriği (mg / 100g)
Kırmızı Et	120-150	Avokado	58.0
Kanguru Kası	597	Mısır	0.5
At Kası	301	Arpa	0.7
İnek Karaciğeri	11	Buğday Kepeği	1.5
İnek Böbreği	6.6	Buğday Unu	0.5
Domuz Karaciğeri	10.7	Yulaf	0.5
Keçi Kası	183	Soya Fasulyesi Unu	1.2
Süt	1.7		
Dana Eti	64.6		
Tavuk	8.0		
Tütsülenmiş Somon	5.8		
Balığı			
Yağsız Yoğurt	12.1		

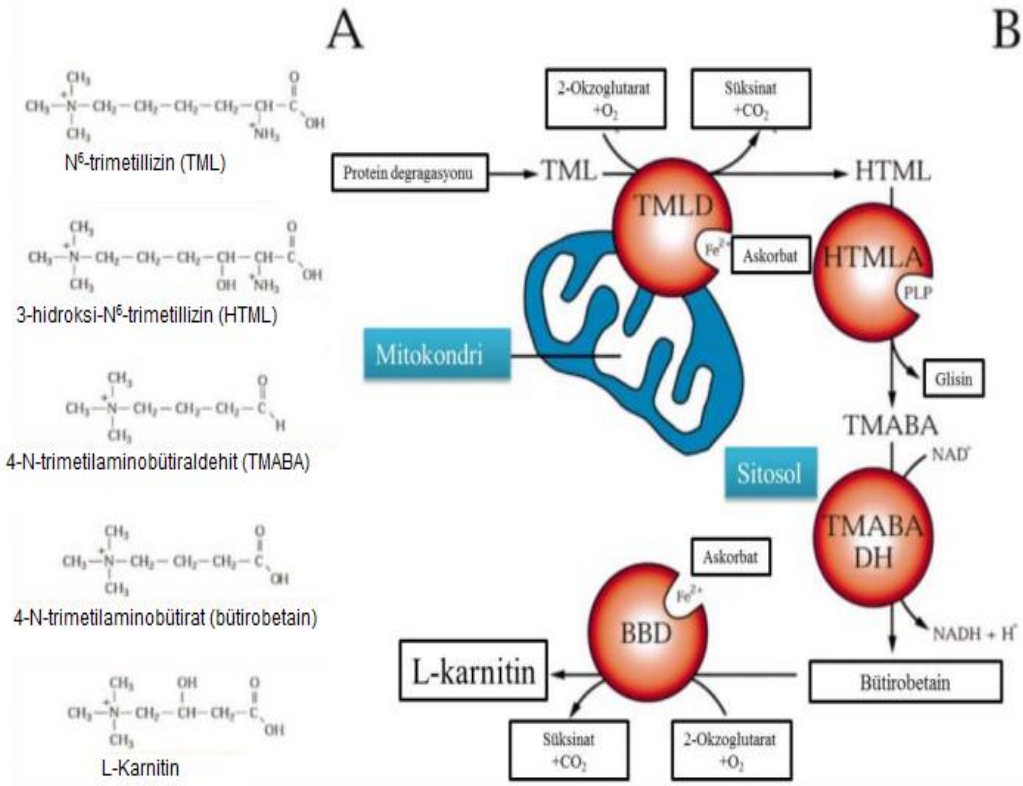
Tablo 2 : Hayvansal ve bitkisel kaynaklardaki L-karnitin miktarları (28)(29).

Ancak pişirme ve saklama yöntemlerine göre L-karnitin miktarındaki değişimin nasıl olacağını gözlemlemek üzerine yapılan bir çalışmada, kırmızı et ve somon fileto yağda kızartma, haşlama, ızgara, fırınlama, buğulama ve dondurma işlemlerine tabi tutulmuştur. Ancak sonuç olarak L-karnitin miktarlarında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (34).

1.2.2.3 L-karnitin'in Biyosentezi

Vücutta en fazla karaciğer, böbrek ve beyinde sentezlenen L-karnitin daha sonra enerji üretimi için bu bileşiğe ihtiyaç duyulan doku ve organlara (özellikle kas ve kalp dokuları) kan dolaşımı ile taşınır. L-karnitin sentezi için lisin ve metiyonin gerekli aminoasitlerinin yanı sıra C vitamini, demir (Fe^{2+}), B6 vitamini ve nikotinamid adenin dinükleotit (NAD) yapısında niasine ihtiyaç vardır. Ayrıca metiyonin sentezi için gerekli olan B12 vitamini eksikliğinde de L-karnitin'in işlevi bozulur. L-karnitin'in vitamin benzeri bir madde olarak sınıflandırılması bu yüzdendir.

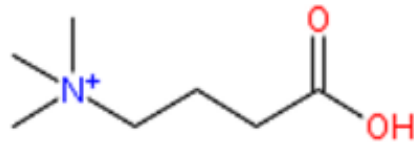
İnsanlarda lisin ve metionin aminoasitlerinden endojen L-karnitin sentezi beş basamaklı reaksiyon zinciri ile gerçekleşir. Sentezin ilk basamağı proteine bağlı lisinin metilasyonudur bu basamakta metilleyici ajan 5-adenozilmetionindir. Reaksiyon sonucunda trimetillizin meydana gelmektedir. İkinci basamakta 3-hidroksitrimetillizin, üçüncü basamakta deoksikarnitinaldehid, dördüncü basamakta ise deoksikarnitin oluşmaktadır. Beşinci ve son basamakta etken katalizör enzim deoksikarnitin hidroksilazın (gama-butirotetain hidroksilaz) etkisiyle karnitin meydana gelir. Deoksikarnitin karnitine hidroksilasyonu karaciğer, beyin ve böbreklerde meydana gelirken diğer dokularda (iskelet kasları, kalp kası vb.) enzim işlevi olmadığı için karnitin sentezi yapılamamaktadır. Biyosentez düzeyi 0.16 mg/kg ile 0.48 mg/kg vücut ağırlığı/gün'dür. Yani 70 kg'lık bir birey günde ortalama 11-34 mg kadar L-karnitin sentezleyebilir (29).



Şekil 13 : L-karnitin'in biyosentez yolu (35)

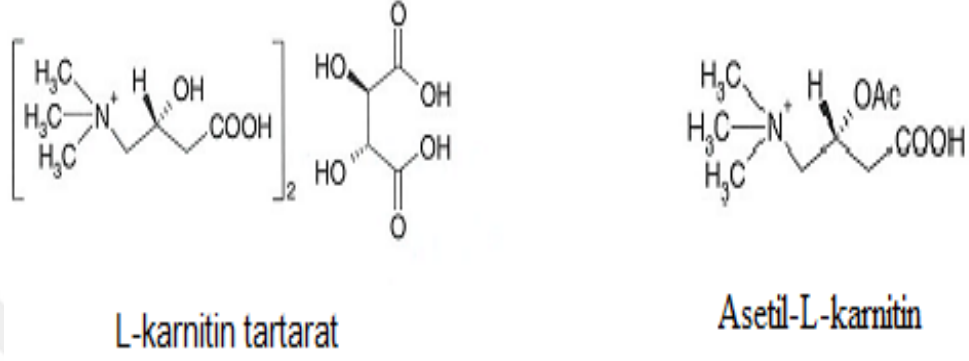
1.2.2.4 L-karnitin'in Biyoteknolojik ve Kimyasal Sentezi

4-bütirobetain'in biotransformasyonu sonucu enantiyomerik olarak %99.5 verimle ve %99.9 saflıkta L-karnitin elde edilebilmektedir.



Şekil 14 : 4-bütirobetain'in kimyasal yapısı

Bu proses, L-karnitin üretiminde kullanılan tek biyoteknolojik prosestir. Ayrıca tablet ve kapsül üretimi için uygun olan L-karnitin tartarat ve Asetil-L-karnitin de bu yöntemde elde edilen L-karnitinden yola çıkılarak sentezlenir.



Şekil 15 : L-karnitin tartarat ve Asetil-L-karnitin'in kimyasal yapısı

D-karnitin biyolojik olarak inaktif olmakla beraber L-karnitin'in etkilerini inhibe eder. Rasemik karışımlarla yapılan çalışmalar sonucunda D-karnitin'in diyeteye uygun olmadığı ve sadece L-karnitin'in gıda üretiminde rol alabileceği belirtilmiştir. Bu nedenle bu enantiyomer çifti için optik saflık çok önemlidir.

Doğa bize enantiyoselektif olarak sadece bir optik formu sunar. Bu nedenle optik saflığın önemli olduğu üretimlerde biyoteknolojik metotların kimyasal yöntemlere göre üstünlüğü vardır. Doğal kaynaklardan ekstraksiyon her zaman bir seçenek olmakla beraber ekonomik bir çözüm değildir.

Kimyasal sentezde epiklorhidrin ve trimetilamin gibi ucuz hammaddelerden yola çıkılır ve ardından rasemat fraksiyonlu kristallendirme ile ayrılır. Ancak enantiyomerik olarak saf L-karnitin üretimi ticari olarak pek kullanışlı değildir (36).

1.2.2.5 L-karnitin'in Fizyolojik Etkileri

Enerji üretiminde ve yağ metabolizmasında önemli bir rolü olan L-karnitin 3 önemli metabolik fonksiyona sahiptir.

L-karnitin, CoA serbest kalırken asetil grupları ile bağlanır ve daha sonra asetil grupları böbreklere taşınır ve burada sonunda elimine edilirler. Mitokondrial asetil-CoA/CoA oranı serbest CoA'ya dönüştürülür (28).

1.2.2.5.3 Kısa ve Orta Zincirli Yağ Asitlerinin Mitokondriden Taşınması

Kısa ve orta zincirli yağ asitleri CoA'dan L-karnitine mitokondrial matrikste transfer olur. Bu süreç, enerji metabolizması için ihtiyaç duyulan serbest CoA'yı ve aynı zamanda mitokondriden fazla miktardaki asetil ve açıl-CoA gruplarının taşınmasını sağlar. Bu mekanizma, belirli ilaçların kullanımı süresince L-karnitin'in tüketilmesinde rol oynayabilir (28).

L-karnitin'in metabolizmadaki fonksiyonlarını kısaca özetlersek ;

- ✓ Yağ asitlerinin taşınması,
- ✓ Hücre membranlarının korunması ve ayarlanması,
- ✓ Serbest CoA için gerekli ortamın sağlanması,
- ✓ ATP'nin elde edilmesini optimize etmek,
- ✓ Amonyak toleransını arttırma,
- ✓ Bağışıklık sisteminin desteklenmesi,
- ✓ Spermatogenesis ve sperm hareketliliğini destekleme

1.2.2.6 L-karnitin ve Egzersiz

L-karnitin'in yağ asitlerinin oksidasyonunu arttırması yani enerjiye dönüşümünü aktive etmesi nedeniyle bu konuda birçok çalışma yapılmıştır. Yoğun egzersizle karnitin seviyesinin azaldığı ve laktat seviyelerinin yükseldiği tespit edilmiştir. Düzenli egzersiz ve L-karnitin kullanımı ile organizmanın enerji kullanım kapasitesinin arttığı tespit edilmiştir (37).

1.2.2.7 L-karnitin Kullanımının Toksikolojik İncelemesi, Dozaj ve Yan Etkiler

L-karnitin için toksisite bilgisi EFSA (European Food Safety Authority) tarafından belirtilmiştir. Bu çalışmada gönüllülere günlük 3 g'lık dozlar halinde üç hafta boyunca L-karnitin verilmiş ve bu miktar tolare edilmiştir. Ayrıca farelerle yapılan denemede 5000 mg/kg vücut ağırlığı kadar oral yolla verilen L-karnitin toksik bir etki göstermemiştir.

Hali hazırda zaten diyetle yeri olan L-karnitin için kabul edilebilir günlük alım miktarı ve tolare edilebilir üst miktar belirtilmemiştir. Ancak kullanım dozu 3 g/gün diye tavsiye edilmektedir.

Diyette alınan L-karnitin miktarının artması ile bu maddenin biyoyararlanımının düşmesi, L-karnitin'in bütün hayvan türleri için iyi tolare edilebilir olmasının nedenidir. Yapılan çalışmalarda 8000 mg L-karnitin /kg kullanımının hiçbir yan etkiye neden olmadığı belirtilmiştir. Ayrıca günde 2-3 kez olmak üzere, 10-60 g'lık dozlarda verilen L-karnitin atlarda hiçbir yan etkiye yol açmamıştır. Ancak bazı durumlarda mide bulantısı, kusma ve diyare gibi sonuçlara yol açtığı da belirtilmektedir. Alzaymır hastalığına ve böbrek rahatsızlığına sahip olan hastalar için doktor kontrolünde kullanılması tavsiye edilmektedir (38).

1.2.2.8 L-karnitin Miktarının Belirlenmesi İçin Analitik Metotlar

L-karnitin miktarının belirlenmesine yönelik prensip olarak birbirinden farklı analitik metotlar kullanılmaktadır. Klinik laboratuvarlarda serbest L-karnitini ve esterlerini belirlemek için spektrofotometrik yöntemler ve radyoenzimatik testler kullanılmaktadır (39).

1.2.2.8.1 Enzimatik Assay

Üre, plazma ve doku örneklerinde kantitatif olarak karnitin analizi bu prosedüre göre yapılır. Bu metot karnitin açıltransferaz enziminin kataliz etkisine dayanır. Birinci basamaktaki enzimatik reaksiyon bir denge tepkimesidir. Bu nedenle sülfhidril tutucu reaktanlar ilave edilir ki oluşan açıl karnitin kararlı olarak ortamda bulunabilsin. İkinci basamakta DTNB (3,3'-ditiyobis(6-nitrobenzoik asit)) kullanılır bunun sebebi kromofor bir grup olan TNB (3-tiyo-6-nitrobenzoik asit) elde etmektir (39).

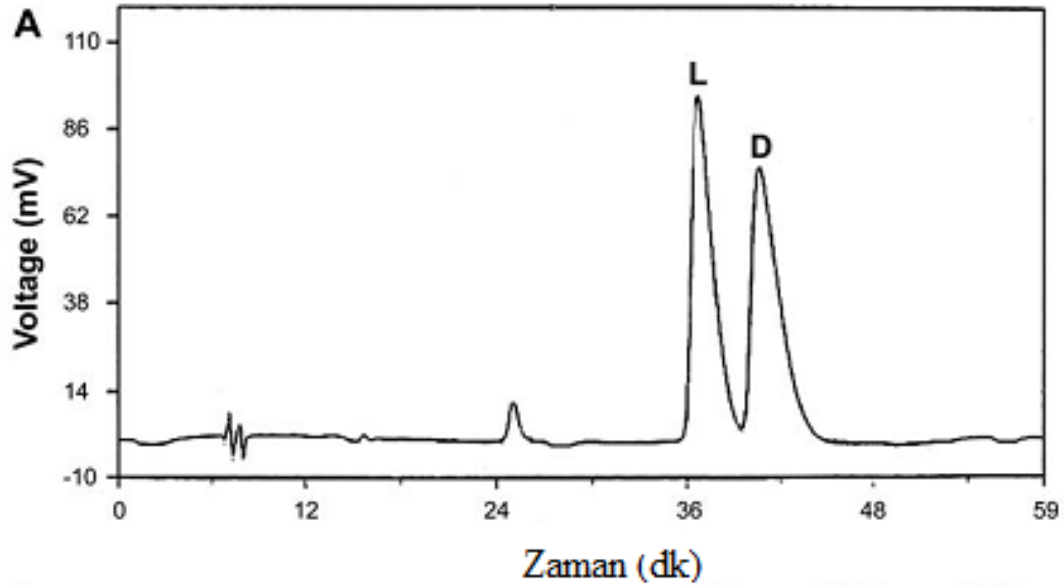
1.2.2.8.2 Kromatografik Metotlar

Kromatografik ayırma ve tayin için L-karnitin ve eserlerinin polaritelerini azaltmak amacıyla için türevlendirilmeleri gerekmektedir.

GC analizi için L-karnitin'in termostabil ve uçucu türevlerini elde etmek oldukça zaman alan bir işlemdir. Buna karşın hassas ve seçici bir tayin metodu olan,

kimyasal iyonlaştırma yöntemi ve kütle spektrometresi bu durumu telafi etmektedir (39).

HPLC serbest ve toplam L-karnitin tayini için uygundur. Ancak kolon öncesi kimyasal türevlendirme gereklidir. Bu yöntemde L-karnitin UV aktif olan 4-bromofenaçil ester türevine dönüştürülür. 254 nm ve 260 nm dalga boylarında yapılan tayinde ters faz kolon kullanılır. Tayin limiti ise 1 µmol/L civarındadır. (12). Qi ve ark.'nın yaptığı çalışmada ise kiral kolon kullanılarak karnitin rasematı (DL-karnitin) ayrılmış ve tayin edilmiştir. Mobil faz olarak 74:26 (v/v) 0.5 mol L⁻¹ sodyum perklorat : asetonitril karışımının kullanıldığı bu çalışmada DL-karnitin, (alfa-bromo) metil fenil keton ile UV aktif bir türeve dönüştürülmüş ardından 235 nm'de analizlenmiştir. Şekil 17' de bu analize ilişkin kromatogram gösterilmiştir (40).



Şekil 17 : L-karnitin (L) ve D-karnitin (D) için 235 nm'de alınan HPLC kromatogramı (40).

1.2.3 Aspir (*Carthamus tinctorius* L.)

Compositae (Asteraceae) familyasından tek yıllık bir bitki olan aspir (*Carthamus tinctorius* L.), 80-100 cm boyunda, dikenli ve dikensiz formları olan, kuraklığa dayanıklı, yazlık karakterde, 110-140 gün arasında yetişebilen tek yıllık bir yağ bitkisidir (41)(42). Tohumlarında % 30-50 arasında yağ bulunan bu bitkinin, bir omega-6 yağ asidi olan linoleik asit yönünden zengin ve bir omega-9 yağ asidi olan oleik asit yönünden zengin olmak üzere 2 ayrı tipi vardır (42). Bu bitki aynı zamanda yalancı safran, amerikan safranı ve boyacı safranı olarak da bilinir. Yabani türlerinin birkaçı ülkemizde de görülebilen (örneğin, *Carthamus lanatus* ve *Carthamus dentatus*) aspirin dünyada 25 adet yabani türü bulunmaktadır (43).



Şekil 18 : Compositae (Asteraceae) familyasından tek yıllık bir bitki olan aspir (*Carthamus tinctorius* L.)

İlk zamanlardan beri Çin, Japonya, Hindistan, Mısır ve İran'da üretilen aspirin orta çağ döneminde İtalya, Fransa ve İspanya'da tarımı yapılmıştır. ABD'ye girişi ise 20. yüzyılın ilk çeyreğinde gerçekleşmiştir (43). Ancak günümüzde aspir üretiminde ilk iki sırayı Hindistan ve ABD almaktadır (44).

Aspir diğeri yağlı tohumlu bitkilere göre kurağ, soğuk ve tuzluluğaya dayanıklı olması nedeniyle, bitkisel yağ, hayvansal yem biyodizel üretiminde oldukça önemlidir (41).

Türkiye'de genel olarak sitogenetik üzerinde pek çok çalışma olmakla beraber, Aspir (*Carthamus tinctorius* L.) bitkisi ile ilgili detaylı bir sitolojik çalışma yapılmamıştır (45).

Çin'de bitkisel çay olarak da tüketilen aspir bitkisi, pek çok hastalığın tedavisinde kullanıldığı için sadece çiçekleri için yetiştirilmekteydi. Çiçeklerinde amino asitler, mineral maddeler ve bazı vitaminlerin (B1, B2, B12, C ve E) bulunması bu bitkinin çay olarak tüketilmesinin ne kadar isabetli olduğunu göstermektedir.

Yapılan klinik çalışmalar sonucu, bu bitkinin damarlardaki kan akışını arttırarak dokuların daha fazla oksijen almasını sağladığı ve yüksek tansiyonu düşürdüğü gözlemlenmiştir.

Sanayide kullanılan sentetik anilin boyaların sağlık açısından yan etkileri göz önünde bulundurulduğunda, aspir çiçeklerinden elde edilen ve tamamen doğal olan, sağlık açısından hiçbir risk taşımayan boya maddelerinin özellikle her gün tükettiğimiz gıdalarda ve tekstil sanayinde kullanımına önem vermek ve bu tip kullanımları teşvik etmek gerekir (43).

1.2.3.1 Aspir Yağı

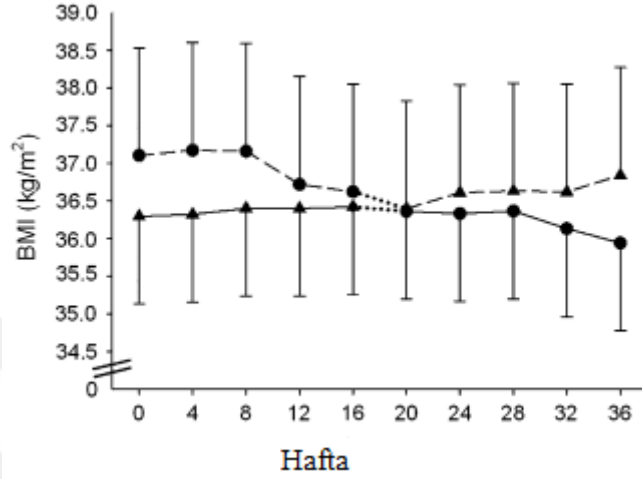
Aspir tohumu yaklaşık % 46-47 oranında yağ içerir. Bu yağın en bariz özelliği, doymuş yağ asitleri oranının düşük, doymamış yağ asitleri oranının yüksek olmasıdır.

ABD, Avrupa ve bazı Asya ülkelerinde yemeklik olarak tüketilen bu yağın içerdiği linoleik asit (%70-80) kalp-damar fonksiyonlarını düzenleyici, trigliserit, kolesterol ve insülin düzeylerini ayarlayıcı etkisi vardır. Araştırmalar sonucunda aspir yağının soya, ayçiçeği ve mısır yağından daha kaliteli olduğunu ve üstün yemeklik yağlar sıralamasında ön sıralarda yer aldığını göstermektedir.

Aspir yağı ülkemizde en yaygın Güneydoğu Anadolu Bölgesinde kullanılmaktadır. Bu bölgede 'boyacı aspiri', 'kır safranı' ve 'zaferan' olarak bilinmektedir (46).

Norris ve ark.'larının postmenopozal, obez ve tip 2 diyabetli kadınlarda yaptığı çalışmada aspir yağı ve KLA'nın vücut kompozisyonu üzerine etkisi araştırılmıştır. 36 hafta süren bu çalışmada, 55 gönüllüye aspir yağı veya KLA (8 g/gün) ilk 16 haftadan sonra 4 haftalık ara olacak şekilde verilmiştir. 35 gönüllünün

tamamlayabildiği bu çalışma sonucunda, KLA verilen gönüllülerin vücut kitle indeksi (VKİ) ve toplam yağ kütlesi azalmıştır. Ancak aspir yağı verilen gönüllülerde böyle bir etki görülmemekle beraber açlık şekeri düşmüştür (47).



Şekil 19 : KLA (○) ve aspir yağı (△) suplemantasyonunun VKİ (BMI) üzerine etkisi (47).

1.2.3.2 Aspir Yağının Kalite ve Safılık Kriterleri

Türk Gıda Kodeksi Bitki Adıyla Anılan Yemeklik Yağlar Tebliği'ne (Tebliğ No:2012/29) göre aspir yağı, aspir bitkisinin (*Carthamus tinctorius* L.) tohumlarından elde edilen yağı belirtmektedir. Söz konusu tebliğe göre aspir yağı için önemli bir saflık kriteri olan, gaz kromatografisi ile tespit edilen yağ asitleri kompozisyonuna ilişkin değerler Tablo 3'de verilmiştir (48).

Yağ Asitleri	%
Kaproik Asit (C6:0)	TED
Kaprilik Asit (C8:0)	TED
Kaprik Asit (C10:0)	TED
Laurik Asit (C12:0)	TED
Miristik Asit (C14:0)	TED-0.2
Palmitik Asit (C16:0)	5.3-8.0
Palmitoleik Asit (C16:1)	TED-0.2
Margarik Asit (C17:0)	TED-0.1
Heptadesanoik Asit (C17:1)	TED-0.1
Sterik Asit (C18:0)	1.9-2.9
Oleik Asit (C18:1)	8.4-21.3
Linoleik Asit (C18:2)	67.3-83.2
Linolenik Asit (C18:3)	TED-0.1
Araşidik Asit (C20:0)	0.2-0.4
Eikosenoik (Gadoleik) Asit (C20:1)	0.1-0.3
Eikosadienoik Asit (C20:2)	TED
Behenik Asit (C22:0)	TED-1.0
Dokosenoik Asit (Erusik) (C22:1)	TED-1.8
Dokosadienoik Asit (C22:2)	TED
Lignoserik Asit (C24:0)	TED-0.2
Nervonik Asit (C24:1)	TED-0.2

Tablo 3 : Türk Gıda Kodeksi Bitki Adıyla Anılan Yemeklik Yağlar Tebliği'ne (Tebliğ No:2012/29) göre aspir yağı için gaz kromatografisi ile tespit edilen yağ asitleri kompozisyonuna ilişkin değerler. (TED : Tespit Edilemeyen Düzey ($\leq$ % 0.05))

Aspir yağının saflığının belirlenmesinde en az yağ asitleri kompozisyonu kadar önem arz eden diğer bir kriter ise sterol kompozisyonudur. Tablo 4'de bu kritere ilişkin değerler verilmiştir.

Sterol Kompozisyonu	%
Kolesterol	TED-0.7
Brassikasterol	TED-0.4
Kampesterol	9.2-13.3
Stigmasterol	4.5-9.6
Beta-sitosterol	40.2-50.6
Delta-5-Avenasterol	0.8-4.8
Delta-7-Stigmasterol	13.7-24.6
Delta-7-Avenosterol	2.2-6.3
Toplam Sterol (mg/kg)	2100-4600

Tablo 4 : Türk Gıda Kodeksi Bitki Adıyla Anılan Yemeklik Yağlar Tebliği'ne (Tebliğ No:2012/29) göre aspir yağı için sterol kompozisyonuna ilişkin değerler. (TED : Tespit Edilemeyen Düzey ($\leq$ % 0.05))

Ayrıca aspir yağının bu tebliğ kapsamındaki fiziksel ve kimyasal özellikleri için değer aralıkları aşağıdaki gibidir.

Bağıl Yoğunluk (X °C / Su 20 °C)	0.922-0.927 (X= 20)
Sabunlaşma Sayısı (mg KOH/g yağ)	186-198
İyot Değeri (Wijs)	136-148
Sabunlaşmayan Madde (g/kg)	$\leq$ 15
Kırılma İndisi (40 °C'de)	1.467-1.470

Tablo 5 : Türk Gıda Kodeksi Bitki Adıyla Anılan Yemeklik Yağlar Tebliği'ne (Tebliğ No:2012/29) göre aspir yağının fiziksel ve kimyasal özelliklerine ilişkin değerler.

Aspir yağındaki tokoferol ve tokotrienol miktarlarına ilişkin Codex Alimentarius'tan alınan değerler Tablo 6'da gösterilmiştir. Bu değerler kalite kriteri olarak değerlendirilebilir (49).

Tokoferol ve Tokotrienol	mg/kg
Alfa-tokoferol	234-660
Beta-tokoferol	TED-17
Gamma-tokoferol	TED-12
Delta-tokoferol	TED
Alfa-tokotrienol	TED
Gamma-tokotrienol	TED-12
Delta-tokotrienol	TED
Toplam	240-670

Tablo 6 : Codex Alimentarius'a göre aspir yağındaki tokoferol ve tokotrienol miktarlarına ilişkin değerler. (TED : Tespit Edilemeyen Düzey ($\leq$ % 0.05))

1.2.4 Süspansiyonlar

Dış fazı (devamlı faz, sürekli faz) sıvı veya yarı-katı, iç fazı (dağılan faz) ise dışarda çözünmeyen katı partiküllerden meydana gelen süspansiyonlar, katı ilaç partiküllerinin sıvı faz içinde dağılması ile oluşur. Süspansiyonlar kullanıma hazır sıvı halde veya kullanılacakları zaman sulandırılan kuru süspansiyon (rekonstitüye-yeniden oluşturulan süspansiyon) şeklinde bulunurlar (50).

1.2.4.1 Süspansiyonların Avantaj ve Dezavantajları

Süspansiyon ilaç şekillerinin avantajları aşağıdaki gibi sıralanmıştır (50).

- ✓ Çözelti içinde stabilite sorunu olan kimyasalların kararlılıkları arttırılabilir.
- ✓ Etkin maddenin kendisi ya da türevi kullanılarak tadı maskelenebilir.
- ✓ Yutma kolaylığı sağlar.
- ✓ Dağıtılmış (disperse edilmiş) etkin maddenin yüzey alanının artmasına bağlı olarak, katı ilaç şekillerine göre mideden emilimi daha hızlıdır.

- ✓ Çözünürlük açısından zorluk yaşanan toz maddeler uygun miktarda sıvı ilaç şekli halinde verilir.
- ✓ Çözünmeyen maddeler süspansiyon şeklinde formüle edilerek parenteral yolla verilebilir.

Süspansiyon ilaç şekillerinin dezavantajları aşağıdaki gibi sıralanmıştır.

- ✓ Doz homojenliği ve doğruluğu katı ilaç şekillerine göre daha azdır.
- ✓ Partiküllerin çökmesi ve topaklanması sorun yaratır.
- ✓ Görünüş ve tat olarak uygun ve etkili bir süspansiyon hazırlanması katı ilaç şekillerine göre daha güçtür.

1.2.4.2 Süspansiyonların Sınıflandırılması

Farmasötik açıdan süspansiyonlar aşağıdaki şekilde sınıflandırılabilir (50):

1.2.4.2.1 Oral Süspansiyonlar

Genel olarak çözücü ortamı su olan oral süspansiyonların katı madde içeriği değişkenlik gösterir. Örneğin antibiyotik süspansiyonları % 2.5-5 oranında katı madde içerirken, antasit ve radyopak olarak kullanılan süspansiyonlarda ise, yüksek derişimde katı madde bulunur.

1.2.4.2.2 Rekonstitüye (Yeniden Oluşturulan) Süspansiyonlar

Stabilite sorunu yaşanan etkin maddelerin için kullanılacakları zaman sulandırılan rekonstitüye süspansiyonları hazırlanır. Ancak sulandırıldıktan sonra kullanıma hazır olan preperatın raf ömrü çok kısadır. Örneğin kuru haldeki raf ömrü İki yıl olan amoksisilin süspansiyonunun sulandırıldıktan sonra, yani süspansiyon hazırlandığında raf ömrü 15 gündür. Bu tür süspansiyonlarda, süspansiyonun hasta tarafından sulandırılıp çalkalanması sorucu hemen dağılması çok önemlidir.

1.2.4.2.3 Topik Süspansiyonlar

Dermatolojik, kozmetik veya koruyucu amaçla kullanılan ve katı madde oranı % 20'den fazla olan bu süspansiyonların, viral ve mantar enfeksiyonlarının tedavisinde önemli bir yeri vardır. Ayrıca bu süspansiyonlar lokal anestetik amaçlı da kullanılmaktadır.

1.2.4.2.4 Parenteral Süspansiyonlar

% 0.5-5 oranında katı partikül içeren bu sınıf içinde yer alan penisilin grubu süspansiyonlarda bu oran % 20'nin üzerindedir. IM (kas içi), subkütan (derialtı), intralezyonal (lezyon içi) ve intraartiküler (kıkırdak içi) olarak uygulanabilirler. Ancak süspansiyon şeklindeki preparatların kesinlikle IV (damar içi) veya intratekal (omurlilik içi) olarak uygulanamayacağını belirtmekte yarar vardır. Dış faz olarak serum fizyolojik veya parenteral olarak kullanılabilen bitkisel yağlar kullanılır. Parenteral süspansiyonlarda kullanılan yardımcı maddeler güvenli olmalı, toksik olmamalı, pirojenik, antijenik, iritan ve hemolitik etki göstermemelidir.

1.2.4.2.5 Oftalmik Süspansiyonlar

Süspansiyonun partikül büyüklüğü, dağılımı, partiküllerin çözünme hızı ve kullanılan yardımcı maddeler önemli olmakla beraber en önemli özellik sterilitedir. Çok dozlu olarak hazırlanırlar ve mutlaka antimikrobiyal bir ajan ilavesiyle mikrobiyolojik üreme önlenmiş olmalıdır.

1.2.4.2.6 Aerosol Süspansiyonlar

Bu türlerin avantajı çabuk etki göstermesi ve ilk geçiş etkisinin aşılmasıdır. Sıvılaştırılmış itici bir gaz ile süspansiyon haline getirilerek hazırlanırlar. Örnek olarak epinefrin bitartarat, steroidler ve bronkodilatörler (salbutamol, fenilefrin, disodyum kromoglikat) verilebilir.

1.2.4.3 Süspansiyonlarda Beklenen Özellikler

Uygun özellikte bir süspansiyon aşağıdaki özellikleri taşımalıdır (50) :

- ✓ Katı partiküller küçük ve homojen şekilli olmalı ve hızlı çökmemelidir.
- ✓ Süspansiyonunu çöktükten sonra homojen hale gelebilmesi için çöken partiküller katı bir kek oluşturmamalı, ve çökelti, şişe çalkalandığında kolayca yeniden dağılabilmelidir.
- ✓ Süspansiyonun viskozitesi, yeniden dağılma, şişeden akma ve parenteral yolla kullanılanlarda enjektör iğnesinden geçme gibi özellikleri engellemeyecek değerde olmalıdır. Haricen kullanılanlarda ise, deriye uygulanabilecek, ancak kolayca uzaklaşmayacak akıcılıkta olmalıdır.
- ✓ Raf ömrü boyunca kimyasal ve fiziksel olarak stabil olmalıdır.

- ✓ Herhangi bir mikrobiyolojik üreme olmamalıdır.
- ✓ Kolay bulunan maddeler ile bilinen araç ve yöntemler kullanılarak kolayca hazırlanabilmeli; güzel koku ve renge sahip olmalıdır

Terapötik etki	Etkin Madde	Derişim (mg/mL)
Antifungal	Ketokonazol	20
Anksiyolitik	Diazepam	0.5
Antasit	Aluminyum hidroksit	70
	Magnezyum hidroksit	200
Adsorban-gaz giderici	Simetikon	8
Antispazmodik	Trimebutin maleat	4.8
	Pipenzolat bromür	0.8
Antianemik	Foiikasit	10
	Demir gluseptat (giukoheptonat)	30
Antibakteriyel	Nalidiksikasİt	125
	Amoksisilin	25-50
	Ampisilin	25-50
	Sefaleksın	50
	Nitrofurantoin	10
	Streptomisin sülfat	15
Antitüssif	Kodein	6
Anti-İnflamatuvar	Ibuprofen	20
Antiviral	Asiklovir	40-80
İmmünolojik stimulan	Palmidrol	100
Antihistaminik	Mebhidrolin	10
Antiprotozoal	Metronidazol	25
Antidiyareik	Nifuroksazıt	40
Analjezik	Parasetamol (asetaminofen)	25-50

Tablo 7 : Farmasötik süspansiyonların tedavideki uygulamaları (50).

1.2.4.4 Süspansiyon Formülasyonları

Fiziksel ve kimyasal olarak dayanıklı bir süspansiyon formülasyonu pek çok bileşenden oluşur (50).

1.2.4.4.1 Etkin Madde

Partikül büyüklüğü 1-50 µm arasında olan kaba süspansiyonlarda genel olarak partikül büyüklüğünü küçültmek amacıyla öğütme, püskürterek kurutma, mikropulverizasyon ve sıvı-enerji değirmenleri ve kontrollü kristalizasyon yöntemlerinden biri kullanılabilir. Etkin maddenin partikül büyüklüğünün yanısıra, polimorfik özellikleri de önem taşır.

1.2.4.4.2 Dispersiyon Ortamı

Süspansiyonlarda dispersiyon ortamı olarak genellikle su kullanılır. Kullanım amacına göre suyun yanısıra alkoller, glikoller, polioller veya bitkisel yağlar kullanılabilir.

1.2.4.4.3 Islatma Ajanları

Hidrofobik ilaçların dispersiyon ortamında kolayca dağılmasına yardım etmek amacıyla kullanılırlar. Non-iyonik veya anyonik yüzey etkin maddeler, hidrofilik polimerler ve bazı killer bu amaçla kullanılır. Örnek olarak : sodyum lauril sülfat, sodyum doküsat, polisorbata 20, 40, 60, 65, 80, sorbitan monoaurat, oktoksinol-9, nonoksinol-10, Poloxamer 188, Poloxamer 235, sodyum karboksimetil selüloz {Na CMC}, bentonit, alüminyum magnezyum silikat (Veegum) verilebilir.

1.2.4.4.4 Süspansiyon Ajanları

Kullanım oranları süspansiyon ajanının türüne bağlı olarak % 0.1-10 arasında değişen süspansiyon ajanları viskoziteyi artırmak ve çökmeyi yavaşlatmak amacıyla kullanılırlar. İdeal bir süspansiyon ajanının özellikleri aşağıda verilmiştir :

a) Yapılı (kıvamlı) taşıyıcılar (vehicle, sıvı) oluşturabilmeli, yani süspansiyonun raf ömrü boyunca floküle veya defloküle haldeki partikülleri süspand (asılı) halde tutabilmelidir. Akış özellikleri plastik, psodoplastik veya tiksotropik olmalıdır.

b) Partikülleri süspande edebilecek kadar yüksek viskozitede olmalı, ama süspansiyonun akıcılığını ve çalkalanmasını etkilemeyecek kadar da düşük viskozitede olmalıdır. Selüloz türevleri, killer, doğal zamlar ve çeşitli değişik ajanlar bu amaçla kullanılabilir. Süspansiyonlarda sıklıkla kullanılmakta olan süspansiyon ajanlarının bazı özellikleri Tablo 8'de özetlenmiştir.

Süspansiyon Ajanı	Viskozite (cps)	pH	İyonik Yük	Derişim (%)
Sodyum karboksimetilselüloz	<6000	3-11,5	Anyonik	1-2
Etilmetilselüloz	<60	7	Non-iyonik	2.5
Hidroksipropil metilselüloz	<5250	6,-8	Non-iyonik	0.3-2
Metilselüloz	<8000	2,-12	Non-iyonik	1-5
Etilselüloz	<100	7	Non-iyonik	5
Hidroksietiliseiüloz	<4000	6,5-8,5	Non-iyonik	0.5-2
Hidroksipropilselüloz	<6500	5,-8,5	Non-iyonik	1-10
Arap zamkı (Acacia)	<10	4,-10	Anyonik	2
Agar	-	4,5-9	Anyonik	0.1-2
Karagen	<1000	4,-10	Anyonik	1-2
Guar zamkı	<12000	1-10,5	Non-iyonik	0.6-1.5
Pektin	<1000	2,-9	Anyonik	1-3
Sodyum aljinat	<10000	4-11,5	Anyonik	0.5-2.5
Kitre zamkı (tragakant)	<9700	2,5-9	Anyonik	0.2-4
Ksantan zamkı	<8000	2,-13	Anyonik	0.3-3
Povidon	<95	5,5-11	Non-iyonik	5-10
Glisirizin	<370	3,5-5,5	Anyonik	0.5-2
Jelatin	-	3,-8	Amfoterik	<1
Sodyum nişasta glikolat	-	5,5-7,5	Anyonik	1-2

Tablo 8 : Süspansiyonlarda sıklıkla kullanılmakta olan süspansiyon ajanlarının bazı özellikleri (50).

1.2.4.4.5 Flokülasyon ajanları

Kullanım oranları % 0.001-1 arasında değişen flokülasyon ajanları partiküllerin *gevşek agregatlar* (floklar, topaklar) halinde bağlanmasını sağlar. İyi bir süspansiyon formülasyonu hazırlayabilmek için önerilen en iyi yollardan biri, floküle olmuş partikülleri bir yapılı taşıyıcı içinde tutmaktır. Flokülasyon ajanı ile yapılı taşıyıcı arasında geçimsizlik görülmemesi önemlidir.

Pozitif yüklü partiküllerden bir dispersiyon hazırlanır ve bu KH_2PO_4 (potasyum dihidrojen fosfat) gibi anyonik bir elektrolit ile floküle edilmek istenirse, sistemin stabilitesini sağlamak için anyonik özellik gösteren bir hidrokolloit kullanabilir. Çünkü anyonik hidrokolloidler anyonik flokülasyon ajanları ile geçimlidirler. Ancak negatif yüklü partiküllerin bulunduğu bir süspansiyon, AlCl_3 gibi katyonik bir elektrolit ile floküle edilir ve buna anyonik hidrokolloit eklenirse geçimsizlik görülebilir. Aşağıda verilen farklı gruptaki maddeler flokülasyon ajanı olarak kullanılabilir.

Flokülasyon Ajanları	Sınıf	İyonik Yük
Sodyum lauril sülfat	Yüzey etkin madde	Anyonik
Benzaikonyum klorür	Yüzey etkin madde	Katyonik
Setilpiridinyum klorür	Yüzey etkin madde	Katyonik
Polisorbat 80	Yüzey etkin madde	Noniyonik
Sorbitan monolaurat	Yüzey etkin madde	Noniyonik
Sodyum karboksimetilselüloz	Hidrofilik polimer	Anyonik
Ksantan gum	Hidrofilik polimer	Anyonik
Polietilen glikol	Hidrofilik polimer	Noniyonik
Potasyum dihidrojen fosfat	Elektrolit	Anyonik
Aluminyum klorür	Elektrolit	Katyonik
Sodyum klorür	Elektrolit	Anyonik/Katyonik

Tablo 9 : Süspansiyonlarda sıklıkla kullanılmakta olan flokülasyon ajanları (50).

1.2.4.4.6 Renk vericiler

Süspansiyonun görünüşünü daha cazip hale getirmek amacıyla formülasyona ilave edilirler. Bu amaçla ilaç, kozmetik ve gıda endüstrisinde kullanılabilecek özellik taşıyan FD&C ve D&C kodlu boyalar, örneğin; D&C Red No. 33, FD&C Red No. 3, FD&C Red No. 40, D&C Yellow No.6 kullanılabilir.

1.2.4.4.7 Tampon ajanları

İdeal olarak süspansiyonlar geniş bir pH aralığında dayanıklı olmalıdır. Ancak bazı durumlarda fiziksel ve kimyasal stabilite açısından optimum bir pH değerinde olması gerekebilir. Sitrik asit, fumarik asit, sodyum sitrat ve amonyak çözeltisi gibi tampon maddeler bu amaçla kullanılabilirler.

1.2.4.4.8 Koruyucular

Süspansiyon formülasyonlarında yer alan yardımcı maddeler mikrobiyolojik üremeye karşı hassastır. Mikrobiyolojik üremeyi engellemek amacıyla, % 0.1-5 arasında kullanılan butil paraben, metil paraben ve propil paraben gibi parabenler, benzoatlar ve sorbatlar koruyucu ajan olarak kullanılmaktadır.

1.2.4.5 Süspansiyonların Stabilitesi

Son ambalajı için en az üç tekrar olacak şekilde fiziksel ve kimyasal analizler uygulanmalıdır (50).

1.2.4.5.1 Kimyasal Stabilité

Süspansiyondaki katı partiküller çözeltiliye geçen kısmi içerikten kimyasal olarak daha az bozunur. Çözünürlüğün sıcaklıkla değişmesi stabiliteyi etkiler.

Süspansiyon ajanlarının bozunmasına bağlı olarak viskozite değişiklikleri görülür. Viskozite yüksek sıcaklıklarda incelenerek süspansiyon ajanlarının bozunması değerlendirilebilir.

Koruyucu maddeler de kimyasal bozunmaya uğrayarak aktivitelerini kaybedebilirler. Beklenmeyen pH değişiklikleri koruyucu etkisini azaltabilir (50).

1.2.4.5.2 Fiziksel Stabilité

Süspansiyonların fiziksel stabilitesini incelemek amacıyla uygulanan testler pasif ve aktif testler olarak sınıflandırılabilir.

Süspansiyonların fiziksel stabilitesini incelemek için yapılan pasif fiziksel testler ; görünüş, renk, koku, tat, pH, özgül ağırlık (spesifik ağırlık), çökme hızı, çökme hacmi, flokülasyon derecesi, zeta potansiyel ölçümleri ve kristal büyüklüğü şeklinde sıralanabilir.

Süspansiyonların fiziksel stabilitesini incelemek için yapılan aktif fiziksel testler ise ; tekrar disperse olabilme, santrifüjleme, reolojik özelliklerin incelenmesi (viskozite) ve zorlanmış koşullarda yapılan testler (stres testleri vibrasyonla aşınma koşullarının taklidi) şeklinde sıralanabilir (50).

1.2.4.5.2.1 Zeta Potansiyel (Elektrokinetik)

Dispers sistemlerin stabilitesinde pratik uygulamaya sahip olan zeta potansiyel, çözeltinin elektrikçe nötral bölgesi ile yüzeye sıkıca bağlı tabakasının kayma yüzeyi arasındaki potansiyel farkıdır. "ζ" zeta ile gösterilir, birimi milivoltur.

Kullanılan sisteme dayalı olarak eğer zeta potansiyel belli bir değerin altına düşürülürse, çekim kuvvetleri, itme kuvvetlerinden üstün gelir ve partiküller bir araya gelir. Bu olay flokülasyon olarak bilinir.

Monodispers bir sistem elde etmek için partiküllerin birbirini yeterince itebilmesi gerekir ve bunun için de zeta potansiyel yeterli olmalıdır. Bu değer, her süspansiyon için özeldir.

Ölçülebilir bir değer olan zeta potansiyel süspansiyonun stabilitesi hakkında bir fikir verebilir. Ölçüm "Zetametre" adı verilen aletlerle yapılır (51).

1.2.4.5.2.2 Partikül Boyutu

Süspansiyonlarda partikül büyüklüğü ve dağılımı, çökme hızının hesaplanmasıyla ve Stokes denklemi yardımıyla saptanabilir. Herbir örnekteki madde miktarları, o örneklerin partikül büyüklüğüne karşı grafiğe geçirilerek partikül dağılımı bulunur. Yavaş oluşu ve fazlaca örnek gerektirmesi, yöntemin dezavantajını oluşturur. Ancak gelişen teknoloji ile beraber lazer difraksiyon tekniği ile partikül boyutu ölçümü daha güvenilir ve hızlı sonuçlar vermektedir. Disperse partikülden

geçen lazer ışınının kuvvetinin ölçümüyle elde edilen veri partikül boyutunun hesaplanmasında kullanılır (51).

1.2.4.5.2.3 Viskozite

Viskozite bir akışkanın, yüzey gerilimi altında deforme olmaya karşı gösterdiği direncin ölçüsüdür. Akışkanın akmaya karşı gösterdiği iç direnç olarak da tanımlanabilir. Süper akışkanlar hariç tüm gerçek akışkanlar yüzey gerilimine karşı direnç gösterirler. Öte yandan, yüzey gerilimine hiç direnç göstermeyen bir akışkan "ideal akışkan" olarak adlandırılır.

Uygun akış özelliği ve istenen stabiliteyi sağlamak için önemli bir parametre olan viskozite hem pratik uygulamada, hem teorik açıdan önemli bir özelliktir. Viskozitedeki değişimler, ürünlerdeki diğer değişimleri de gösterir ve etkiyi azaltır. Viskozite değişimi, tüketici tarafından kolayca izlenebildiği için ayrı bir önem taşır (51).

1.2.4.5.2.4 Sedimentasyon Hacmi

Süspansiyonun son çökelti hacminin " V_u ", süspansiyonun çökmeden önceki hacmine yani başlangıçtaki ilk hacmine " V_0 " oranıdır.

$$F = V_u/V_0$$

F : Sedimentasyon hacmi (çökme hacmi)

V_u : Süspansiyonun son çökelti hacmi

V_0 : Süspansiyonun çökmeden önceki ilk hacmi

Sedimentasyon hacminin değeri, 1'den küçük ($F < 1$), 1' den büyük ($F > 1$) veya 1'e eşit ($F = 1$) olabilir. Genel olarak F , 1'den küçüktür ve olağan bir durumdur. $F = 1$ olduğunda ise, floküle bir süspansiyonda son sedimentasyon hacmi başlangıçtaki hacmine eşit olacaktır. Böyle bir ürünün "flokülasyon dengesi" içinde olduğu söylenir. $F > 1$ olduğunda ise, final sedimentasyon hacmi, süspansiyonun ilk hacminden daha büyüktür. Oluşan floklar o kadar gevşek, tüysü ve kabarık ki, hacim artışı olur (51).

1.2.4.5.3 Mikrobiyolojik Testler

Günlük diyetle alınan besinlerde olduğu gibi besin takviyelerinin de sıhhi kalitesinin belirlenmesi için mikrobiyolojik testlere ihtiyaç vardır. Bu amaçla yaygın olarak kullanılan TEMPO® sisteminin aerobik mezofilik bakteri (toplam bakteri) sayımı, maya-küf sayımı ve *Escherichia coli* sayımı için sırasıyla TEMPO® TVC (Total Viable Count-Toplam Bakteri), TEMPO® YM (Yeast & Mold-Maya & Küf) ve TEMPO® EC (*Escherichia coli*) testleri mevcuttur.

Yapılan her test için o teste özel şişede besiyeri ve kart bulunmaktadır. Test edilecek besiyeri için inoküle edilen besiyeri homojen olarak üç farklı hacim içeren 48 kuyucuklu kartlara TEMPO® doldurucu tarafından aktarılır. Kart daha sonra ileriki işlemlerde herhangi bir kontaminasyonu engellemek için hava geçirmez bir şekilde kesilip mühürlenir. İnkubasyon sırasında, karttaki mikroorganizmalar besiyerindeki substratı azaltır ve TEMPO® okuyucusunda tespit edilen floresan bir sinyal gözükmesine sebep olur.

1.2.4.5.3.1 TEMPO® TVC Testi ile Aerobik Mezofilik Bakteri (Toplam Bakteri) Sayımı

Bu amaçla kullanılan TEMPO® TVC testi 40-48 saatte aerobik mezofilik floranın sayımı ürünün sıhhi kalitesini belirlemek ve tazelik ya da bozunma seviyesini göstermek için kullanılır. Toplam flora sayımı, işlenmiş ürünler için nakliye, üretim ve depolanma hakkında fikir edinmek amacıyla yapılmaktadır.

1.2.4.5.3.2 TEMPO® YM Testi ile Maya-Küf Sayımı

72-76 saatte sonuç veren TEMPO® YM testi gıda ürünlerinin kalitesini bozan küflerin ve mayaların sayımı için tasarlanmıştır. TEMPO® YM testi bu teste özel şişede besiyeri ve karttan oluşmaktadır.

1.2.4.5.3.3 TEMPO® EC Testi ile *Escherichia coli* Sayımı

22-27 saatte sonuç veren TEMPO® EC testi insanda ve hayvanda kommensal konakçı olan ve çok üremesi halinde gıda zehirlenmesine yol açan *E.coli*'nin sayımı için tasarlanmıştır. TEMPO® EC testi bu teste özel şişede besiyeri ve karttan oluşmaktadır.

BÖLÜM II

2 GEREÇ VE YÖNTEM

2.1 Kullanılan Gereçler

2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kimyasallar	Tedarikçi Firma
Potasyum hidroksit	Sigma-Aldrich,Almanya
Metanol (HPLC saflıkta)	Sigma-Aldrich,Almanya
n-Hekzan (HPLC saflıkta)	Sigma-Aldrich,Almanya
9c,11t-Konjuge Linoleik Asit ve 10t,12c-Konjuge Linoleik Asit (Analitik Standart, saflık $\geq 96.0\%$)	Sigma-Aldrich,Almanya
Sodyum Perklorat ($\geq 98.0\%$)	Sigma-Aldrich,Almanya
Perklorik Asit ($\geq 70.0\%$)	Sigma-Aldrich,Almanya
(alfa-Bromo) metilfenilketon ($\geq 98.0\%$)	Sigma-Aldrich,Almanya
Su (HPLC saflıkta)	Sigma-Aldrich,Almanya
Etanol ($\geq 98.0\%$)	Sigma-Aldrich,Almanya
Etil Asetat ($\geq 98.0\%$)	Sigma-Aldrich,Almanya
Asetonitril ($\geq 98.0\%$)	Sigma-Aldrich,Almanya
L-karnitin Inner Salt (Analitik Standart, saflık $\geq 96.0\%$)	Sigma-Aldrich,Almanya
TEMPO® TVC (Toplam Bakteri) besiyeri	bioMérieux, Fransa
TEMPO® YM (Maya & Küf) besiyeri	bioMérieux, Fransa
TEMPO® EC (Escherichia coli) besiyeri	bioMérieux, Fransa
Peptonlu su	bioMérieux, Fransa

Tablo 10 : Konjuge Linoleik Asit ve L-Karnitin Analizinde Kullanılan Kimyasallar ve Tedarikçileri

2.1.2 Kullanılan Ekipman ve Cihazlar

Ekipmanlar	Tedarikçi Firma
Terazi (± 0.001 g hassasiyet)	Sartorius, Almanya
Vorteks	Sartorius, Almanya
Santrifüj	Nüve, Türkiye
Etüv	Nüve, Türkiye
Vidalı, teflon kapaklı 10 mL' lik cam tüp	İsolab, Almanya
Filtre (0.45 μ m)	Merck, Almanya
10mL'lik kalibre balonjoje	İsolab, Almanya
100 μ L ve 1000 μ L'lik enjektör	Hamilton, İsviçre
GC-MS sistemi	Shimadzu, Japonya
Fused silica kapiler kolon (Rtx-CLPesticides 2 20m*0.18mm*0.14 μ m)	Restek, A.B.D.
Terazi (± 0.001 g hassasiyet)	Sartorius, Almanya
Vorteks	Sartorius, Almanya
Santrifüj	Nüve, Türkiye
Etüv Nüve, Türkiye	
Vidalı, teflon kapaklı 10 mL' lik cam tüp	İsolab, Almanya
Filtre (0.45 μ m)	Merck, Almanya
10mL'lik kalibre balonjoje	İsolab, Almanya
100 μ L ve 1000 μ L'lik enjektör	Hamilton, İsviçre
pH metre	Metler Toledo, Almanya
HPLC-UV Sistemi	Agilent, A.B.D.
C18 Kolon (150*4.6 mm)	ACE, İskoçya
Zetametre	Malvern, İngiltere
Partikül boyutu ölçüm cihazı	Malvern, İngiltere
Viskozimetre	Brookfield, A.B.D.
TEMPO® TVC (Toplam Bakteri) kartları	bioMérieux, Fransa
TEMPO® YM (Maya & Küf) kartları	bioMérieux, Fransa
TEMPO® EC (Escherichia coli) kartları	bioMérieux, Fransa
TEMPO® Torbaları	bioMérieux, Fransa
TEMPO® Okuyucu	bioMérieux, Fransa
TEMPO® Doldurucu	bioMérieux, Fransa
Stomacher	Seward, İngiltere
İnkübatör	Nüve, Türkiye
Otomatik Pipet (1.0 mL'lik)	Sartorius, Almanya

Tablo 11 : Konjuge Linoleik Asit ve L-Karnitin Analizinde Kullanılan Ekipmanlar ve Tedarikçileri

2.2 Kullanılan Yöntemler

Etkin madde olarak seçilen 9c,11t-Konjuge Linoleik Asit ve 10t,12c-Konjuge Linoleik Asit'in GC-MS sisteminde ve ayrıca etkin madde olarak seçilen L-karnitin'in HPLC-UV sisteminde miktar tayinleri yapıldı.

2.2.1 Konjuge Linoleik Asit Analizi

2.2.1.1 Ana Stok ve Standart Çözeltilerinin Hazırlanması

Ana Stok Çözeltisi (A.S.Ç.) (500 µg/mL): 9c,11t-Konjuge Linoleik Asit ve 10t,12c-Konjuge Linoleik Asit standartlarından ayrı ayrı 500'er µg tartılıp 10 mL'lik bir balonjojeye aktarıldı. Balonjoje n-hekzan ile 10 mL'lik hacmine tamamlandı. Diğer standart çözeltiler aşağıdaki tablo 12'de belirtilen oranlar kullanılarak hazırlandı.

Standart No	Seyreltme	9c,11t-KLA (µg/mL)	10t,12c-KLA (µg/mL)
1	500µL (A.S.Ç.) + 500 µL Hekzan	250	250
2	400µL Standart 1 + 600 µL Hekzan	100	100
3	500µL Standart 2 + 500 µL Hekzan	50	50
4	500µL Standart 3 + 500 µL Hekzan	25	25
5	400µL Standart 4 + 600 µL Hekzan	10	10

Tablo 12 : 9c,11t-Konjuge Linoleik Asit ve 10t,12c-Konjuge Linoleik Asit standart çözelti hazırlama tablosu

2.2.1.2 GC-MS Analizi İçin Kromatografik Cihaz Şartları

9c,11t ve 10t,12c-Konjuge Linoleik Asidin miktar tayini için ayarlanması gereken cihaz şartları tablo 13’de verilmiştir.

Cihaz	GC-MS Sistemi (QP-2010 Plus)
Kolon	Fused silica kapiler kolon (Rtx-CLPesticides2-20m*0.18mm*0.14µm)
Isı programı	120 °C başlat, dakikada 20 °C’lik artış ile 200 °C’ye çık, 15 °C’lik artış ile 230 °C’ye çık, 30 °C’lik artış ile 300 °C’ye çık 4 dk bekle.
Split oranı	5:1
Akış	1.10 mL/dk
Dedektör sıcaklığı	250 °C
Enjeksiyon hacmi	2 µL
İnlet sıcaklığı	250 °C
İyon kaynağı sıcaklığı	220 °C

Tablo 13 : Konjuge Linoleik Asit Analizi İçin Cihaz Parametreleri



Şekil 20 : GC-MS Sistemi (Shimadzu QP-2010 Plus)

2.2.1.3 Konjuge Linoleik Asidin Miktar Tayini için Analitik Metot Validasyonu

Konjuge Linoleik Asidin miktar tayini yöntemini valide etmek için aşağıdaki parametreler kullanıldı,

- ✓ Doğrusallık / Linearity
- ✓ Enjeksiyon Tekrarlanabilirliği / Repeatability
- ✓ Ekstraksiyon Tekrarlanabilirliği ve Geri Kazanım / Recovery
- ✓ Seçicilik / Specificity
- ✓ Seçimlilik / Selectivity
- ✓ Belirtme ve Tayin Sınırları / LOD-LOQ
- ✓ Yöntem Dayanıklılığı / Method Stability

kriterleri incelenerek elde edilen sonuçlar değerlendirildi.

Konjuge Linoleik Asit miktarının belirlenmesine yönelik olan metot, 9c,11t-Konjuge Linoleik Asit ve 10t,12c-Konjuge Linoleik Asit etkin maddeleri için tablo 13’de belirtilen koşullarda, 10.0 µg/mL – 250.0 µg/mL derişim aralığında valide edildi. Validasyonun her parametresi için m/z oranı 81 olan iyon göz önüne alınarak validasyon yapıldı. m/z oranı 95 ve 294 olan iyonlar ise kontrol iyonu olarak alındı.

2.2.1.3.1 Doğrusallık

Doğrusallık kriteri, 10-25-50-100 ve 250 µg/mL olmak üzere, tablo 12’ye göre hazırlanan 5 ayrı derişim seviyesinde 9c,11t ve 10t,12c-Konjuge Linoleik Asit’in standart test çözeltileri ile yapıldı. Her bir derişim basamağından ard arda 3’er enjeksiyon yapılarak elde edilen ortalama standart alan değerleri üzerinden doğrusallık hesaplandı.

2.2.1.3.2 Enjeksiyon Tekrarlanabilirliği

Kesinlik kriterinin bir kavramı olan çalışma şartlarında tekrarlanan analizlerde elde edilen sonuçların birbiriyle uyumunu ve kullanılan cihazın tekrarlanabilirliğini test etmek amacıyla, 100 µg/mL derişimindeki 9c,11t ve 10t-12c Konjuge Linoleik Asit standardı ardı ardına 5 paralel enjeksiyon yapılarak sonuçların istatistiksel değerlendirmesi yapıldı.

2.2.1.3.3 Ekstraksiyon Tekrarlanabilirliği ve Geri Kazanım

Elde edilen deneysel değerlerin gerçek değere ne kadar yakın olduğunu tespit amacıyla düşük, orta ve yüksek derişimlerde hazırlanan test çözeltileri analiz edildi. 9c,11t ve 10t-12c Konjuge Linoleik Asit için sırasıyla 25-50 ve 100 µg/g olmak üzere her bir derişim seviyesi için 3 paralel numune çalışılmış elde edilen sonuçlar ortalama geri kazanım ve % RSD cinsinden hesaplandı.

2.2.1.3.4 Seçicilik

50 µg/mL 9c,11t ve 10t,12c-Konjuge Linoleik Asit standartları ile n-hekzan cihaza aynı şartlar altında ve aynı metotla verildi ve etken madde ile aynı alıkonma zamanı ve aynı m/z oranında girişim olup olmadığına bakıldı.

2.2.1.3.5 Seçimlilik

Elde edilen kromatograma ilişkin resolüsyon ve teorik plaka sayısının hesaplanabilmesi için 50 µg/mL 9c,11t-Konjuge Linoleik Asit ve 10t,12c-Konjuge Linoleik Asit standartlarının enjeksiyonu yapıldı. Söz konusu olan resolüsyon ve teorik plaka sayısı değerleri Eşitlik 1 ve Eşitlik 2'ye göre hesaplandı.

$$Rs = \frac{2.5 * (t_{R_2} - t_{R_1})}{W_1 + W_2}$$

Rs : Resolüsyon değeri

t_{R_1} : Birinci pikin alıkonma zamanı

t_{R_2} : İkinci pikin alıkonma zamanı

W_1 : Birinci pikin genişliği

W_2 : İkinci pikin genişliği

Eşitlik 1 : Resolüsyon değerinin bulunmasına ilişkin eşitlik

$$N = 25 \cdot \left(\frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2$$

N : Teorik plaka sayısı

$W_{1/2}$: Pik yarı yüksekliğindeki genişlik

Eşitlik 2 : Teorik plaka sayısının bulunmasına ilişkin eşitlik

2.2.1.3.6 Belirtme ve Tayin Sınırları / (LOD-LOQ)

25 µg/mL derişimindeki 9c,11t-Konjuge Linoleik Asit ve 10t,12c-Konjuge Linoleik Asit standartları üzerinden belirtme ve tayin sınırları belirlendi. Söz konusu LOD ve LOQ değerleri Eşitlik 3 ve Eşitlik 4'e göre hesaplandı.

$$LOD = \frac{Std_c * 3 * B_h}{Std_h}$$

LOD : Belirtme Sınırı

Std_c : En düşük derişimdeki standardın derişimi

B_h : Kör sinyal gürültü yüksekliği

Std_h : En düşük derişimdeki standardın sinyal yüksekliği

Eşitlik 3 : Belirtme sınırının belirlenmesi için kullanılan eşitlik

$$LOQ = \frac{Std_c * 10 * B_h}{Std_h}$$

LOQ : Tayin Sınırı

Std_c : En düşük derişimdeki standardın derişimi

B_h : Kör sinyal gürültü yüksekliği

Std_h : En düşük derişimdeki standardın sinyal yüksekliği

Eşitlik 4 : Tayin sınırının belirlenmesi için kullanılan eşitlik

2.2.1.3.7 Yöntem Dayanıklılığı

Başlangıçta (0.saat) ve buzdolabında +4 °C’de 24 saat bekletildikten sonra (24.saat), sisteme 50 µg/mL derişimindeki 10t,12c ve 9c,11t - Konjuge Linoleik Asit standartları ve 50 µg/g derişiminde 10t,12c ve 9c,11t - Konjuge Linoleik Asit içeren numune enjeksiyonları yapıldı. Elde edilen sonuçlar üzerinden % kayıp hesaplandı.

2.2.1.4 Konjuge Linoleik Asit Analizi

10 mL lik bir balonjojeye 10.0 mg (± 0,01 mg) hazırlanan formülasyon tartıldı. Hekzan ile 10 mL ye tamamlanıp vortekslendi. 1.0 mL numune çözeltisi bir tüpe aktarıldı ve üzerine 1.5 mL hekzan eklendi.

Vortekste 1 dk çalkalandıktan sonra metanol içinde hazırlanmış 2 N KOH çözeltisinden 200 µL konuldu. 5dk vortekste çalkalandı ve 10 dk 50 °C’lik etüvde bekletildi. Ardından 5 dk daha vortekste çalkalandı ve 3000 rpm’de 5 dk santrifüj edildi. Üst faz 0.45µm’lik filtreden geçirilip viallenten sonra tablo 13’de belirtilen kromatografik şartlarda GC-MS cihazına enjekte edildi.

2.2.1.5 Konjuge Linoleik Asidin Çalışma Sonuçlarının Değerlendirilmesi

GC-MS analizi için 50 µg/mL’lik 9c,11t- Konjuge Linoleik Asit ve 50 µg/mL’lik 10t,12c- Konjuge Linoleik Asit standardı GC-MS sistemine enjekte edilerek geliş zamanları 9c,11t- Konjuge Linoleik Asit standardının geliş zamanının, 10t,12c- Konjuge Linoleik Asit standardının geliş zamanına oranına göre belirlendi.

Formülasyondaki 9c,11t- Konjuge Linoleik Asit ve 10t,12c- Konjuge Linoleik Asit Miktarlarının Hesaplaması : Formülasyondaki 9c,11t- Konjuge Linoleik Asit ve 10t,12c- Konjuge Linoleik Asit miktarı µg/mL cinsinden çizilen kalibrasyon eğrisine göre hesaplandı.

Her bir standart için ayrı ayrı çizilen kalibrasyon grafiğinden elde edilen doğru denklemine göre matriks ortamındaki her bir konjuge linoleik asit izomeri için ayrı ayrı hesaplama yapıldı.

Ortalama Alan ’a karşı çizilen Teorik Derişim (µg/mL) grafiğinden elde edilen temsili denklem;

$$y = m x + b$$

y : Ortalama Alan

m : Eğim / Slope

x : Teorik Derişim ($\mu\text{g/mL}$)

b : Kayım / Intercept

Numuneden elde edilen Ortalama Alan değeri, kalibrasyon denkleminde y parametresi yerine yazılarak , x (Teorik Derişim ($\mu\text{g/mL}$)) hesaplandı. Elde edilen sonuç analiz yönteminde belirtilen seyreltme faktörü ile çarpıldı.

$$C_{\text{numune}} = x \cdot \text{seyreltme faktörü}$$

Seyreltme Faktörü (S.F.): 10 mg (± 0.01 mg) numune 10 mL lik balona tartıldı. n-Hekzan ile 10 mL ye tamamlandı. 1.0 mL numune çözeltisi bir tüpe aktarıldı ve üzerine 1.5 mL hekzan eklendi. (S.F. = 2500)

2.2.2 L-Karnitin Analizi

2.2.2.1 Ana Stok Çözeltisinin, Standart Çözeltisinin ve Mobil Fazın Hazırlanması

Ana Stok Çözeltisi-1 (A.S.Ç.-1) (30 mg/mL) : 300 mg L-karnitin kalibre 10 mL'lik bir balonjojeye tartılıp saf su ile 10 mL'lik hacmine tamamlandı.

Standart Stok Çözeltisi-1 (S.S.Ç.-1) ((alfa-Bromo) metilfenilketon) (800 mg/mL) : 800 mg (alfa-Bromo) metil fenil keton kalibre 10 mL'lik bir balonjojeye tartılıp etanol ile 10 mL'lik hacmine tamamlandı.

Standart Stok Çözeltisi-2 (S.S.Ç.-2):

Ana Stok Çözelti-1 'den 1.0 mL alınıp deney tüpüne aktarıldı. Üzerine Standart Stok Çözelti-1 'ten 0.5 mL eklenip vortekste 5 dk çalkalandı. Ardından 65°C lik etüvde 30 dk bekletildi. Bu esnada 10 dk'da bir tüpler vortekste 30'ar saniye çalkalandı. Süre sonunda etüvden çıkarılıp oda sıcaklığına gelmesi beklendi. Oda sıcaklığına ulaşıldığında tüpe 5 mL etil asetat konup 10 dk çalkalandı. 3000 rpm'de 5 dk santrifüjlendikten sonra alttaki sulu faz alındı. Türevlendirilen Standart Stok Çözeltisi-2 (S.S.Ç.-2) aşağıdaki tabloda gösterildiği gibi seyreltildi. Diğer standart çözeltiler aşağıdaki tablo 14 yardımı ile hazırlandı.

Standart No	Seyreltme	L-karnitin (µg/mL)
1	100µL (S.S.Ç.-2) + 1900 µL Su	1500
2	1000µL Standart 1 + 1000 µL Su	750
3	800µL Standart 2 + 1200 µL Su	300
4	1000µL Standart 3 + 1000 µL Su	150
5	400µL Standart 4 + 1600 µL Su	30

Tablo 14 : L-karnitin standart çözelti hazırlama tablosu

Mobil Faz Hazırlama Prosedürü : 0.5 mol sodyum perklorat 1.0 L’lik bir balonjojeye tartılıp su ile hacmine tamamlandı. 0.25 mol/L perklorik asit çözeltisi ile pH 3.8 e ayarlandı. Hazırlanan sodyum perklorat çözeltisinden 740 mL alınıp 260 mL asetonitril eklendi ve ultrasonik banyoda degaze edildi.

2.2.2.2 L-Karnitin Analizi İçin Kromatografik Cihaz Şartları

L-Karnitinin miktar tayini için ayarlanması gereken cihaz şartları tablo 15’de verilmiştir.

Cihaz	HPLC-UV Sistemi (1290-infinity) (Agilent Tech.)
Kolon	C18 Kolon (150*4.6mm)
Akış	0.5 mL/dk
Dedektör	UV
Dedektör Dalga Boyu	235 nm
Mobil Faz	260 mL Asetonitril : 740 mL Sodyum perklorat (0.5 mol/mL) (ph:3.8)
Enjeksiyon hacmi	20 µL
Analiz Süresi	30 dk
Kolon Sıcaklığı	Oda Sıcaklığı 25 °C

Tablo 15 : L-karnitin analizi için cihaz parametreleri



Şekil 21 : HPLC-UV Sistemi (Agilent 1290-Infinity)

2.2.2.3 L-Karnitin Miktar Tayini için Analitik Metot Validasyonu

L-Karnitinin miktar tayini yöntemini valide etmek için aşağıdaki parametreler kullanıldı,

- ✓ Doğrusallık / Linearity
- ✓ Enjeksiyon Tekrarlanabilirliği / Repeatability
- ✓ Ekstraksiyon Tekrarlanabilirliği ve Geri Kazanım / Recovery
- ✓ Seçicilik / Specificity
- ✓ Seçimlilik / Selectivity
- ✓ Belirtme ve Tayin Sınırları / LOD-LOQ
- ✓ Yöntem Dayanıklılığı / Method Stability

kriterleri incelenerek elde edilen sonuçlar değerlendirildi.

L-karnitin miktarının belirlenmesine yönelik olan metot ise, L-Karnitin etkin maddesi için tablo 14’de belirtilen koşullarda hazırlanan 30.0 µg/mL – 1500.0 µg/mL derişim aralığında valide edildi.

2.2.2.3.1 Doğrusallık

Doğrusallık kriteri, 30-150-300-750 ve 1500 µg/mL olmak üzere, tablo 14'e göre hazırlanan 5 ayrı derişim seviyesinde L-Karnitin'in standart test çözeltisi ile ölçüldü. Ard arda 3'er enjeksiyon yapılan her bir derişim basamağından elde edilen ortalama standart alan değerleri üzerinden doğrusallık hesaplaması yapıldı.

2.2.2.3.2 Enjeksiyon Tekrarlanabilirliği

Kesinlik kriterinin bir kavramı olan çalışma şartlarında tekrarlanan analizlerde elde edilen sonuçların birbiriyle uyumunu ve kullanılan cihazın tekrarlanabilirliğini test etmek amacıyla, 300 µg/mL derişimindeki L-Karnitin standardının ardı ardına 5 paralel enjeksiyonu yapılarak sonuçların istatistiksel değerlendirmesi yapıldı.

2.2.2.3.3 Ekstraksiyon Tekrarlanabilirliği ve Geri Kazanım

Elde edilen deneysel değerlerin gerçek değere ne kadar yakın olduğunu tespit amacıyla düşük, orta ve yüksek derişimlerde hazırlanan test çözeltileri analiz edildi. L-Karnitin için sırasıyla 150-300 ve 750 µg/g olmak üzere her bir derişim seviyesi için 3 paralel numune çalışılmış elde edilen sonuçlar ortalama geri kazanım ve % RSD cinsinden hesaplandı.

2.2.2.3.4 Seçicilik

300 µg/mL L-Karnitin standardı ile su cihaza aynı şartlar altında ve aynı metotla verilmiş, etken madde ile aynı alıkonma zamanında girişim olup olmadığına bakıldı.

2.2.2.3.5 Seçimlilik

Elde edilen kromatograma ilişkin resolüsyon ve teorik plaka sayısının hesaplanabilmesi için 300 µg/mL L-Karnitin standardının enjeksiyonu yapıldı. Söz konusu olan resolüsyon ve teorik plaka sayısı değerleri Eşitlik 1 ve Eşitlik 2'e göre hesaplandı.

2.2.2.3.6 Belirtme ve Tayin Sınırları / (LOD-LOQ)

150 µg/mL derişimindeki L-Karnitin standardı üzerinden belirtme ve tayin sınırları belirlendi. Söz konusu LOD ve LOQ değeri Eşitlik 3 ve Eşitlik 4'e göre hesaplandı.

2.2.2.4 L-Karnitin Analizi

10 mL lik bir deney tüpüne 40.0 mg L-karnitin içeren formülasyondan 100.0 mg tartıldı. 1.0 mL su eklenip vortekslendi ve üzerine Standart Stok Çözelti 2 'den 0.5 mL eklendi ve vortekste 5 dk çalkalandı. Ardından 65 °C lik etüvde 30 dk bekletildi. Bu esnada tüpler, vortekste 10 dk'da bir 30'ar saniye çalkalandı. Süre sonunda etüvden çıkarılıp oda sıcaklığına gelmesi beklendi. Oda sıcaklığına ulaşıldığında tüpe 5 mL etil asetat konup 10 dk tekrar çalkalandı. 3000 rpm'de 5 dk santrifüjlendikten sonra alttaki sulu faz alındı. Türevlendirilen formülasyonun derişiminin hazırlanan kalibrasyon değeri arasında kalması için HPLC saflıkta su ile 100 kat seyreltildi ve son derişim 400 µg/mL olarak ayarlandı. Tablo 15'de belirtilen kromatografik şartlarda HPLC-FLD cihazına enjekte edildi.

2.2.2.5 L-Karnitin için Çalışma Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Formülasyondaki L-Karnitin Miktarının Hesaplaması : Formülasyondaki L-Karnitin miktarı µg/mL cinsinden çizilen kalibrasyon eğrisine göre hesaplandı.

Standart ile çizilen kalibrasyon grafiğinden elde edilen doğru denklemine göre matriks ortamındaki L-Karnitin için hesaplama yapıldı.

Ortalama Alan 'a karşı çizilen Teorik Derişim (µg/mL) grafiğinden elde edilen temsili denklem;

$$y = m x + b$$

y : Ortalama Alan

m : Eğim / Slope

x : Teorik Derişim (µg/mL)

b : Kayım / Intercept

Numuneden elde edilen Ortalama Alan değeri, kalibrasyon denkleminde y parametresi yerine yazılarak , x (Teorik Derişim (µg/mL)) hesaplanır.Elde edilen sonuç analiz yönteminde belirtilen seyreltme faktörü ile çarpıldı.

$$C_{\text{numune}} = x \cdot \text{seyreltme faktörü}$$

Seyreltme Faktörü (S.F.): 10 mL'lik bir deney tüpüne 100.0 mg ($\pm 0,01$ mg) % 30 (w/w) L-karnitin içeren deney numunesi tartıldı. 1.0 mL su eklenip vortekslendi. (S.F. = 1000)

2.2.2.6 Yöntem Dayanıklılığı

Başlangıçta ve buzdolabında ($+4^{\circ}\text{C}$) 24 saat bekletildikten sonra, sisteme $300\mu\text{g/mL}$ derişimindeki L-Karnitin standardı ve $300\mu\text{g/g}$ derişiminde L-Karnitin içeren numune enjeksiyonları yapıldı. Elde edilen sonuçlar üzerinden % kayıp hesaplandı.

2.2.2.7 KLA ve L-Karnitin İçeren Formülasyonun Hazırlanması

Hazırlama kabı içersine 1.0 gram aspir yağı, 250 mg 9c,11t-Konjuge Linoleik Asit, 250 mg 10t,12c-Konjuge Linoleik Asit ve 1000 mg L-karnitin tartılarak karıştırıcıda 30 dk çalkalandı. Hazırlanan formülasyonun tamamen doğal bir ürün özelliği taşıması için süspansiyonlarda yaygın olarak kullanılan hiçbir yardımcı madde ya da ajan bu üründe kullanılmadı.

2.2.2.8 Formülasyonun Kimyasal Stabilesi

Hazırlanan formülasyon, $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ve $75\% \pm 5\%$ nem oranına ayarlanmış inkübatörde 6 aylık kısa süreli kimyasal stabilite testine tabi tutuldu (52). Söz konusu etkin maddelerin hazırlanan bu sıvı dozaj formu içersindeki miktarları 0. , 3. ve 6. aylarda test edildi.

2.2.2.9 Formülasyonun Fiziksel Stabilesi

$40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ve $75\% \pm 5\%$ nem oranındaki inkübatörde 6 ay boyunca muhafaza edilen formülasyon ürünün fiziksel stabilite testine yönelik partikül boyutu, zeta potansiyeli, viskozite ve sedimentasyon hacmi analizleri 0. , 3. ve 6. aylarda yapıldı.



Şekil 22 : Stabilite testleri için hazırlanan ürün ve inkübatör

2.2.2.9.1 Zeta Potansiyel (Elektrokinetik)

Hazırlanan formülasyon zetametre küvetinin yarısına kadar dolduruldu (2 mL) ve cihaza yerleştirildi. Zetametre cihazında zeta potansiyeli ölçüldü.



Şekil 23 : Zetametre (Zetasizer Nano ZSP)

2.2.2.9.2 Partikül Boyutu Ölçümü

Malvern mastersizer partikül boyutu ölçüm cihazının dispersiyon ünitesine hazırlanan formülasyondan 2 g konularak ‘Laser Obscuration’ değeri % 10’ dan büyük olduğu noktada okutma işlemi yapıldı.



Şekil 24 : Partikül boyutu ölçüm cihazı (Mastersizer 3000)

2.2.2.9.3 Viskozite Ölçümü

Viskozimetrenin döner diski 200 rpm hıza getirildi ve 200 mL'lik beher içerisine konulan formülasyonun içine daldırılarak formülasyonun viskozitesi Brookfield DV-II pro viskozimetresinden okundu.



Şekil 25 : Viskozimetre (Brookfield DV-II Pro)

2.2.2.9.4 Sedimentasyon Hacmi Ölçümü

Sedimentasyon hacminin bulunması amacıyla kalibre bir mezür içersine hazırlanan formülasyondan 100 mL dolduruldu ve ardından çökmesi beklendi. Çökelme tamamlandıktan sonra formülasyonun son çökelti hacmi belirlendi ve bu son çökelti hacminin ilk hacmine oranından sedimentasyon hacmi hesaplandı.



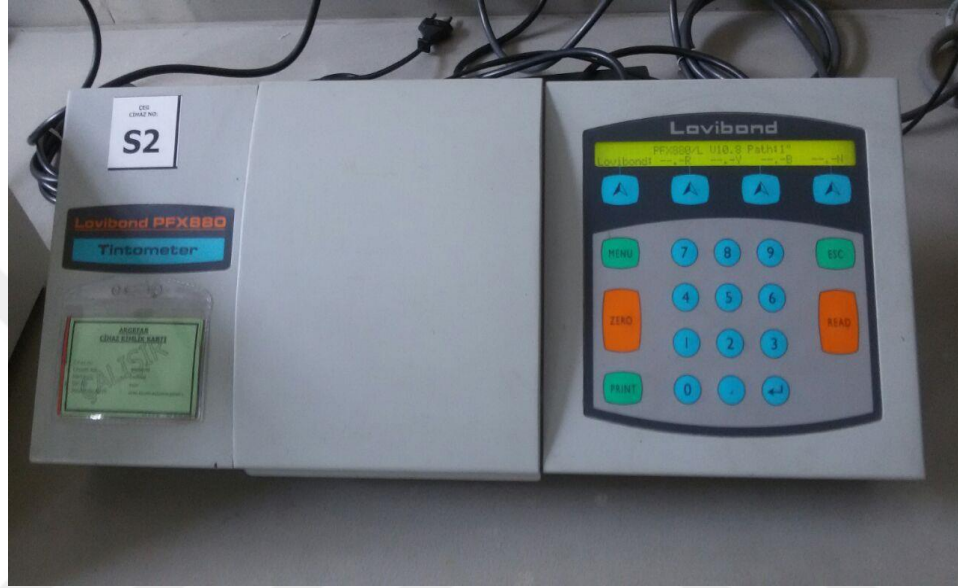
Şekil 26 : 100 mL'lik mezür içerisindeki formülasyon

2.2.2.9.5 Görünüş

Hazırlanan formülasyonun $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ve $75\% \pm 5\%$ nem oranında 6 aylık stabilite sürecinde görünüşünün değişimi izlendi.

2.2.2.9.6 Renk

Hazırlanan formülasyonun $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ve $75\% \pm 5\%$ nem oranında 6 aylık stabilitesi sürecinde renk değişimi Lovibond Tintometresi ile kırmızı, mavi, sarı ve nötr dalga boylarında test edildi.



Şekil 27 : Lovibond Tintometresi

2.2.2.9.7 Koku

Hazırlanan formülasyonun $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ve $75\% \pm 5\%$ nem oranında 6 aylık stabilite sürecinde koku değişimi izlendi.

2.2.2.9.8 Tat

Hazırlanan formülasyonun $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ve $75\% \pm 5\%$ nem oranında 6 aylık stabilite sürecinde tad değişimi izlendi.

2.2.2.10 Mikrobiyolojik Analizler

Hazırlanan formülasyonda, aerobik mezofilik bakteri sayımı, maya-küf sayımı ve *Escherichia coli* sayımı TEMPO® cihazı ve kitleri ile yapıldı. Elde edilen sonuçlar tablo 42’ de sunulmuştur.



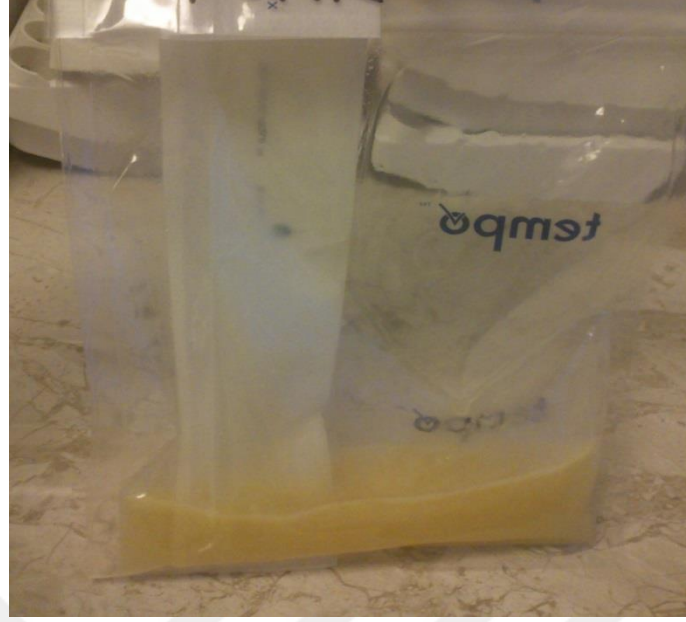
Şekil 28 : TEMPO® doldurucu ve okuyucu.



Şekil 29 : TEMPO® kitleri ve besiyerleri



Şekil 30 : Stomacher cihazı ve tartım işlemi



Şekil 31 : TEMPO® torbasına tartılan formülasyon

2.2.2.10.1 TEMPO® TVC Testi ile Aerobik Mezofilik Bakteri (Toplam Bakteri) Sayımı

TEMPO® torbasına tartılan 10 g formülasyon üzerine 90 mL peptonlu su eklendi ve stomacher cihazında homojenize edildi. İlk dilüsyonun homejenizasyonu ile bunun TEMPO® kartlarına transferi arasındaki süre 45 dakikayı geçmemelidir.

Oda sıcaklığındaki TEMPO® TVC besiyeri şişelerine 3.9 mL saf steril su ilave edildikten sonra steril bir pipet ile TEMPO® torbasının filtreli kısmından 0.1 mL numune alındı ve sulandırılmış besiyerine eklendi. Ve ardından vorteks tipi karıştırıcı ile homojenize edildi. TEMPO® TVC kartları barkod okuyucu yardımıyla sisteme okutulduktan sonra kartın transfer tüpü şişenin içine girecek şekilde tablaya oturtuldu. Tabla TEMPO® doldurucusuna yerleştirilir ve doldurma başlatıldı. Doldurma işlemi sona erdikten sonra cihaz transfer tüplerini keser ve mühürler.

Doldurma tablası TEMPO® doldurucusundan alınır ve inkübasyon tablasına yerleştirildi. Kartların üzerindeki etiketler kullanıcıya bakacak şekilde 40-48 saat 30 °C'de inkübe edildi. Inkübasyon sonrasında okunacak olan kartlar okuyucuya yerleştirildi. Okuyucu her kartın barkodunu tarar ve kuyulardaki floresan ışımayı

yorumlar. Otomatik olarak numunenin adı ile test tipini, dilüsyonu ve sonuç sayısını eşleştirir (53).

2.2.2.10.2 TEMPO® YM Testi ile Maya-Küf Sayımı

TEMPO® torbasına tartılan 10 g formülasyon üzerine 90 mL peptonlu su eklenir ve stomacher cihazında homojenize edildi. İlk dilüsyonun homejenizasyonu ile bunun TEMPO® kartlarına transferi arasındaki süre 45 dakikayı geçmemelidir.

Oda sıcaklığındaki TEMPO® YM besiyeri şişelerine 3.0 mL saf steril su ilave edildikten sonra steril bir pipet ile TEMPO® torbasının filtreli kısmından 1.0 mL numune alınır ve sulandırılmış besiyerine eklendi. Ve ardından vorteks tipi karıştırıcı ile homojenize edildi. TEMPO® YM kartları barkod okuyucu yardımıyla sisteme okutulduktan sonra kartın transfer tüpü şişenin içine girecek şekilde tablaya oturtuldu. Tabla TEMPO® doldurucusuna yerleştirildi ve doldurma başlatıldı. Doldurma işlemi sona erdikten sonra cihaz transfer tüplerini keser ve mühürler.

Doldurma tablası TEMPO® doldurucusundan alınır ve inkübasyon tablasına yerleştirildi. Kartların üzerindeki etiketler kullanıcıya bakacak şekilde 72-76 saat 25 °C'de inkübe edildi. Inkübasyon sonrasında okunacak olan kartlar okuyucuya yerleştirildi. Okuyucu her kartın barkodunu tarar ve kuyulardaki floresan ışımaya yorumlar. Otomatik olarak numunenin adı ile test tipini, dilüsyonu ve sonuç sayısını eşleştirir (54).

2.2.2.10.3 TEMPO® EC Testi ile *Escherichia coli* Sayımı

TEMPO® torbasına tartılan 10 g formülasyon üzerine 90 mL peptonlu su eklendi ve stomacher cihazında homojenize edildi. İlk dilüsyonun homejenizasyonu ile bunun TEMPO® kartlarına transferi arasındaki süre 45 dakikayı geçmemelidir.

Oda sıcaklığındaki TEMPO® EC besiyeri şişelerine 3.0 mL saf steril su ilave edildikten sonra steril bir pipet ile TEMPO® torbasının filtreli kısmından 1.0 mL numune alındı ve sulandırılmış besiyerine eklendi. Ve ardından vorteks tipi karıştırıcı ile homojenize edildi. TEMPO® EC kartları barkod okuyucu yardımıyla sisteme okutulduktan sonra kartın transfer tüpü şişenin içine girecek şekilde tablaya oturtuldu. Tabla TEMPO® doldurucusuna yerleştirildi ve doldurma başlatıldı. Doldurma işlemi sona erdikten sonra cihaz transfer tüplerini keser ve mühürler.

Doldurma tablası TEMPO® doldurucusundan alındı ve inkübasyon tablasına yerleştirildi. Kartların üzerindeki etiketler kullanıcıya bakacak şekilde 22-27 saat 35 °C’de inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında okunacak olan kartlar okuyucuya yerleştirildi. Okuyucu her kartın barkodunu tarar ve kuyulardaki florosan ışımayı yorumlar. Otomatik olarak numunenin adı ile test tipini, dilüsyonu ve sonuç sayısını eşleştirir (55).

2.2.2.11 Hazırlanan Formülasyonun Yağ Asitleri Kompozisyonunun Belirlenmesi

Yaklaşık 10 mg aspir yağı cam bir tüp içersine konulduktan sonra, üzerine 2 mL izooktan ve 2 mL Metanolik KOH (2 N) eklenip 10 dk çalkalandı. Faz ayrımı gerçekleştikten sonra üst faz viallendi ve gaz kromatografisi cihazına enjekte edildi. Sonuç yağ asitleri metil esterleri cinsinden yüzde dağılım olarak elde edildi. Elde edilen sonuçlar tablo 43’de yer almaktadır. Yağ asitleri kompozisyonunun belirlenmesi için kullanılan cihaz parametreleri tablo 16 deki gibidir.

Cihaz	GC-FID Sistemi
Kolon	SUPELCO SP TM-2560 kapiler kolon (100m*0.25mm*0.20µm)
Isı programı	Başlangıç 140 °C, dakikada 4 °C ile 240 °C’ye, 5dakika isotermik
Split oranı	1:100
Akış	20 cm ³ / sn
Dedektör sıcaklığı	250 °C
Enjeksiyon hacmi	1 µL
İnlet sıcaklığı	250 °C

Tablo 16 : Yağ asitleri kompozisyonunun belirlenmesi için kullanılan cihaz parametreleri

BÖLÜM III

3 BULGULAR

3.1 Konjuge Linoleik Asidin Analitik Metot Validasyonu

3.1.1 Doğrusallık

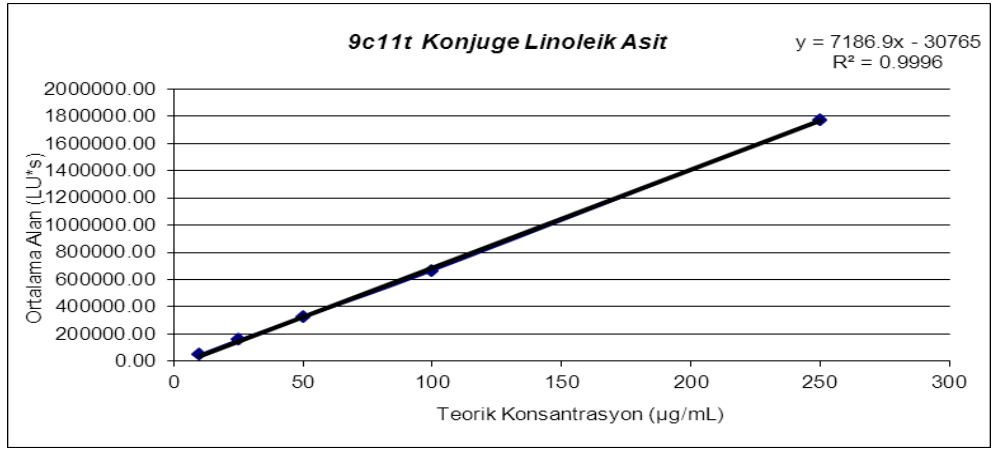
9c,11t ve 10t,12c-Konjuge Linoleik Asidin 10-25-50-100 ve 250 µg/mL derişimlerinde olmak üzere 5 ayrı derişim seviyesinde standart test çözeltisi ile yapılan ölçümlerin sonuçları tablo 17 ve 18’de verilmiştir.

Her bir derişim basamağında elde edilen standart alanı üzerinden doğrusallık hesaplaması sonucu 9c,11t-Konjuge Linoleik Asidin %RSD değerleri 1.9 ile 4.3 arasında, 10t,12c-Konjuge Linoleik Asit İçin ise %RSD değerleri 1.5 ile 4.2 arasında bulundu.

9c,11t ve 10t,12c-Konjuge Linoleik Asidin çizilen kalibrasyon eğrisinde doğru denklemleri sırasıyla $y=7186.9x-30765$, $y=6928.1x-3375.8$ regrasyon katsayısı ise her iki analit için 0.9996 bulundu.

Numune No	Derişim (µg/mL)	Pik Alanları	Ortalama Pik Alanları	% RSD
1	10	49177.0	49975.3	3.7
		52072.0		
		48677.0		
2	25	150713.0	158241.0	4.3
		160058.0		
		163952.0		
3	50	310390.0	324152.7	3.7
		329459.0		
		332609.0		
4	100	651278.0	665628.7	1.9
		675520.0		
		670088.0		
5	250	1694331.0	1774471.3	3.9
		1810651.0		
		1818432.0		

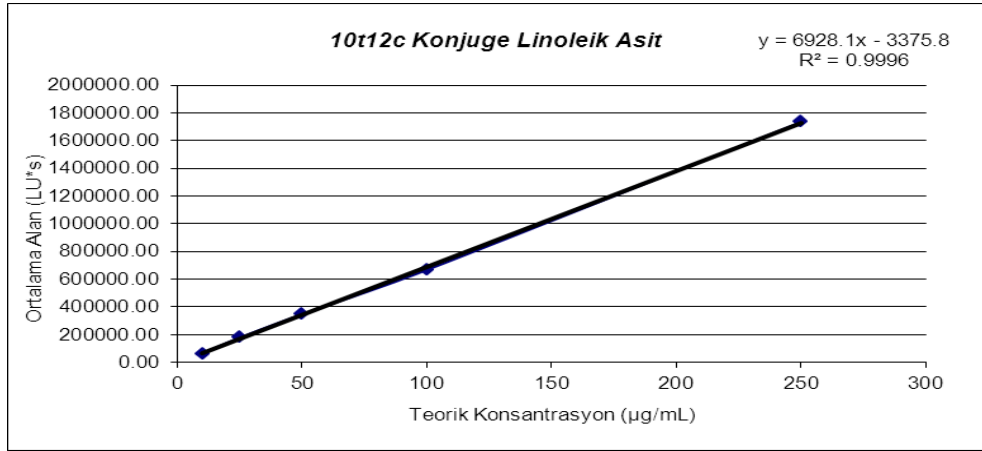
Tablo 17 : 9c,11t-Konjuge Linoleik Asidin doğrusallık değerleri (m/z = 81)



Şekil 32 : 9c,11t-Konjuge Linoleik Asidin doğrusallık grafiği

Numune No	Derişim (µg / mL)	Pik Alanları	Ortalama Pik Alanları	% RSD
1	10	65253.0	65710.3	1.5
		66839.0		
		65039.0		
2	25	174589.0	179837.7	2.7
		180547.0		
		184377.0		
3	50	341154.0	348970.0	2.3
		348280.0		
		357476.0		
4	100	655112.0	666814.0	1.6
		675921.0		
		669409.0		
5	250	1651762.0	1735523.7	4.2
		1782669.0		
		1772140.0		

Tablo 18 : 10t,12c-Konjuge Linoleik Asidin doğrusallık değerleri (m/z = 81)



Şekil 33 : 10t,12c-Konjuge Linoleik Asidin doğrusallık grafiği

3.1.2 Enjeksiyon Tekrarlanabilirliği

100 µg/mL derişimindeki 9c,11t ve 10t-12c Konjuge Linoleik Asit standardının ardı ardına 5 kere enjeksiyonu yapılarak bulunan enjeksiyon tekrarlanabilirliği değerleri Tablo 19’da sunulmuştur.

9c,11t- Konjuge Linoleik Asidin bulunan alanlara ilişkin %RSD değeri 0.76 ve geliş zamanlarına (Rt) ilişkin %RSD değeri ise 1.7 bulundu. 10t-12c- Konjuge Linoleik Asidin bulunan alanlara ilişkin %RSD değeri 0.50 ve geliş zamanlarına (Rt) ilişkin % RSD değeri ise 1.6 bulundu.

Ölçüm Sayısı	Zaman Aralığı (dk)	Standart	
		Alan	Rt
1. Ölçüm	12.0	651278	6.201
2. Ölçüm	12.0	675520	6.199
3. Ölçüm	12.0	670088	6.201
4. Ölçüm	12.0	667547	6.201
5. Ölçüm	12.0	682228	6.201
Ort.		15.06	669332.2
Std. Sapma		0.11	11557.5
% RSD		0.76	1.7

Tablo 19 : 9c,11t- Konjuge Linoleik Asit (100 µg/mL) için enjeksiyon tekrarlanabilirliği değerleri

Ölçüm Sayısı	Zaman Aralığı (dk)	Standart	
		Alan	Rt
1. Ölçüm	12.0	655112	6.245
2. Ölçüm	12.0	675921	6.243
3. Ölçüm	12.0	669409	6.244
4. Ölçüm	12.0	660673	6.244
5. Ölçüm	12.0	681994	6.244
Ort.		10.96	668621.8
Std. Sapma		0.05	10936.3
% RSD		0.50	1.6

Tablo 20 : 10t,12c-Konjuge Linoleik Asit (100 µg/mL) için enjeksiyon tekrarlanabilirliği değerleri

3.1.3 Ekstraksiyon Tekrarlanabilirliği ve Geri Kazanım

9c,11t ve 10t-12c Konjuge Linoleik Asidin 25-50 ve 100 µg/g olmak üzere her bir derişim seviyesi için 3 paralel numune çalışıldı ve elde edilen sonuçlar ortalama geri kazanım ve % RSD cinsinden hesaplandı.

9c,11t-Konjuge Linoleik Asidin ortalama geri kazanım değeri 25 µg/g için % 93.85, 50 µg/g için % 99.09 ve 100 µg/g için % 93.77 bulundu. 10t,12c-Konjuge Linoleik Asidin ise ortalama geri kazanım değeri 25 µg/g için % 91.43, 50 µg/g için % 99.66 ve 100 µg/g için % 93.25 bulundu.

9c,11t-Konjuge Linoleik Asidin %RSD değeri 25 µg/g için 0.83 , 50 µg/g için 0.75 ve 100 µg/g için 0.37 bulundu. 10t,12c-Konjuge Linoleik Asidin ise %RSD değeri 25 µg/g için 0.30 , 50 µg/g için 0.31 ve 100 µg/g için 0.76 bulundu.

Numune No	Derişim (µg / g)	Pik Alanları Oranı Standart/İç Standart	Ortalama Pik Alanları Oranı Standart/İç Standart	% Geri Kazanım	Ortala ma Geri Kazanı m (%)	% RSD
1	25	134628.0	136191.3	92.92	93.85	0.83
		131939.0				
		142007.0				
2	25	143368.0	138382.3	94.14		
		138041.0				
		133738.0				
3	25	134014.0	138986.3	94.48		
		136158.0				
		146787.0				
4	50	324251.0	328382.7	99.95	99.09	0.75
		332141.0				
		328756.0				
5	50	330396.0	324120.7	98.76		
		315948.0				
		326018.0				
6	50	314117.0	323453.3	98.57		
		324994.0				
		331249.0				
7	100	646185.0	643954.7	93.88	93.77	0.37
		636443.0				
		649236.0				
8	100	648115.0	645336.7	94.07		
		636418.0				
		651477.0				
9	100	634420.0	640246.0	93.37		
		639149.0				
		647169.0				

Tablo 21 : 9c,11t-Konjuge Linoleik Asidin ekstraksiyon tekrarlanabilirliği ve geri kazanım değerleri

Numune No	Derişim (µg / g)	Pik Alanları Oranı Standart/İç Standart	Ortalama Pik Alanları Oranı Standart/İç Standart	% Geri Kazanım	Ortalama Geri Kazanım (%)	% RSD
1	25	152193.0	154433.3	91.11	91.43	0.30
		148045.0				
		163062.0				
2	25	161035.0	155087.3	91.49		
		152227.0				
		152000.0				
3	25	151299.0	155450.7	91.70		
		152664.0				
		162389.0				
4	50	345607.0	342300.3	99.79	99.66	0.31
		343071.0				
		338223.0				
5	50	352034.0	340601.3	99.30		
		327409.0				
		342361.0				
6	50	344274.0	342646.3	99.89		
		337965.0				
		345700.0				
7	100	644435.0	643406.3	93.36	93.25	0.76
		638019.0				
		647765.0				
8	100	645669.0	647500.3	93.95		
		645796.0				
		651036.0				
9	100	636593.0	637012.0	92.43		
		636708.0				
		637735.0				

Tablo 22 : 10t,12c-Konjuge Linoleik Asidin ekstraksiyon tekrarlanabilirliği ve geri kazanım değerleri

3.1.4 Seçicilik

50 µg/mL derişimindeki 9c,11t ve 10t,12c-Konjuge Linoleik Asit standartları ile kör numune cihaza aynı şartlar altında ve aynı metotla verildi, etken madde ile aynı alıkonma zamanında ve aynı m/z oranında pik gözlenmedi. Aşağıdaki tablolarda etkin maddelerin alan değerleri ve alıkonma zamanları verilmiştir.

Analit Adı	9c,11t - Konjuge Linoleik Asit			
Matriks Adı	Aspir Yağı			
Derişim	50 µg/mL			
	Standart		Kör	
	Alan	Rt	Alan	Rt
1. Paralel	310390	6.200	-	-
2. Paralel	329459	6.200	-	-

Tablo 23 : 9c,11t-Konjuge Linoleik Asidin seçicilik değerleri

Analit Adı	10t,12c- Konjuge Linoleik Asit			
Matriks Adı	Aspir Yağı			
Derişim	50 µg/mL			
	Standart		Kör	
	Alan	Rt	Alan	Rt
1. Paralel	341154	6.244	-	-
2. Paralel	348280	6.244	-	-

Tablo 24 : 10t,12c -Konjuge Linoleik Asidin seçicilik değerleri

3.1.5 Seçimlilik

Elde edilen kromatograma ilişkin resolüsyon ve teorik plaka sayısının hesaplanabilmesi için 9c,11t-Konjuge Linoleik Asit ve 10t,12c-Konjuge Linoleik Asit standartlarının enjeksiyonu yapıldı. Elde edilen değerler tablo 25 ve 26'da verilmiştir.

50 µg/g derişimindeki 9c,11t ve 10t-12c-Konjuge Linoleik Asidin resolüsyon değerleri sırasıyla 7.88 ve 1.43 bulundu. Ayrıca teorik plaka sayısı ise yine sırasıyla 744214 ve 626581 olarak bulundu.

Analit Adı	9c,11t - Konjuge Linoleik Asit		
Matriks Adı	Aspir Yağı		
Derişim	50 µg/g		
Bir Önceki Sinyal		Standart	
Rt	Genişlik	Rt	Genişlik
5.921	0.035	6.200	0.029
Kriterler	Değer	Sınır Değerleri	
R _s	7.88	≥ 1.25	
N	744214	≥ 2000	

Tablo 25 : 9c,11t-Konjuge Linoleik Asidin seçimlilik değerleri

Analit Adı	10t,12c- Konjuge Linoleik Asit		
Matriks Adı	Aspir Yağı		
Derişim	50 µg/g		
Bir Önceki Sinyal		Standart	
Rt	Genişlik	Rt	Genişlik
6.200	0.029	6.244	0.032
Kriterler	Değer	Sınır Değerleri	
R _s	1.43	≥ 1.25	
N	626581	≥ 2000	

Tablo 26 : 10t,12c-Konjuge Linoleik Asidin seçimlilik değerleri

3.1.6 Belirtme ve Tayin Sınırları / (LOD-LOQ)

9c,11t ve 10t,12c-Konjuge Linoleik Asidin belirtme sınırı (LOD) 2.4 µg/mL, tayin sınırı ise (LOQ) 8.0 µg/mL olarak belirlendi.

Analit Adı	9c,11t - Konjuge Linoleik Asit
Matriks Adı	Hekzan
Standardın derişimi	25 µg/mL
LOD	2.4 µg/mL
LOQ	8.0 µg/mL

Tablo 27 : 9c,11t -Konjuge Linoleik Asidin LOD-LOQ değerleri

Analit Adı	10t,12c - Konjuge Linoleik Asit
Matriks Adı	Hekzan
Standardın derişimi	25 µg/mL
LOD	2.4 µg/mL
LOQ	8.0 µg/mL

Tablo 28 : 10t,12c-Konjuge Linoleik Asidin LOD-LOQ değerleri

3.1.7 Yöntem Dayanıklılığı

9c,11t-Konjuge Linoleik Asit standardının 24. Saat sonundaki derişimi 0. Saat ile karşılaştırıldığında % kayıp 5.39 olarak belirlendi. Aynı şekilde numunedeki kayıp ise % 1.44 olarak bulundu.

10t,12c-Konjuge Linoleik Asit standardının 24. Saat sonundaki derişimi 0. Saat ile karşılaştırıldığında % kayıp 4.11 olarak belirlendi. Aynı şekilde numunedeki kayıp ise % 0.72 olarak bulundu.

Analit Adı		9c,11t - Konjuge Linoleik Asit	
Matriks Adı		Aspir Yağı	
Ölçüm		Standart (50µg/mL) Alan Değeri	Numune (50µg/g) Alan Değeri
0. Saat	1.	298632	320825
	2.	315721	321695
	3.	324805	320999
	Ort.	313053	321173
24. Saat	1.	299494	323373
	2.	302013	321489
	3.	282078	326317
	Ort.	294528	316090
0. saat ile karşılaştırma (% Kayıp)		5.39	1.44

Tablo 29 : 9c,11t-Konjuge Linoleik Asidin yöntem dayanıklılığı

Analit Adı		10t,12c- Konjuge Linoleik Asit	
Matriks Adı		Aspir Yağı	
Ölçüm		Standart (50 µg/mL) Alan Değeri	Numune (50 µg/g) Alan Değeri
0. Saat	1.	295717	327244
	2.	306086	326014
	3.	325318	324999
	Ort.	309040	326086
24. Saat	1.	294047	323373
	2.	304324	321489
	3.	290187	326317
	Ort.	296186	323726
0. saat ile karşılaştırma (% Kayıp)		4.11	0.72

Tablo 30 : 10t,12c-Konjuge Linoleik Asidin yöntem dayanıklılığı

3.2 L-Karnitinin Analitik Metot Validasyonu

3.2.1 Doğrusallık

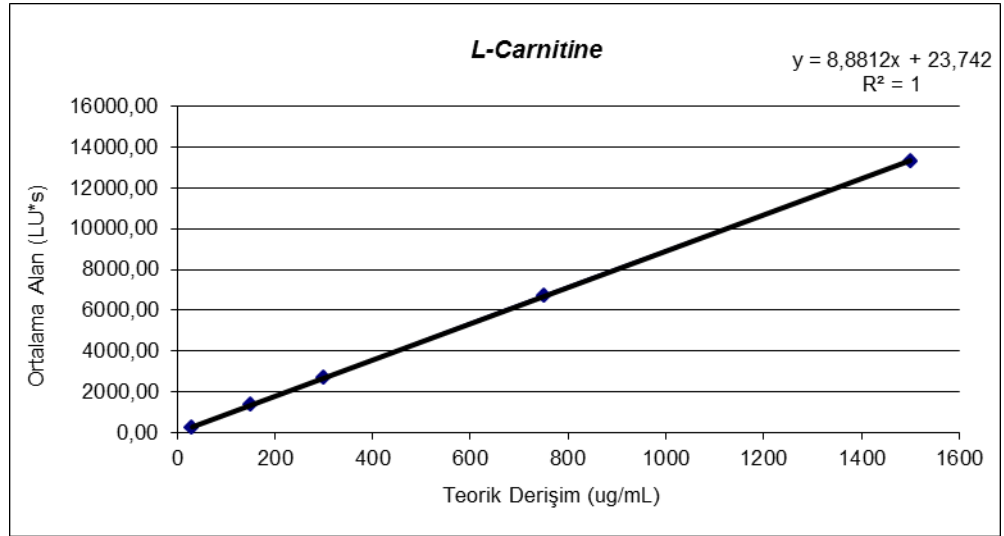
L-Karnitinin 30-150-300-750 ve 1500 µg/mL derişimlerinde olmak üzere 5 ayrı derişim seviyesinde standart test çözeltisi ile yapılan ölçümlerin sonuçları Tablo 17’de verilmiştir.

Her bir derişim basamağında elde edilen standart alanı üzerinden doğrusallık hesaplaması sonucu L-Karnitinin % RSD değerleri 0.1 ile 0.3 arasında bulundu.

L-Karnitinin çizilen kalibrasyon eğrisinde doğru denklemi $y=8.8812x+23.742$ ve regrasyon katsayısı ise 1.0 bulundu.

Numune No	Derişim (µg/mL)	Pik Alanları	Ortalama Pik Alanları	% RSD
1	30	271.4	270.8	0.3
		271.3		
		269.8		
2	150	1361.9	1359.7	0.1
		1359.4		
		1357.9		
3	300	2679.2	2672.9	0.2
		2673.6		
		2666.0		
4	750	6749.7	6740.0	0.1
		6736.3		
		6734.1		
5	1500	13327.7	13321.0	0.3
		13353.4		
		13281.8		

Tablo 31 : L-Karnitinin doğrusallık değerleri



Şekil 34 : L-Karnitinin doğrusallık grafiğı

3.2.2 Enjeksiyon Tekrarlanabilirliğı

300 µg/mL derişimindeki L-karnitin standardının ardı ardına 5 kere enjeksiyonu yapılarak bulunan enjeksiyon tekrarlanabilirliğı değerleri Tablo 20’de sunulmuştur.

L-Karnitinin alanlara ilişkin %RSD değeri 0.76 ve geliş zamanlarına ilişkin %RSD değeri ise 0.2 bulundu.

Ölçüm Sayısı	Zaman Aralığı (dk)	Standart	
		Alan	Rt
1. Ölçüm	30.0	2679.2	13.683
2. Ölçüm	30.0	2673.6	13.689
3. Ölçüm	30.0	2666.0	13.704
4. Ölçüm	30.0	2664.0	13.702
5. Ölçüm	30.0	2668.1	13.724
Ort.		15.06	2670.2
Std. Sapma		0.11	6.2
% RSD		0.76	0.2

Tablo 32 : L-Karnitinin enjeksiyon tekrarlanabilirliğı değerleri

3.2.3 Ekstraksiyon Tekrarlanabilirliği ve Geri Kazanım

L-Karnitinin 150-300 ve 750 µg/g olmak üzere her bir derişim seviyesi için 3 paralel numune çalışıldı ve elde edilen sonuçlar ortalama geri kazanım ve % RSD cinsinden hesaplandı. L-karnitin için ortalama geri kazanım değeri 150 µg/g için % 96.80, 300 µg/g için % 97.32 ve 750 µg/g için % 101.22 bulundu. L-Karnitin'in %RSD değeri 150 µg/g için 0.24 , 300 µg/g için 0.13 ve 750 µg/g için 0.22 bulundu.

Numune No	Derişim (µg / g)	Pik Alanları Oranı Standart/İç Standart	Ortalama Pik Alanları Oranı Standart/İç Standart	% Geri Kazanım	Ortalama Geri Kazanım (%)	% RSD
1	150	888.0	885.2	96.99	96.80	0.24
		885.7				
		881.8				
2	150	880.9	881.1	96.54		
		878.2				
		884.2				
3	150	883.5	884.2	96.88		
		887.5				
		881.5				
4	300	1754.6	1754.7	97.45	97.32	0.13
		1759.9				
		1749.7				
5	300	1751.1	1750.3	97.20		
		1750.7				
		1749.1				
6	300	1751.3	1751.9	97.29		
		1753.5				
		1751.0				
7	750	4505.8	4514.4	101.13	101.22	0.22
		4499.7				
		4537.7				
8	750	4512.3	4529.6	101.47		
		4541.2				
		4535.2				
9	750	4511.4	4511.9	101.07		
		4512.4				
		4512.0				

Tablo 33 : L-Karnitin için ekstraksiyon tekrarlanabilirliği ve geri kazanım değerleri

3.2.4 Seçicilik

300 µg/mL derişimindeki L-karnitin standardı ve kör numune cihaza aynı şartlar altında ve aynı metot ile verildi ve etken madde ile aynı alıkonma zamanında pik gözlenmedi. Aşağıdaki tablolarda L-karnitin standardının alan değerleri ve alıkonma zamanları verilmiştir.

Analit Adı	L-karnitin			
Matriks Adı	Aspir Yağı			
Derişim	300 µg/mL			
	Standart		Kör	
	Alan	Rt	Alan	Rt
1. Paralel	2652.9	13.736	-	-
2. Paralel	2672.0	13.720	-	-

Tablo 34 : L-Karnitinin seçicilik değerleri

3.2.5 Seçimlilik

Elde edilen kromatograma ilişkin resolüsyon ve teorik plaka sayısının hesaplanabilmesi için L-karnitin standardının enjeksiyonu yapıldı. Elde edilen değerler tablo 35’de verilmiştir. 300 µg/g derişimindeki L-Karnitinin resolüsyon değeri 9.94 ve ayrıca teorik plaka sayısı ise 9996 olarak bulundu.

Analit Adı	L-karnitin		
Matriks Adı	Aspir Yağı		
Derişim	300 µg/g		
Bir Önceki Sinyal		Standart	
Rt	Genişlik	Rt	Genişlik
8.897	0.271	13.698	0.312
Kriterler	Değer	Sınır Değerleri	
R _s	9.94	≥ 1.25	
N	9996	≥ 2000	

Tablo 35 : L-Karnitinin seçimlilik değerleri

3.2.6 Belirtme ve Tayin Sınırları / (LOD-LOQ)

L-Karnitin belirtme sınırı (LOD) 0.2 µg/mL, tayin sınırı ise (LOQ) 0.5 µg/mL olarak belirlendi.

Analit Adı	L-karnitin
Matriks Adı	Su
Standardın derişimi	150 µg/mL
LOD	0.2 µg/mL
LOQ	0.5 µg/mL

Tablo 36 : L-Karnitin İçin LOD-LOQ değerleri

3.2.7 Yöntem Dayanıklılığı

L-karnitin standardının 24. Saat sonundaki derişimi 0. Saat ile karşılaştırıldığında % kayıp 2.06 olarak belirlendi. Aynı şekilde numunedeki kayıp ise % 1.93 olarak bulundu.

Analit Adı		L-karnitin	
Matriks Adı		Aspir Yağı	
Ölçüm		Standart (50 µg/mL) Alan Değeri	Numune (50 µg/g) Alan Değeri
0. Saat	1.	2212.9	327244
	2.	2203.7	326014
	3.	2212.3	324999
	Ort.	2209.6	326086
24. Saat	1.	2170.0	323373
	2.	2166.0	321489
	3.	2166.5	326317
	Ort.	2167.5	323726
0. saat ile karşılaştırma (% Kayıp)		2.06	1.93

Tablo 37 : L-Karnitin yöntemi dayanıklılığı

3.3 Formülasyonun Kimyasal Stabilite Testinin Sonuçları

1.0 g aspir yağı, 250 mg 9c,11t-Konjuge Linoleik Asit, 250 mg 10t,12c-Konjuge Linoleik Asit ve 1000 mg L-karnitin içeren süspansiyonun 40 derecede, % 75 nem oranında ve ışık geçirmeyen bir ortamda yapılan kısa süreli kimyasal stabilite testi sonuçları aşağıda verilmiştir.

9c,11t-Konjuge Linoleik Asit miktarı 0.gün için yapılan analiz sonucunda 248.6 mg olarak belirlendi, ve % kayıp 3.ay sonunda 0.88, 6.ay sonunda ise 1.00 bulundu.

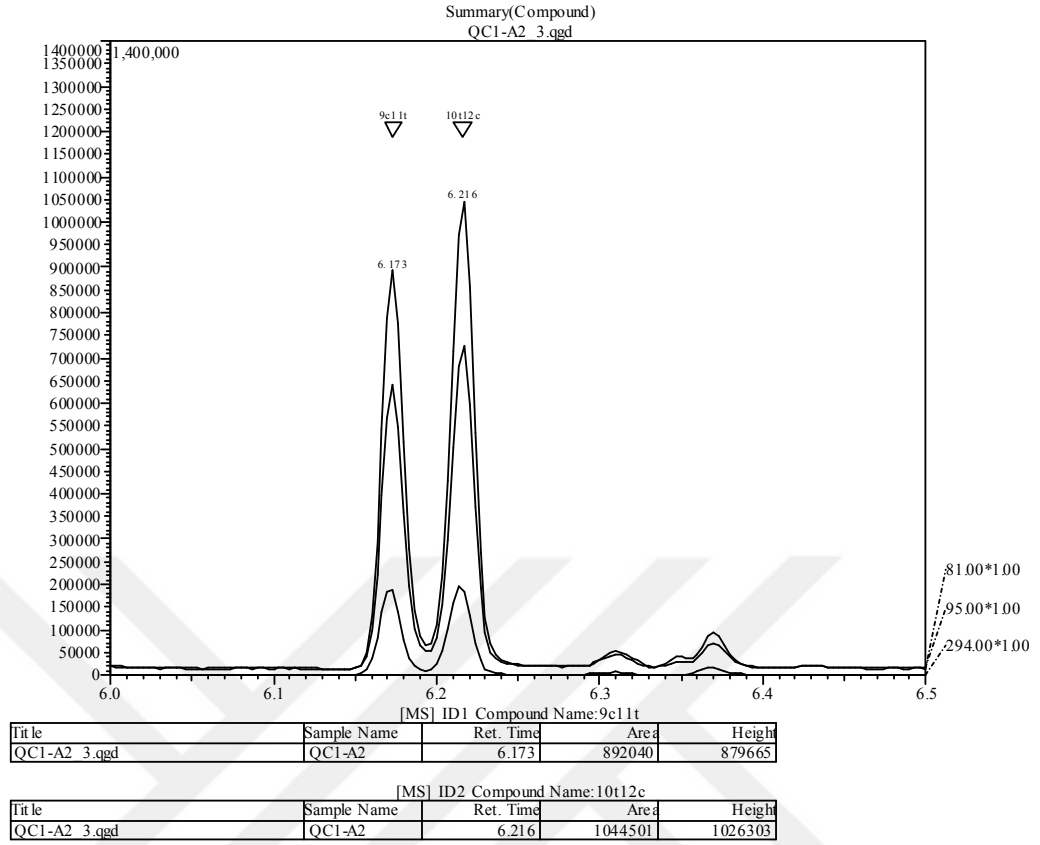
Süre	İçerik (mg)	Ortalama İçerik (mg)	% Kayıp
0.Gün	248.1	248.6	-
	250.0		
	247.8		
3.Ay	247.0	246.4	0.88
	245.8		
	246.6		
6.Ay	246.0	246.1	1.00
	246.1		
	246.2		

Tablo 38 : 9c,11t-Konjuge Linoleik Asidin kimyasal stabilite sonuçları

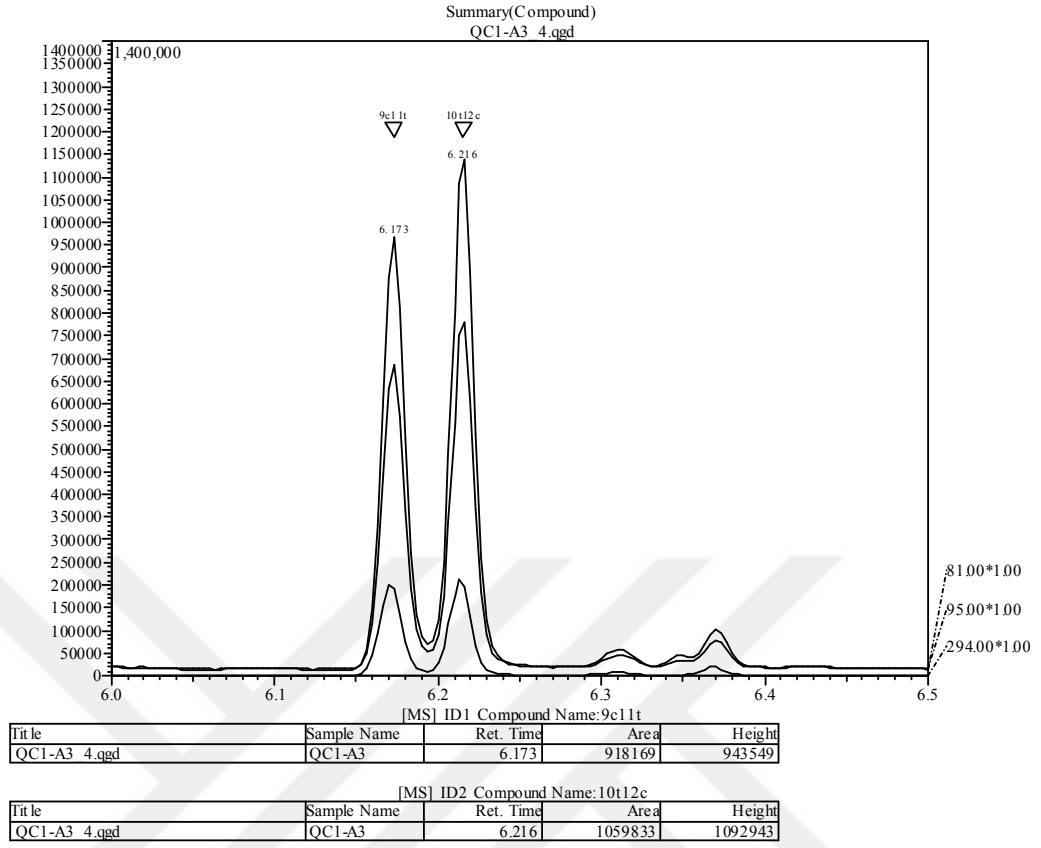
10t,12c -Konjuge Linoleik Asit miktarı 0.gün için yapılan analiz sonucunda 249.3 mg olarak belirlendi, ve % kayıp 3.ay sonunda 0.60, 6.ay sonunda ise 1.12 bulundu.

Süre	İçerik (mg)	Ortalama İçerik (mg)	% Kayıp
0.Gün	249.1	249.3	-
	250.0		
	248.8		
3.Ay	248.2	247.8	0.60
	247.1		
	248.1		
6.Ay	246.8	246.5	1.12
	246.7		
	246.0		

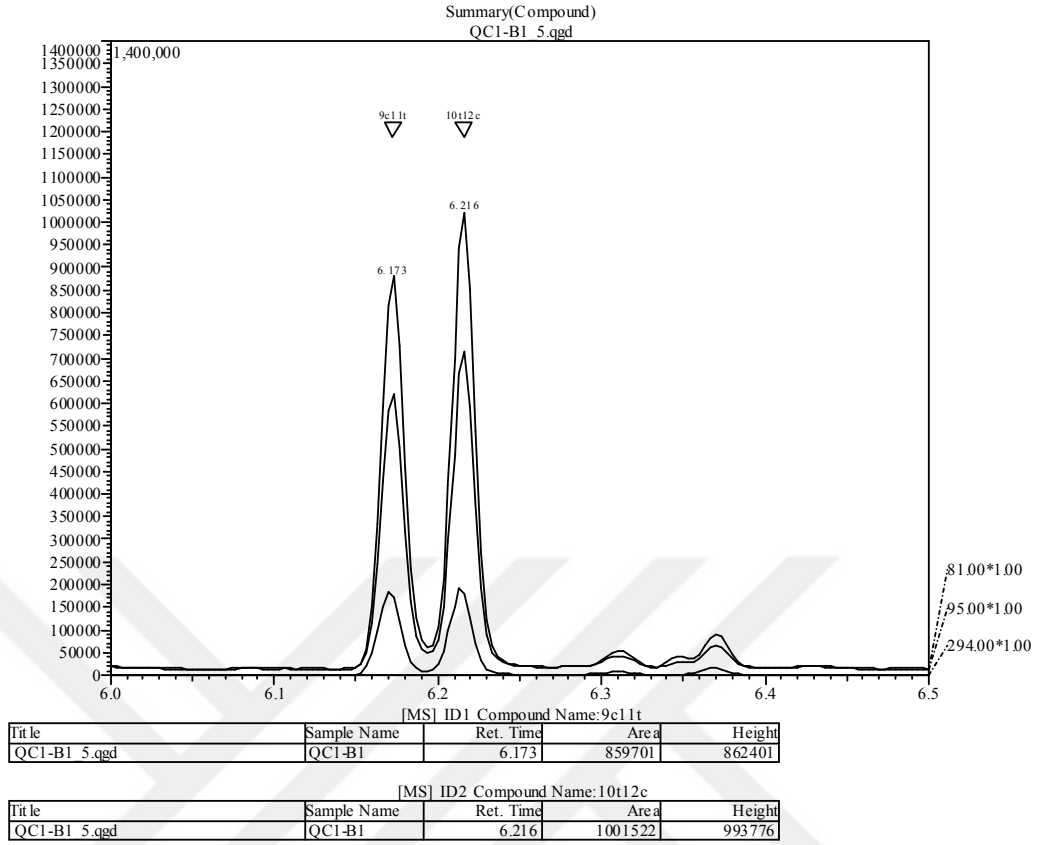
Tablo 39 : 10t,12c-Konjuge Linoleik Asidin kimyasal stabilite sonuçları



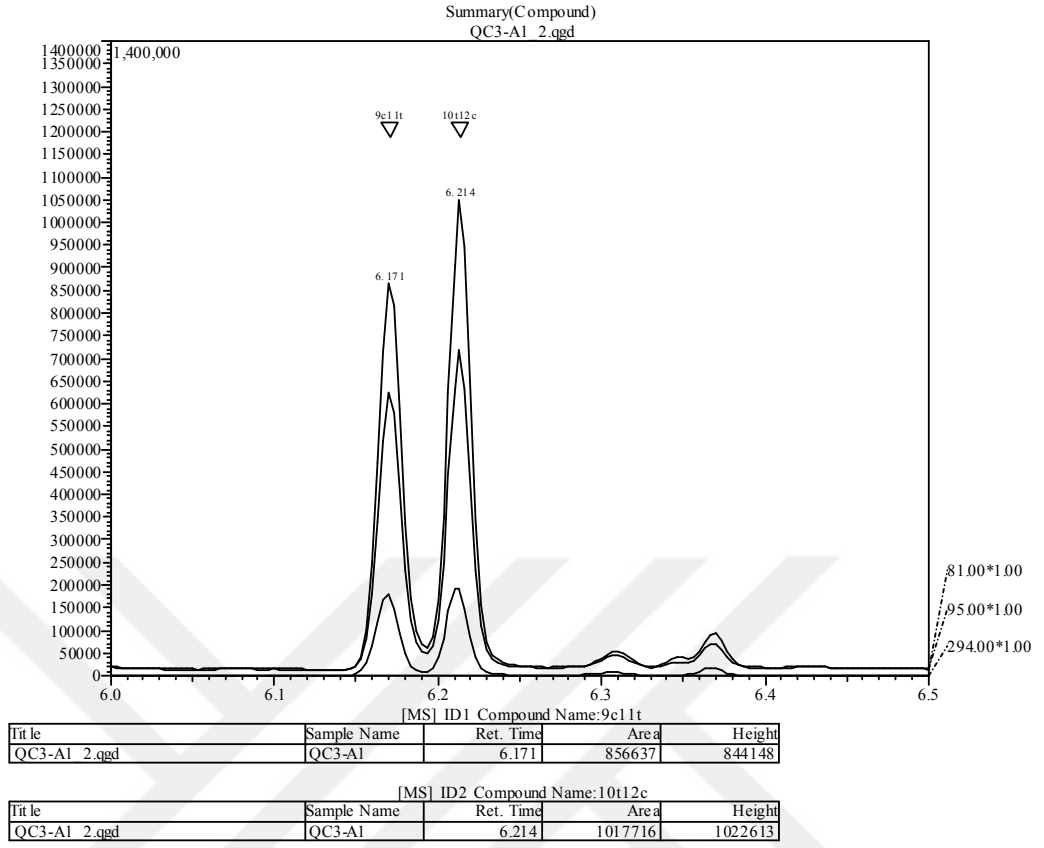
Şekil 35 : 9c,11t- ve 10t,12c- Konjuge Linoleik Asidin 0. gün kimyasal stabilite testinin 1. paralel çalışması için $m/z=81$, $m/z=95$ ve $m/z=294$ iyonlarına ait GC-MS kromatogramları.



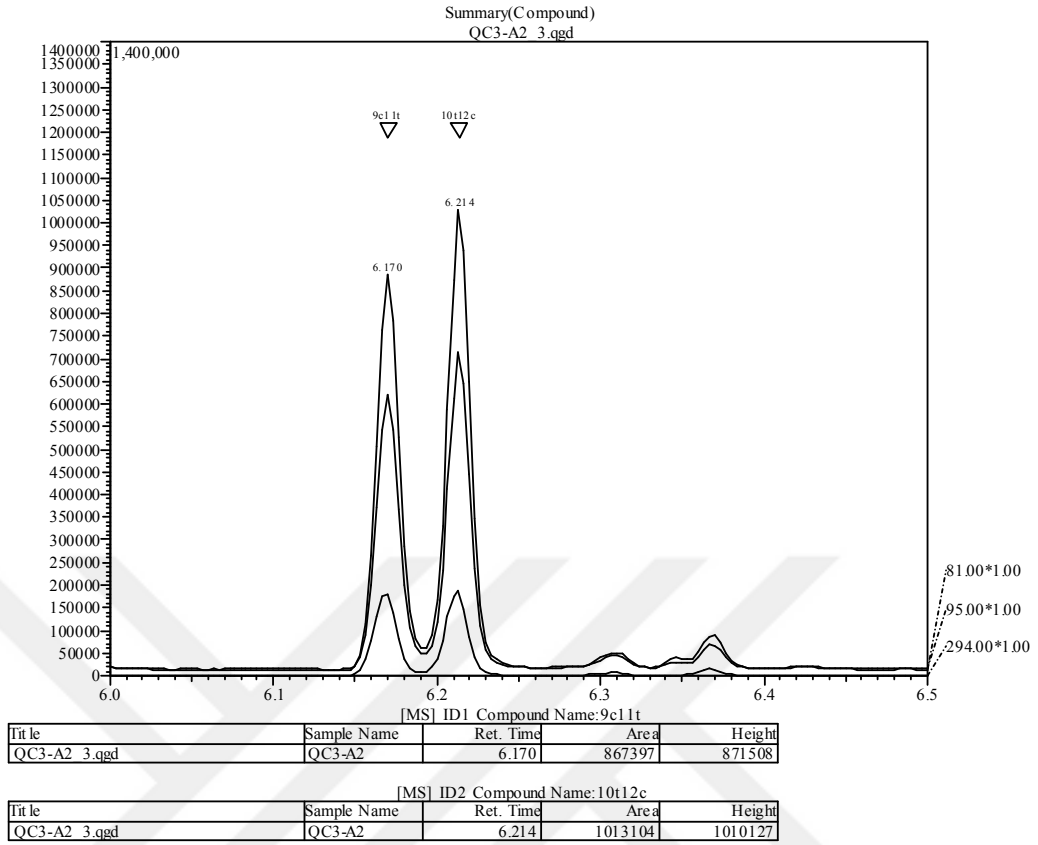
Şekil 36 : 9c,11t- ve 10t,12c- Konjuge Linoleik Asidin 0. gün kimyasal stabilite testinin 2. paralel çalışması için $m/z=81$, $m/z=95$ ve $m/z=294$ iyonlarına ait GC-MS kromatogramları.



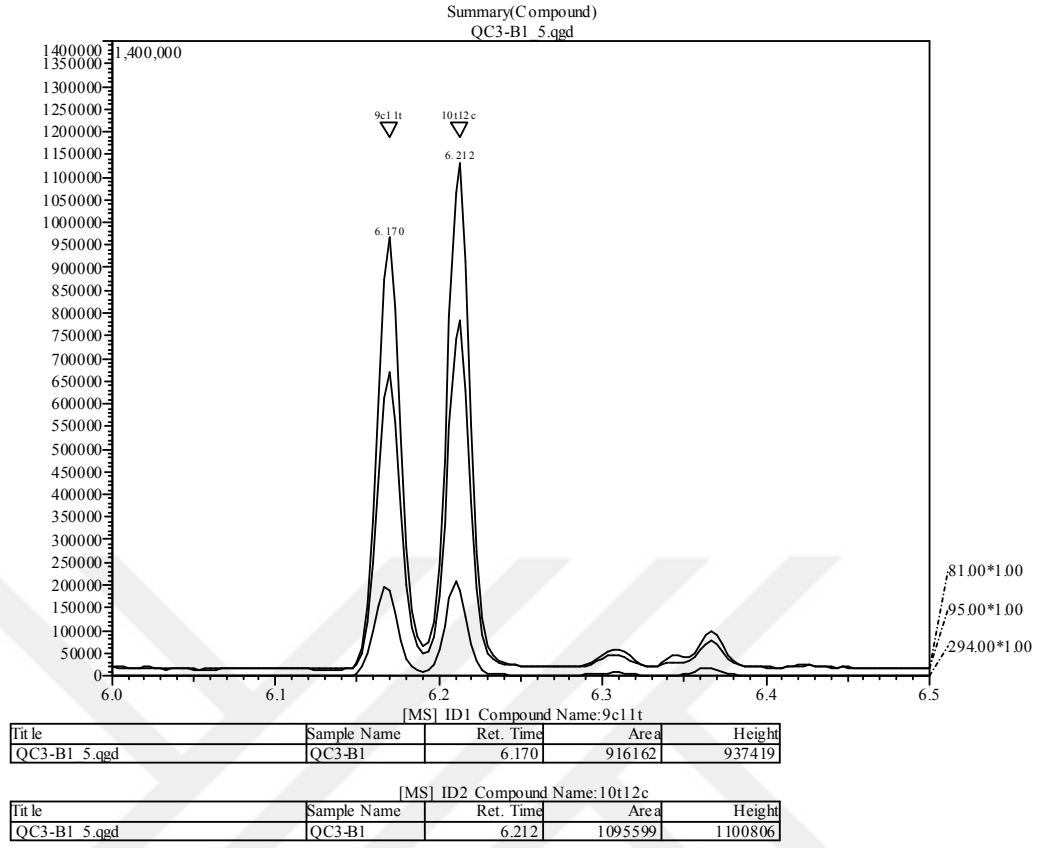
Şekil 37 : 9c,11t- ve 10t,12c- Konjuge Linoleik Asidin 0. gün kimyasal stabilite testinin 3. paralel çalışması için $m/z=81$, $m/z=95$ ve $m/z=294$ iyonlarına ait GC-MS kromatogramları.



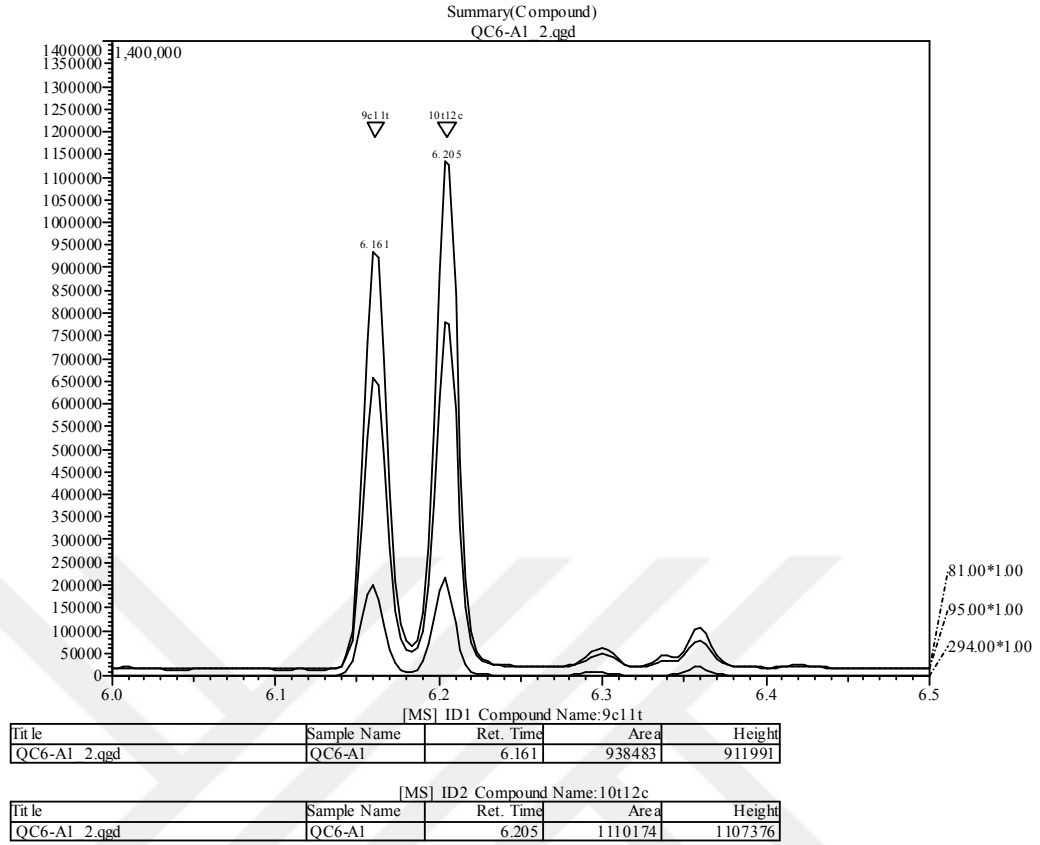
Şekil 38 : 9c,11t- ve 10t,12c- Konjuge Linoleik Asidin 3. ay kimyasal stabilite testinin 1. paralel çalışması için $m/z=81$, $m/z=95$ ve $m/z=294$ iyonlarına ait GC-MS kromatogramları.



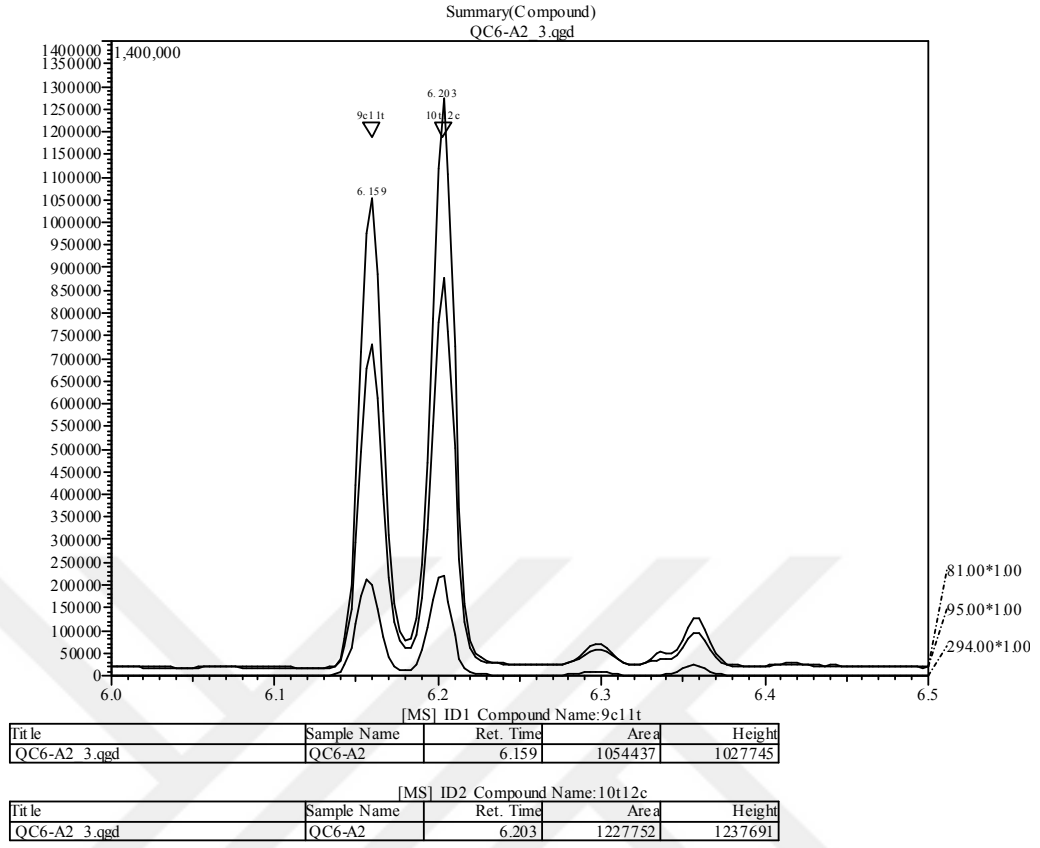
Şekil 39 : 9c,11t- ve 10t,12c- Konjuge Linoleik Asidin 3. ay kimyasal stabilite testinin 2. paralel çalışması için $m/z=81$, $m/z=95$ ve $m/z=294$ iyonlarına ait GC-MS kromatogramları.



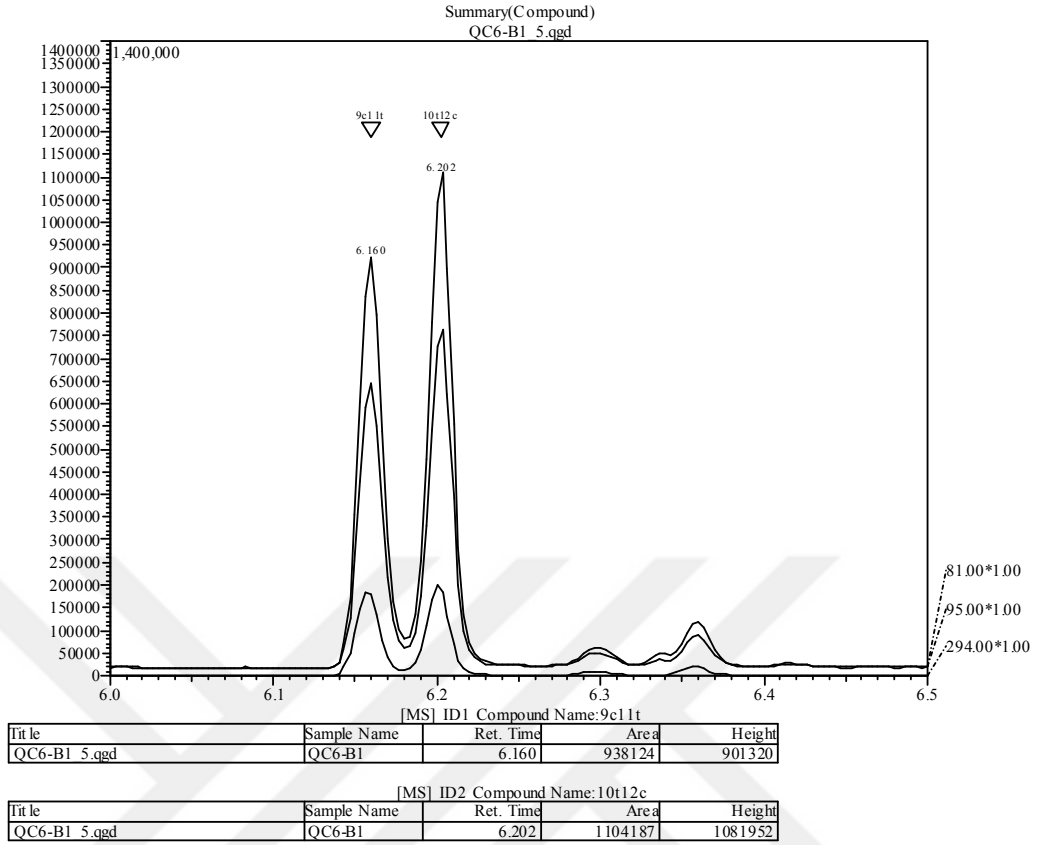
Şekil 40 : 9c,11t- ve 10t,12c- Konjuge Linoleik Asidin 3. ay kimyasal stabilite testinin 3. paralel çalışması için $m/z=81$, $m/z=95$ ve $m/z=294$ iyonlarına ait GC-MS kromatogramları.



Şekil 41 : 9c,11t- ve 10t,12c- Konjuge Linoleik Asidin 6. ay kimyasal stabilite testinin 1. paralel çalışması için $m/z=81$, $m/z=95$ ve $m/z=294$ iyonlarına ait GC-MS kromatogramları.



Şekil 42 : 9c,11t- ve 10t,12c- Konjuge Linoleik Asidin 6. ay kimyasal stabilite testinin 2. paralel çalışması için $m/z=81$, $m/z=95$ ve $m/z=294$ iyonlarına ait GC-MS kromatogramları.

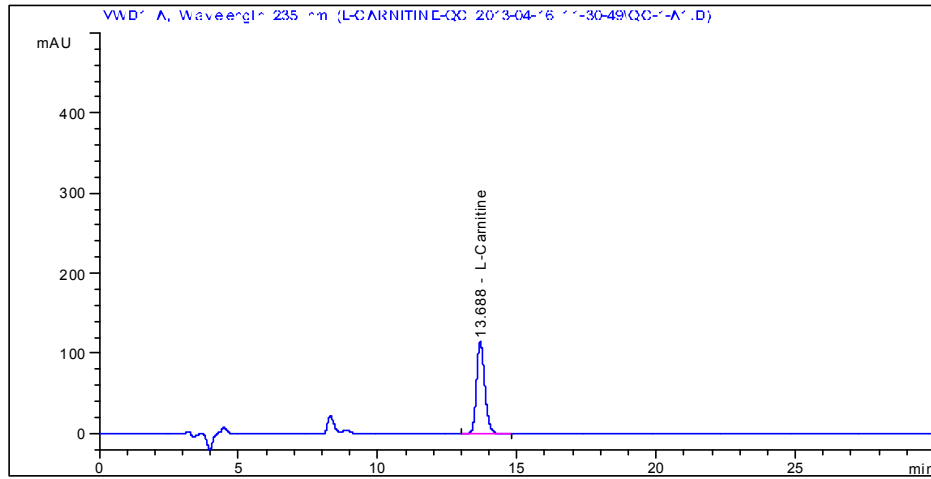


Şekil 43 : 9c,11t- ve 10t,12c- Konjuge Linoleik Asidin 6. ay kimyasal stabilite testinin 3. paralel çalışması için $m/z=81$, $m/z=95$ ve $m/z=294$ iyonlarına ait GC-MS kromatogramları.

L-karnitin miktarı, 0.gün için yapılan analiz sonucunda 997.1 mg olarak belirlendi, % kayıp 3.ay sonunda 0.85, 6.ay sonunda ise 1.22 bulundu.

Süre	İçerik (mg)	Ortalama İçerik (mg)	% Kayıp
0.Gün	996.1	997.1	-
	997.2		
	998.0		
3.Ay	995.0	995.0	0.85
	995.1		
	994.8		
6.Ay	994.1	994.1	1.22
	994.0		
	994.1		

Tablo 40 : L-Karnitinin kimyasal stabilite sonuçları



```

=====
                        Area Percent Report
=====
Sorted By           :      Signal
Calib. Data Modified :      4/25/2013 10:55:56 AM
Multiplier:         :      1.0000
Dilution:           :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

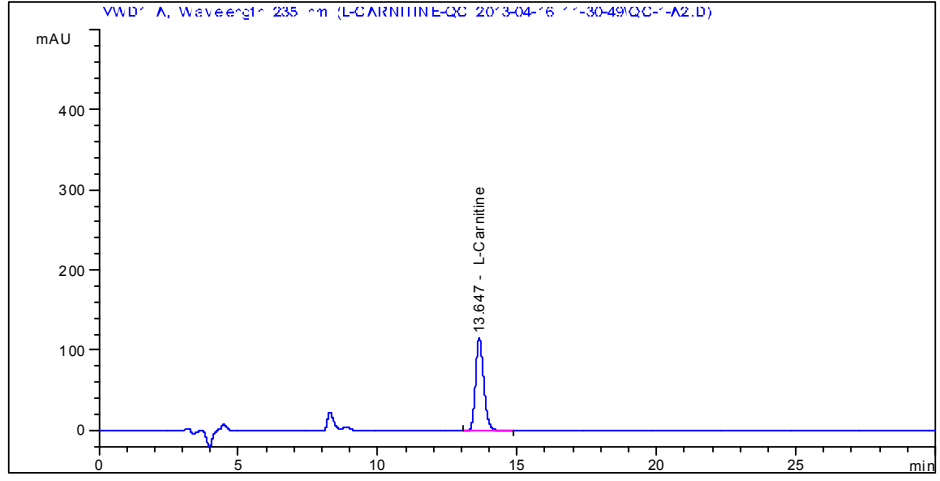
Signal 1: VWD1 A, Wavelength=235 nm

Peak RetTime  Type  Width  Area  Area  Name
#    [min]      [min] mAU   *s    %
-----|-----|-----|-----|-----|-----
1   13.688 BV    0.3124 2330.52515 100.0000 L-Carnitine

Totals :                               2330.52515

```

Şekil 44 : L-Karnitinin 0. gün kimyasal stabilite testinin 1. paralel çalışması için HPLC-UV cihazının 235 nm dalgaboyundaki kromatogramı.



```

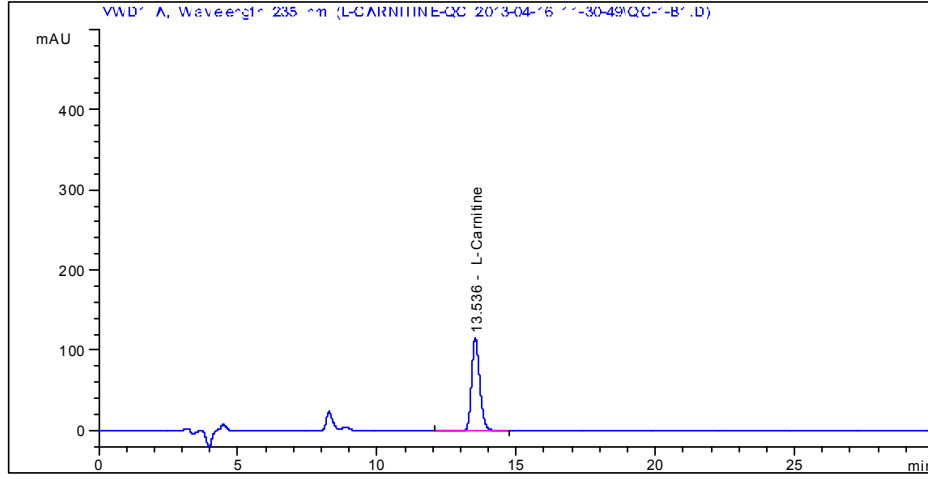
=====
                          Area Percent Report
=====
Sorted By      :      Signal
Calib. Data Modified :    4/25/2013 10:55:56 AM
Multiplier:      :      1.0000
Dilution:        :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=235 nm

Peak RetTime Type Width Area Area Name
# [min] [min] mAU *s %
-----|-----|-----|-----|-----|-----
1 13.647 BV 0.3120 2327.58228 100.0000 L-Carnitine

Totals : 2327.58228
  
```

Şekil 45 : L-Karnitinin 0. gün kimyasal stabilite testinin 2. paralel çalışması için HPLC-UV cihazının 235 nm dalgaboyundaki kromatogramı.



```

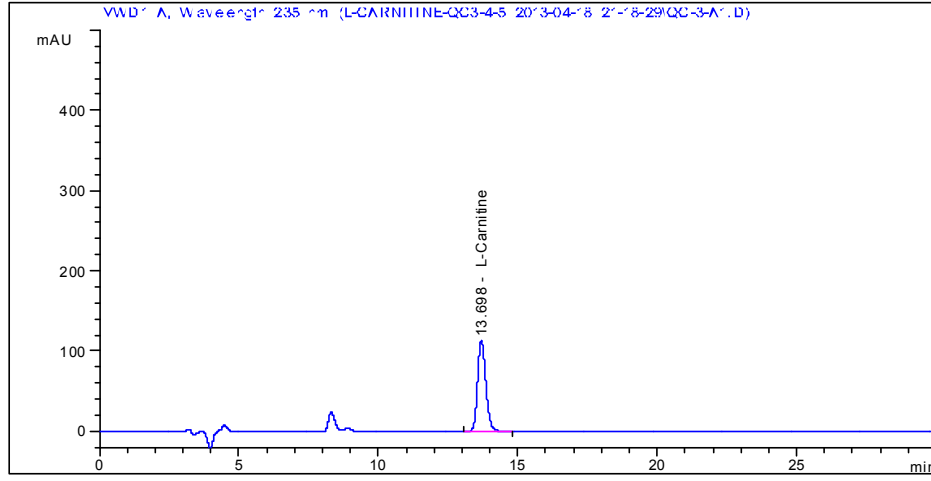
=====
                          Area Percent Report
=====
Sorted By      :      Signal
Calib. Data Modified :    4/25/2013 10:55:56 AM
Multiplier:      :      1.0000
Dilution:        :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=235 nm

Peak RetTime  Type   Width   Area      Area   Name
#    [min]      [min]  mAU    *s      %
-----|-----|-----|-----|-----|-----
1    13.536 BV    0.3099 2320.55396 100.0000 L-Carnitine

Totals :                          2320.55396
  
```

Şekil 46 : L-Karnitinin 0. gün kimyasal stabilite testinin 3. paralel çalışması için HPLC-UV cihazının 235 nm dalgaboyundaki kromatogramı.



```

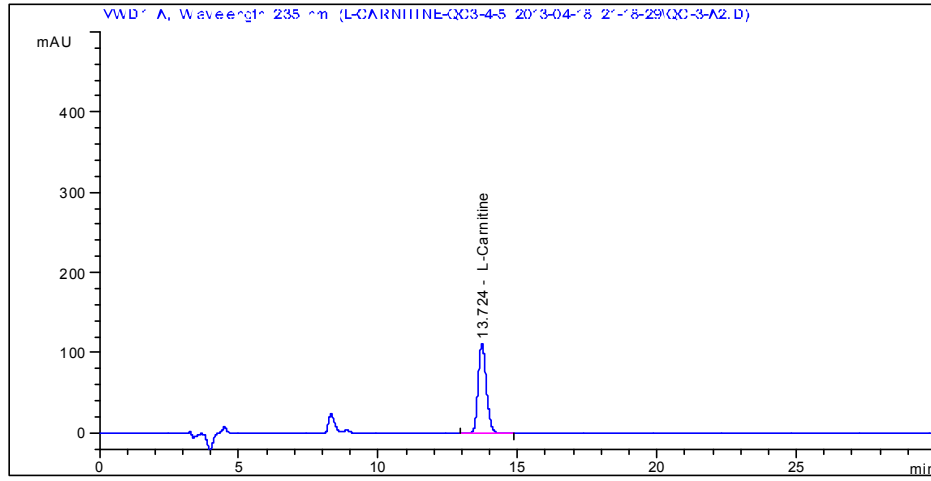
=====
                          Area Percent Report
=====
Sorted By      :      Signal
Calib. Data Modified :    4/25/2013 10:55:56 AM
Multiplier:      :      1.0000
Dilution:        :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=235 nm

Peak RetTime  Type  Width  Area  Area  Name
#    [min]      [min]  mAU   *s    %
-----|-----|-----|-----|-----|-----
1  13.698 BV    0.3123 2294.37183 100.0000 L-Carnitine

Totals :                               2294.37183
  
```

Şekil 47 : L-Karnitinin 3. ay kimyasal stabilite testinin 1. paralel çalışması için HPLC-UV cihazının 235 nm dalgaboyundaki kromatogramı.



```

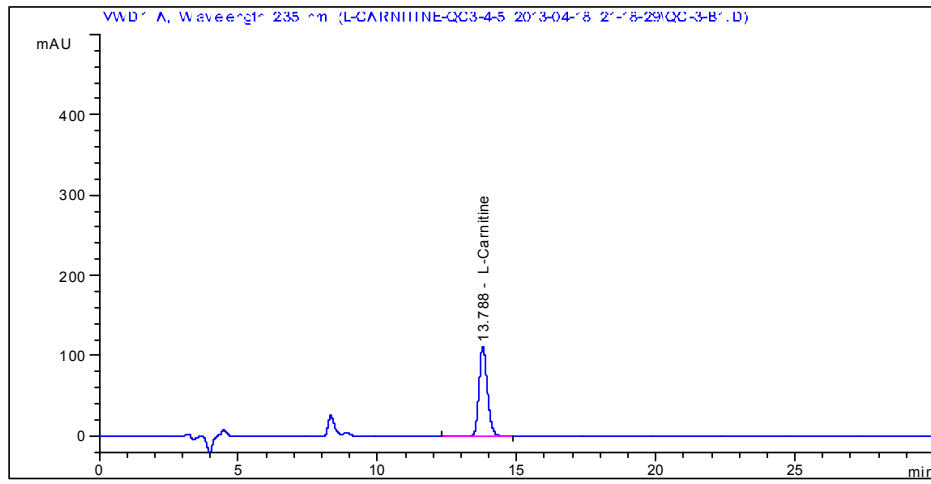
=====
                          Area Percent Report
=====
Sorted By      :      Signal
Calib. Data Modified : 4/25/2013 10:55:56 AM
Multiplier:      :      1.0000
Dilution:        :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=235 nm

Peak RetTime  Type  Width  Area  Area  Name
#    [min]    [min] mAU   *s    %
-----|-----|-----|-----|-----|-----
1  13.724 BV    0.3132 2295.27808 100.0000 L-Carnitine

Totals :                               2295.27808
  
```

Şekil 48 : L-Karnitinin 3. ay kimyasal stabilite testinin 2. paralel çalışması için HPLC-UV cihazının 235 nm dalgaboyundaki kromatogramı.



```

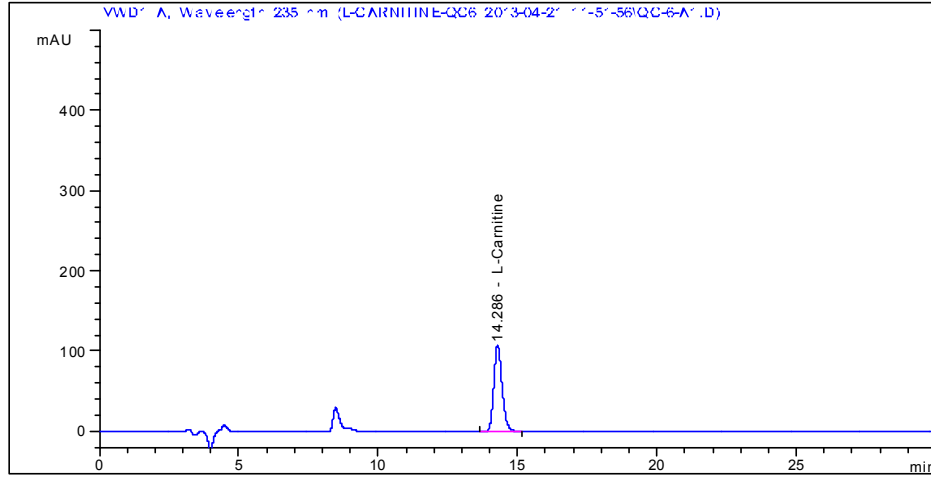
=====
                        Area Percent Report
=====
Sorted By      :      Signal
Calib. Data Modified : 4/25/2013 10:55:56 AM
Multiplier:      :      1.0000
Dilution:        :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=235 nm

Peak RetTime  Type  Width  Area  Area  Name
#    [min]      [min]  mAU   *s    %
-----|-----|-----|-----|-----|-----
1   13.788 BV    0.3146 2290.47363 100.0000 L-Carnitine

Totals :                               2290.47363
  
```

Şekil 49 : L-Karnitinin 3. ay kimyasal stabilite testinin 3. paralel çalışması için HPLC-UV cihazının 235 nm dalgaboyundaki kromatogramı.



```

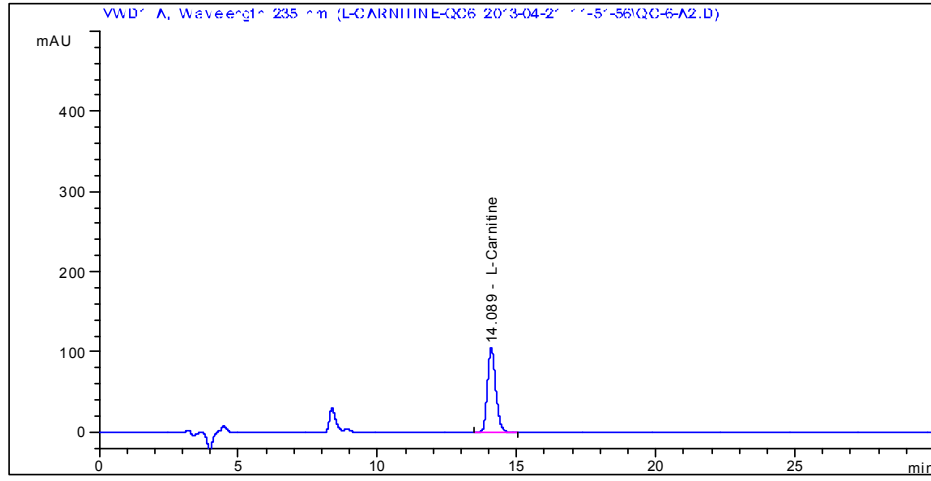
=====
                          Area Percent Report
=====
Sorted By      :      Signal
Calib. Data Modified :    4/26/2013 9:58:08 AM
Multiplier:      :      1.0000
Dilution:        :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=235 nm

Peak RetTime  Type  Width  Area  Area  Name
#    [min]      [min] mAU   *s    %
-----|-----|-----|-----|-----|-----
1  14.286 BV    0.3170 2203.62549 100.0000 L-Carnitine

Totals :                               2203.62549
  
```

Şekil 50 : L-Karnitinin 6. ay kimyasal stabilite testinin 1. paralel çalışması için HPLC-UV cihazının 235 nm dalgaboyundaki kromatogramı.



```

=====
                          Area Percent Report
=====
Sorted By      :      Signal
Calib. Data Modified :    4/26/2013 9:58:08 AM
Multiplier:      :      1.0000
Dilution:        :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

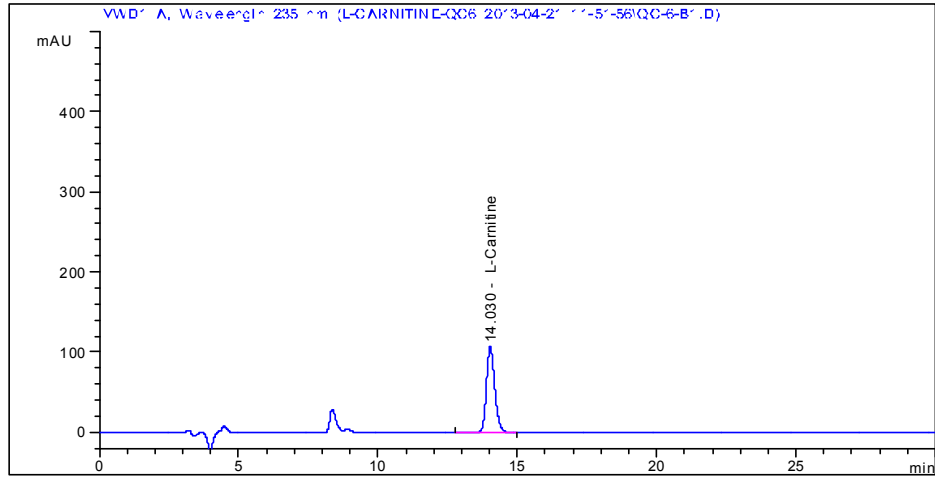
Signal 1: VWD1 A, Wavelength=235 nm

Peak RetTime  Type  Width  Area  Area  Name
#    [min]    [min] mAU   *s    %
-----|-----|-----|-----|-----|-----
1  14.089 BV    0.3222 2200.23071 100.0000 L-Carnitine

Totals :                               2200.23071

```

Şekil 51 : L-Karnitinin 6. ay kimyasal stabilite testinin 2. paralel çalışması için HPLC-UV cihazının 235 nm dalgaboyundaki kromatogramı.



```

=====
                        Area Percent Report
=====
Sorted By      :      Signal
Calib. Data Modified : 4/26/2013 9:58:08 AM
Multiplier:      :      1.0000
Dilution:        :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=235 nm

Peak RetTime  Type  Width  Area  Area  Name
#    [min]    [min] mAU   *s    %
-----|-----|-----|-----|-----|-----
1  14.030 BV    0.3199 2221.96753 100.0000 L-Carnitine

Totals :                               2221.96753

```

Şekil 52 : L-Karnitinin 6. ay kimyasal stabilite testinin 3. paralel çalışması için HPLC-UV cihazının 235 nm dalgaboyundaki kromatogramı.

3.4 Formülasyonun Fiziksel Stabilite Testlerinin Sonuçları

Hazırlanan formülasyonun fiziksel stabilite testlerine ilişkin sonuçlar Tablo 39’da verilmiştir. Ürünün 0., 3., ve 6. aylardaki zeta potansiyeli sırasıyla 0.0499 mV, 0.0509 mV ve 0.0489 mV; partikül boyutu sırasıyla 371 µm, 375 µm ve 373 µm; viskozitesi sırasıyla 6.53 Poise, 6.45 Poise ve 6.40 Poise; sedimentasyon hacmi ise sırasıyla 0.52, 0.53 ve 0.52 olarak bulundu. Ayrıca formülasyonun 0., 3., ve 6. aylardaki görünüş, renk, koku ve tat bir farklanma tespit edilmedi.

Analizler	Sonuç 0.Gün	Sonuç 3.Ay	Sonuç 6.Ay
Zeta Potansiyel	0.0499 mV	0.0509 mV	0.0489 mV
Partikül Boyutu	371 µm	375 µm	373 µm
Viskozite	6.53 Poise	6.45 Poise	6.40 Poise
Sedimentasyon Hacmi	0.52	0.53	0.52
Görünüş	Değişiklik yok	Değişiklik yok	Değişiklik yok
Renk	Kırmızı : 1.2 Sarı: 40 Mavi : 0.0 Nötr : 0.1	Kırmızı : 1.2 Sarı: 40 Mavi : 0.0 Nötr : 0.1	Kırmızı : 1.2 Sarı: 40 Mavi : 0.0 Nötr : 0.1
Koku	Değişiklik yok	Değişiklik yok	Değişiklik yok
Tat	Değişiklik yok	Değişiklik yok	Değişiklik yok

Tablo 41 : Son ürünün fiziksel stabilite sonuçları

3.5 Son Ürüne İlişkin Mikrobiyolojik Testlerin Sonuçları

Hazırlanan formülasyonun mikrobiyolojik testlerine ilişkin sonuçlar Tablo 40’da verilmiştir. Üründe 0., 3., ve 6. aylardaki aerobik mezofilik bakteri sayımı < 100 kob/g ve küf-maya sayımı < 10 kob/g olarak bulunurken *Escherichia coli* tespit edilmedi.

Analizler	Sonuç (kob/g) 0.Gün	Sonuç (kob/g) 3.Ay	Sonuç (kob/g) 6.Ay
Aerobik Mezofilik Bakteri Sayımı	< 100	< 100	< 100
<i>Escherichia coli</i> Sayımı	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi
Küf-Maya Sayımı	< 10	< 10	< 10

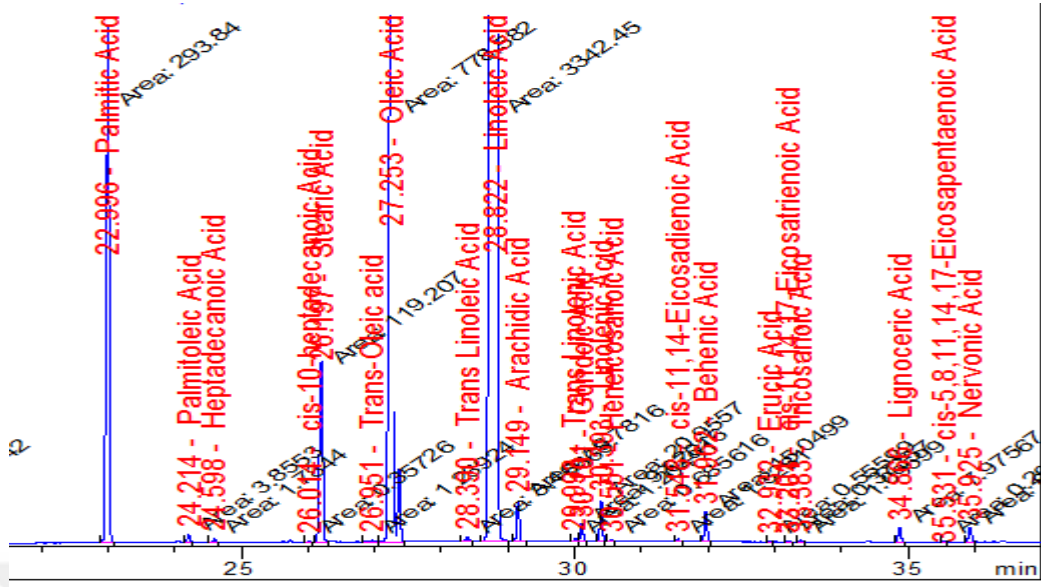
Tablo 42 : Son ürünün mikrobiyolojik testlerinin sonuçları

3.6 Hazırlanan Formülasyonun Yağ Asitleri Kompozisyonu Sonuçları

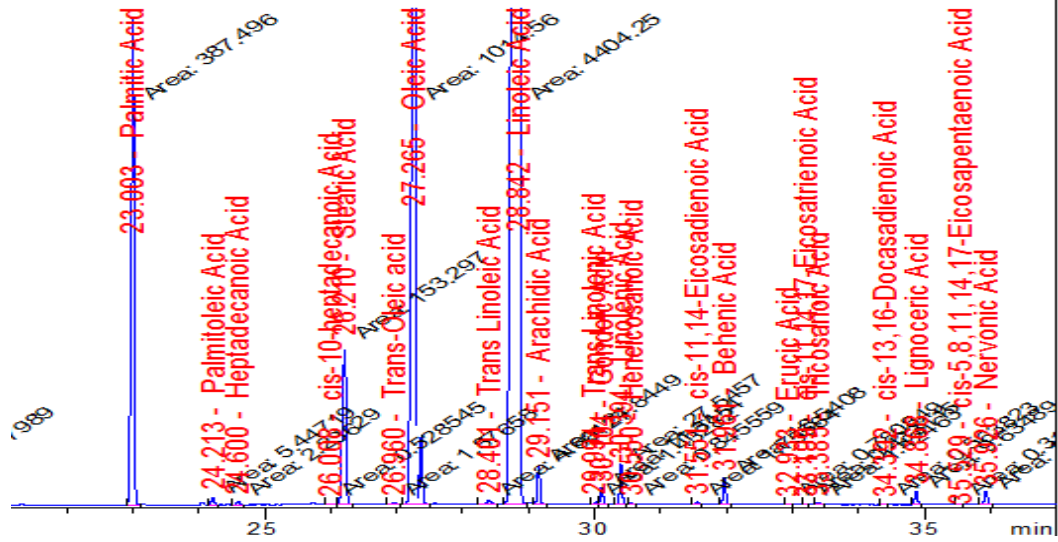
Hazırlanan formülasyonun 0., 3., ve 6. aylardaki yağ asitleri kompozisyonuna ilişkin sonuçlar tablo 43' de verilmiştir.

Yağ Asitleri Kompozisyonu	% Alan Değerleri 0. Gün	% Alan Değerleri 3. Ay	% Alan Değerleri 6. Ay	% RSD
Myristic Acid	0.122	0.123	0.120	1.3
Pentadecanoic Acid	0.013	0.010	0.012	13.1
Palmitic Acid	6.564	6.560	6.560	0.0
Palmitoleic Acid	0.088	0.089	0.089	0.7
Heptadecanoic Acid	0.036	0.034	0.035	2.9
Stearic Acid	2.337	2.334	2.334	0.1
Oleic Acid	15.348	15.340	15.346	0.0
Linoleic Acid	74.211	74.210	74.210	0.0
Arachidic Acid	0.376	0.374	0.375	0.3
Trans-Linolenic Acid	0.008	0.005	0.006	24.1
Gondoic Acid	0.165	0.163	0.164	0.6
Linolenic Acid	0.115	0.114	0.113	0.9
Heneicosanoic Acid	0.003	0.002	0.002	24.7
Cis-11,14-Eicosadienoic Acid	0.024	0.022	0.025	6.5
Behenic Acid	0.250	0.258	0.255	1.6
Erucic Acid	0.017	0.014	0.013	14.2
Cis-11,14,17 Eicosatrienoic Acid	0.017	0.015	0.016	6.3
Arachidonic Acid	0.004	0.005	0.004	13.3
Cis-13,16-Docosadienoic Acid	0.008	0.008	0.007	7.5
Lignoceric Acid	0.128	0.125	0.127	1.2
Nervonic Acid	0.137	0.136	0.140	1.5
Cis-4,7,10,13,16,19docasahexaenoic Acid	0.019	0.018	0.020	5.3

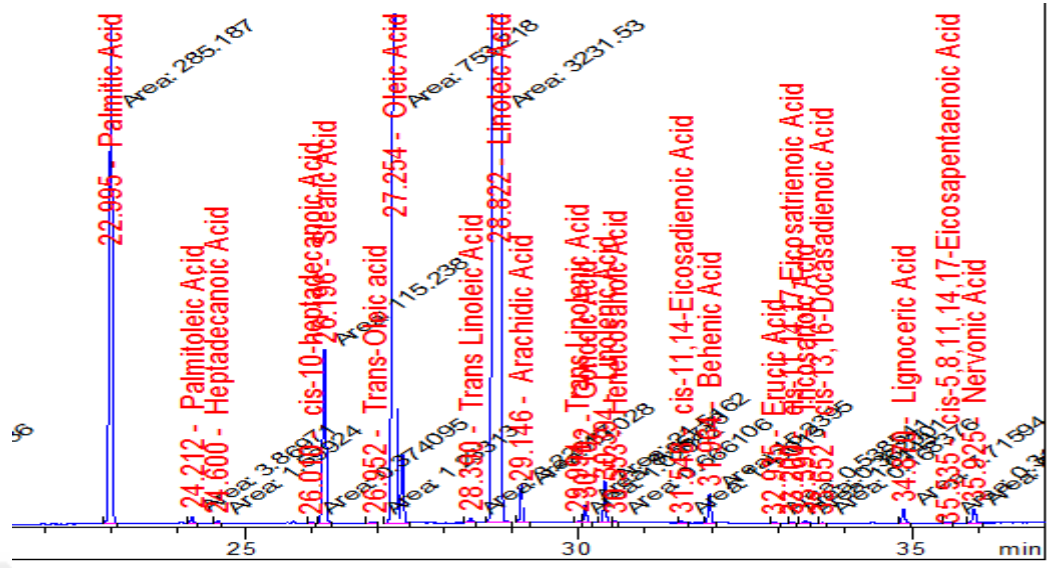
Tablo 43 : Hazırlanan formülasyonun 0., 3., ve 6. aylardaki yağ asitleri kompozisyonunun sonuçları



Şekil 53 : Hazırlanan formülasyonun 0. Gün yağ asitleri kompozisyonuna ilişkin kromatogram



Şekil 54 : Hazırlanan formülasyonun 3. Ay yağ asitleri kompozisyonuna ilişkin kromatogram



Şekil 55 : Hazırlanan formülasyonun 6. Ay yağ asitleri kompozisyonuna ilişkin kromatogram

BÖLÜM IV

4 TARTIŞMA

Kalite kontrol analizleri için yapılan analitik metot validasyonunda, doğrusallık, enjeksiyon tekrarlanabilirliği, ekstraksiyon tekrarlanabilirliği ve geri kazanım, seçicilik, seçimlilik, belirtme-tayin sınırları ve yöntem dayanıklılığı kriterleri incelenerek elde edilen sonuçlar CDER (The Center for Drug Evaluation and Research - İlaç Değerlendirme ve Araştırma Merkezi) normlarına göre değerlendirildi (56).

Doğrusallık kriteri için hesaplanan 9c,11t ve 10t,12c-Konjuge Linoleik Asidin regrasyon katsayıları her iki analit için de 0.9996 bulundu. Bu değerler en düşük limit değer olan 0.95'den büyük olduğundan kabul edilebilir bir sonuçlardır. Enjeksiyon tekrarlanabilirliği için 9c,11t-Konjuge Linoleik Asit ve 10t,12c- Konjuge Linoleik Asit etkin maddelerine ilişkin % RSD değerleri sırasıyla 0.76 ve 0.50 bulundu. Bu değerler limit değer olan % 2 'den düşüktür. Bu nedenle kullanılan GC-MS cihazının tekrarlanabilirliği istenilen kriteri karşılamaktadır. Analitik validasyonda önemli bir kriter olan ekstraksiyon tekrarlanabilirliği ve geri kazanım için elde edilen sonuçlarda, 9c,11t-Konjuge Linoleik Asidin ortalama geri kazanım değeri 25 µg/g için % 93.85, 50 µg/g için % 99.09 ve 100 µg/g için % 93.77 bulundu. 10t,12c-Konjuge Linoleik Asidin ise ortalama geri kazanım değeri 25 µg/g için % 91.43, 50 µg/g için % 99.66 ve 100 µg/g için % 93.25 bulundu. Elde edilen bu değerlerin, limit değerler olan %70-%120 sınırları arasındadır. 9c,11t-Konjuge Linoleik Asidin %RSD değeri 25 µg/g için 0.83, 50 µg/g için 0.75 ve 100 µg/g için 0.37 bulundu. 10t,12c-Konjuge Linoleik Asidin ise %RSD değeri 25 µg/g için 0.30, 50 µg/g için 0.31 ve 100 µg/g için 0.76 bulundu. Görüleceği üzere yine aynı kritere ilişkin % RSD değerleri % 10'dan küçüktür. Seçicilik kriteri için yapılan çalışma sonucu ise 9c,11t ve 10t,12c-Konjuge Linoleik Asit standartları ile kör numune cihaza aynı şartlar altında ve aynı metotla verildi, etken madde ile aynı alıkonma zamanında ve aynı m/z oranında pik gözlenmedi. Seçimlilik kriteri için hesaplanan resolüsyon miktarları, 9c,11t ve 10t,12c-Konjuge Linoleik Asit için sırasıyla 7.88 ve 1.43 bulundu. Bu değerler en düşük limit olan 1.25'den büyük çıkmış ve istenilen değeri sağlamıştır. Belirtme ve tayin sınırları ile yöntemin güvenle ölçebileceği en düşük miktarlar belirlendi. 9c,11t ve 10t,12c-Konjuge Linoleik Asidin her ikisi için tayin sınırı 8.0 µg/mL bulundu. Yöntem dayanıklılığında ise standart olarak

hazırlanan 9c,11t ve 10t,12c-Konjuge Linoleik Asit için % kayıp değerleri sırasıyla % 5.39 ve % 4.11 bulundu. Ayrıca numune içindeki 9c,11t ve 10t,12c-Konjuge Linoleik Asit için % kayıp değerleri sırasıyla % 1.44 ve % 0.72 bulundu. Özellikle standart bileşiminde görülen bu kayıp , kromatografik analiz öncesi yapılan ekstraksiyon ve türevlendirme sonucu elde edilen analize hazır numune ve standartların mümkün olduğunca çabuk bir şekilde cihaza verilmesi gerektiğini göstermektedir. En fazla 24 saat süre bekletilen numune ve standartlar için bu % kayıp değerleri düzeltme faktörü olarak kullanılabilir.

Doğrusallık kriteri için hesaplanan L-Karnitinin regresyon katsayısı her iki analit için de 1 bulundu. Bu değerler en düşük limit değer olan 0.95'den büyük olduğundan kabul edilebilir bir sonuçlardır. Enjeksiyon tekrarlanabilirliği için L-Karnitin etkin maddesine ilişkin % RSD değeri 0.76 bulundu. Bu değerler limit değer olan % 2 'den düşüktür. Bu nedenle kullanılan HPLC-FLD cihazının tekrarlanabilirliği istenilen kriteri karşılamaktadır. Ekstraksiyon tekrarlanabilirliği ve geri kazanım için elde edilen sonuçlarda, L-karnitin için ortalama geri kazanım değeri 150 µg/g için % 96.80, 300 µg/g için % 97.32 ve 750 µg/g için % 101.22 bulundu. L-Karnitinin %RSD değeri 150 µg/g için 0.24 , 300 µg/g için 0.13 ve 750 µg/g için 0.22 bulundu. Görüleceği üzere yine aynı kritere ilişkin % RSD değerleri % 10'dan küçüktür. Seçicilik kriteri için yapılan çalışma ile L-karnitin standardı ve kör numune cihaza aynı şartlar altında ve aynı metot ile verildi ve etken madde ile aynı alıkonma zamanında pik gözlenmedi. Seçimlilik kriteri için hesaplanan çözünürlük miktarı, L-Karnitin için 9.94 bulundu. Bu değer en düşük limit olan 1.25'den büyük çıkmış ve istenilen sonucu sağlamıştır. Belirtme ve tayin sınırlarının belirlenmesi için yapılan analiz sonucu L-karnitin için tayin sınırı (LOQ) 0.5 µg/mL bulunmuştur. Yöntem dayanıklılığında ise standart olarak hazırlanan L-Karnitin için % kayıp değeri % 2.06 ve numune içindeki L-Karnitin için % kayıp değeri ise %1.93 bulundu. Standart ve numune bileşiminde görülen bu kayıp, kromatografik analiz öncesi yapılan ekstraksiyon ve türevlendirme sonucu elde edilen analize hazır numune ve standartların mümkün olduğunca çabuk bir şekilde cihaza verilmesi gerektiğini göstermektedir. En fazla 24 saat süre bekletilen numune ve standartlar için bu % kayıp değerleri düzeltme faktörü olarak kullanılabilir.

Formülasyon için yapılan 6 aylık kısa süreli kimyasal stabilite testi sonucunda hazırlanan formülasyonun içerdiği etkin madde miktarlarının en az 6 ay boyunca stabil kaldığı ispatlandı. Yapılan kimyasal stabilite ile 6. ay sonunda 9c,11t ve 10t,12c-Konjuge Linoleik Asit için % kayıp sırasıyla, % 1.00 ve % 1.12 bulundu. Ayrıca L-karnitin için % kayıp, % 1.22 olarak saptandı. Diğer bir deyişle elde edilen bu değerler CDER normlarına göre limit değer olan % 5 sınırının altında kalmıştır. Bu nedenle istenilen sonuca ulaşılmıştır.

Formülasyon için yapılan 6 aylık kısa süreli fiziksel stabilite testi sonucunda hazırlanan formülasyonun zeta potansiyeli, partikül boyutu, viskozitesi, sedimentasyon hacmi, görünüşü, rengi, kokusu ve tadında önemli bir değişim olmadığı görüldü.

Formülasyon için yapılan mikrobiyolojik testler sonucu aerobik mezofilik bakteri sayımı < 100 kob/g ve küf-maya sayımı < 10 kob/g olarak bulunurken *Escherichia coli* tespit edilemedi. Elde edilen sonuçlar Avrupa Farmakopesi'ndeki steril olmayan dozaj formları için mikrobiyolojik kabul kriterleri (aerobik mezofilik bakteri sayımı < 10⁵ kob/g, küf-maya sayımı < 10⁴ kob/g ve *Escherichia coli* = bulunmamalı) ile uyumludur (57).

Hazırlanan formülasyonun 0., 3., ve 6. aylardaki yağ asitleri kompozisyonunda önemli bir değişim olmadığı görüldü.

BÖLÜM V

5 SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan bu çalışma ile günümüz koşullarında hızla yaygınlaşan ve gitgide daha fazla önem arz eden konjuge linoleik asit ve L-karnitin'in alternatif bir formülasyonu hazırlanarak gerekli kalite kontrol testleri yapılmıştır. Yağ yakımını hızlandırıcı etkisi olduğu bilinen konjuge linoleik asit ve vücutta kas dokusunu arttıran L-karnitin aynı formülasyonda hazırlanmış olup, sektöre yenilikçi bir ürün fikri verilmesi amaçlanmıştır.

Sonuç olarak kalite kontrol analizleri ve stabilite testleri yapılan bu süspansiyon formunun piyasada ithal olarak bulunan konjuge linoleik asit ve L-karnitin içeren ürünlere alternatif olabileceği düşünülmektedir. İlerleyen dönemlerde aspir yağı içinde hazırlanan biyolojik olarak aktif olan konjuge linoleik asit izomerlerinin ve L-karnitin'in hayvan denemeleri yapılarak kas dokunun artmasına ve yağ dokunun azaltılmasına yönelik bir sinerjik etki görülüp görülmeyeceğinin araştırılması planlanmaktadır.

KAYNAKLAR

- 1- Aydın R. Conjugated Linoleic Acid: Chemical Structure, Sources and Biological Properties. Turk J Vet Anim Sci 2005;29:189-195.
- 2- Ercoşkun H, Uğuz Ş, Kıralan M. Konjuge Linoleik Asit. Gıda Mühendisliği Dergisi 2005;19:42-46.
- 3- Köknaroğlu H. Beslemenin Sığır Eti Konjuge Linoleik Asit Miktarına Etkisi. Hayvansal Üretim 2007;48(1):1-7.
- 4- Çelik L. Konjuge Linoleik Asidin Ruminatlarda Biyosentezi, Fizyoloji ve Lipid Metabolizması Üzerine Etkileri. Hayvansal Üretim 2006;47(1):1-7.
- 5- MacDonald HB. Conjugated Linoleic Acid and Disease Prevention: A Review of Current Knowledge. Journal of the American College of Nutrition 2000;19(2):111-118.
- 6- Kelly GS. Conjugated Linoleic Acid: A Review. Altern Med Rev 2001;6(4):367-382.
- 7- İnanç N. Konjuge Linoleik Asit: Obezitede Etkileri. Sağlık Bilimleri Dergisi (Journal of Health Sciences) 2006;15(2):137-141.
- 8- Bauman DE. Conjugated Linoleic Acid (CLA) and Milk Fat: A Good News Story. Proc Arizona Dairy Prod Conf Tempe AZ 2002;47-56.
- 9- Bauman DE, Baumgard LH, Corl BA, Griinari JM. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants. Proceedings of the American Society of Animal Science 1999;1-15.
- 10- Pariza MW, Park Y, Cook ME. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. Progress in Lipid Research 2001;40: 283–298.
- 11- de la Fuente MA, Luna P, Juarez M. Chromatographic techniques to determine conjugated linoleic acid isomers. Trends in Analytical Chemistry 2006;25(9):917-926.
- 12- EFSA (European Food Safety Authority) Scientific Opinion on the safety of “conjugated linoleic acid (CLA)-rich oil” (Tonalin TG 80) as a Novel Food ingredient. EFSA Journal 2010; 8(5):1600. Available from : www.efsa.europa.eu
- 13- Wahle KW, Heys SD, Rotondo D. Conjugated linoleic acids: are they beneficial or detrimental to health? Progress in Lipid Research 2004;43:553–587.
- 14- Kurban S, Mehmetoğlu İ. Konjuge Linoleik Asit Metabolizması ve Fizyolojik Etkileri. Türk Klinik Biyokimya Derg 2006;4(2):89-100.

- 15- Kemp MQ, Jeffy BD, Romagnolo DF. Conjugated linoleic acid inhibits cell proliferation through p53-dependent mechanism: effects on the expression of G1-restriction points in breast and colon cancer cells. *J Nutr* 2003;133:3670-7.
- 16- Eyjolfson V, Spriet LL, Dyck DJ. Conjugated linoleic acid improves insulin sensitivity in young, sedentary humans. *Med Sci Sports Exerc* 2004;36:814-20.
- 17- Tanaka K. Occurrence of conjugated linoleic acid in ruminant products and its physiological functions. *Animal Science Journal* 2005;76:291-303.
- 18- Blankson H, Stakkestad JA, Fagertun H, Thom E, Wadstein J, Gudmundsen O. Conjugated linoleic acid reduces body fat mass in overweight and obese humans. *J Nutr* 2000;130:2943-8.
- 19- Thom E, Wadstein J, Gudmundsen O. Conjugated linoleic acid reduces body fat in healthy exercising humans. *J Int Med Res* 2001;29:392-6.
- 20- Mougios V, Matsakas A, Petridou A, Ring S, Sagredos A, Melissopoulou A, et al. Effect of supplementation with conjugated linoleic acid on human serum lipids and body fat. *J Nutr Biochem* 2001;12:585-94.
- 21- Gaullier JM, Halse J, Høy K, Kristiansen K, Fagertun H, Vik H, et al. Conjugated linoleic acid supplementation for 1 y reduces body fat mass in healthy overweight humans. *Am J Clin Nutr*. 2004;79:1118-25.
- 22- Riserus U, Berglund L, Vessby B. Conjugated linoleic acid (CLA) reduced abdominal adipose tissue in obese middle-aged men with signs of the metabolic syndrome: a randomised controlled trial. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001;25:1129-35.
- 23- Bhattacharya A, Rahman MM, Sun D, Lawrence R, Mejia W, McCarter R, et al. The combination of dietary conjugated linoleic acid and treadmill exercise lowers gain in body fat mass and enhances lean body mass in high fat-fed male Balb/C mice. *J Nutr* 2005;135:1124-30.
- 24- Kamphuis MM, Lejeune MP, Saris WH, Westerterp-Plantenga MS. The effect of conjugated linoleic acid supplementation after weight loss on body weight regain, body composition, and resting metabolic rate in overweight subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003;27:840-7.
- 25- Christie WW, Sebedio JL, Juaneda P. A practical guide to the analysis of conjugated linoleic acid (CLA). *INFORM* 2001;12:147-152. Available from : http://lipidlibrary.aocs.org/topics/cla_meth/file.pdf

- 26- Roach JA, Mossoba MM, Yurawecz MP, Kramer JK. Chromatographic separation and identification of conjugated linoleic acid isomers. *Analytica Chimica Acta* 2002;465:207–226.
- 27- Seline KG, Johein H. The determination of L-carnitine in several food samples. *Food Chemistry* 2007;105:793-804.
- 28- Taşbozan O, Gökçe MA. L-karnitin ve akuakültürde kullanımı. *Türk Sucul Yaşam Dergisi* 2007;5-8: 694-703.
- 29- Kurt Ö, El SN. Biyoaktif Bir Gıda Bileşeni L-karnitin : Beslenme Ve Sağlık Açısından Önemi ve Biyoyararlılığı. *Türkiye Bilim Araştırma Vakfı Bilim Dergisi* 2011;4-2:97-102.
- 30- Ası T. Tablolarla Biyokimya Cilt 2. Altın Kitabevi 1999.
- 31- Harmeyer J. The Physiological role of L-carnitine. *Lohmann information*. 2002;27:15-21.
- 32- Çitil M. Veteriner Hekimlikte Karnitin. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2002;8(1):77-82.
- 33- Chemspider. Available from : <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.10455.html?rid=44600d1f-87bd-4a81-941b-49f86102245e>
- 34- Rigault C, Mazue F, Bernard A, Demarquoy J, Le Borgne F. Changes in L-carnitine content of fish and meat during domestic cooking. *Meat Science* 2008;78:331-335.
- 35- Vaz FM, Wanders RJ. Carnitine biosynthesis in mammals. *Biochem J* 2002;361:417-429.
- 36- Meyer HP, Robins KT. Large Scale Bioprocess for the Production of Optically Pure L-Carnitine. *Monatshefte für Chemie* 2005;136:1269-1277
- 37- Yavuz H, Kurtoglu F. Biyokimyasal Özellikleri ile L-Karnitin. *İstanbul Üniv Vet Fak Derg* 2012;38(2):207-218.
- 38- EFSA (European Food Safety Authority) Scientific Opinion on the safety and efficacy of L-carnitine and L-carnitine L-tartrate as feed additives for all animal species based on a dossier submitted by Lonza Benelux BV. *EFSA Journal* 2012;10(5):2676. Available from : www.efsa.europa.eu
- 39- Möder M, Kiessling A, Löster H. Current Methods for Determination of L-Carnitine and Acylcarnitines. *Monatshefte für Chemie* 2005;136:1279-1291.

- 40- Qi M, Wang P, Sun Y, Yang J. Determination of the Enantiomeric Purity of L-Carnitine and Acetyl-L-Carnitine by Chiral Liquid Chromatography. *Chromatographia* 2004;59:247-250.
- 41- Eryılmaz T, Cesur C, Yeşilyurt MK, Aydın E. Aspir (*Carthamus tinctorius* L.), Remzibey-05 Tohum Yağı Metil Esteri: Potansiyel Dizel Motor Uygulamaları için Yakıt Özellikleri. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*. 2014;1(1):85-90.
- 42- Babaoğlu M. Aspir Bitkisi ve Tarımı (2014). Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü İnternet Sitesi: <http://arastirma.tarim.gov.tr/ttae/Sayfalar/Detay.aspx?SayfaId=59>
- 43- Babaoğlu M. Dünya’da ve Türkiye’ de Aspir Bitkisinin Tarihi, Kullanım Alanları ve Önemi (2014). Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü İnternet Sitesi: <http://arastirma.tarim.gov.tr/ttae/Sayfalar/Detay.aspx?SayfaId=58>
- 44- Gilbert J. International safflower production – an overview. The Australian Oil Seeds Federation. Available from : http://www.australianoilseeds.com/_data/assets/pdf_file/0004/6745/Gilbert_keynote_paper.pdf
- 45- Yenice N, Bayraktar N. Yerli Aspir (*Carthamus tinctorius* L.) Hatlarında Karyotip Analizi. *Tarım Bilimleri Dergisi* 1996;2(2):81-86.
- 46- Bayrak A. Ankara ve Şanlıurfa’da Denenen Yazlık-Kışlık Aspir (*Carthamus tinctorius* L.) Çeşit ve Hatlarının Yağ Asitleri Bileşiminin Araştırılması. *Gıda* 1997;22(4):269-277.
- 47- Norris LE, Collene AL, Asp ML, Hsu JC, Liu L, Richardson JR ve arkadaşları. Comparison of dietary conjugated linoleic acid with safflower oil on body composition i n obese postmenopausal women with type 2 diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr* 2009;90:468–76.
- 48- Türk Gıda Kodeksi Bitki Adıyla Anılan Yemeklik Yağlar Tebliği 2012/29
- 49- Codex Standard For Named Vegetable Oils 1999;210.
- 50- Acartürk F. Süspansiyonlar. *Modern Farmasötik Teknoloji* 2009:301-316.
- 51- Gönül N. Süspansiyon ve Emülsiyon Teknolojisi 2000.
- 52- Guidance for Industry Q1A(R2) Stability Testing of New Drug Substances and Products, U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), 2003.

- 53- Automated test for use with TEMPO, for the enumeration of Total viable count in 40-48 hours in food products, Biomerieux TEMPO[®] TVC, 80 007, 2009.
- 54- Automated test for use with TEMPO, for the enumeration of Yeasts, mold in 72-76 hours in food products, Biomerieux TEMPO[®] YM, 80 001, 2010.
- 55- Automated test for use with TEMPO, for the enumeration of *Escherichia coli* in 22-27 hours in food products, Biomerieux TEMPO[®] EC, 80 004, 2009.
- 56- Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation, U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM), 2001.
- 57- European Pharmacopoeia 6th Edition 2007; 529-530.



ÖZGEÇMİŞ

2010 yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümünden mezun oldum. 2011 yılında Biyofarmasötik ve Farmakokinetik Bilim Dalında yüksek lisansa başladım. 2010 yılından bu yana Ege Üniversitesi İlaç Geliştirme & Farmakokinetik Araştırma-Uygulama Merkezi (ARGEFAR) Çevre Gıda Laboratuvarı'nda Araştırmacı Operatör olarak çalışmaktayım.

