



**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA
TEZİ**

**TEPE BOŞLUK GAZ KROMATOĞRAFI (HS-GC) İLE
YAĞ ASİTLERİNİN ANALİZİ**

ASLIHAN EKİCİ

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

TEMMUZ 2020



**TEPE BOŞLUK GAZ KROMATOĞRAFI (HS-GC) İLE
YAĞ ASİTLERİNİN ANALİZİ**

Aslıhan EKİCİ

**DOKTORA TEZİ
ANALİTİK KİMYA ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

TEMMUZ 2020

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
 - Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
 - Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
 - Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
 - Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,
- bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Aslıhan EKİCİ

24/07/2020

TEPE BOŞLUK GAZ KROMATOĞRAFI (HS-GC) İLE YAĞ ASİTLERİNİN ANALİZİ
(Doktora Tezi)

Aslıhan EKİCİ

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Temmuz 2020

ÖZET

Yağ asitleri hücre yapısında bulunan önemli bileşenlerdir. Metabolik fonksiyonun bir parçası olarak, hücre membran yapısında, sinyal iletim kaskatında, enerji depolanmasında ve protein açillenmesinde yer alırlar. Bazı yağ asitleri esansiyel yağ asitleridir, vücuda sadece besinlerle alınırlar. Yağ asit miktarı ve tipleri gıdanın besinsel ve sağlık değerini gösterir. Bu tür besinlerin içeriklerindeki yağ asitlerinin hızlı, doğru, tekrarlanabilir ve ucuz yöntemlerle analizi önemlidir. Tez çalışmasında bazı yağlarda (tereyağ, margarin, zeytinyağı, kekik yağı ve balık yağı) bulunan yağ asitlerinin (FAs) analizi tek damla mikroekstraksiyon (SDME) ve tepe boşluk mikroekstraksiyon (HS-SDME) yöntemleri kullanılarak gaz kromatografi alev iyonlaştırma dedektörü (GC-FID) ile gerçekleştirilmiştir. Mikroekstraksiyon öncesinde metanol içinde hazırlanmış 0,2 ml 2 M KOH kullanılarak FAs'leri metil ester (FAMES) türevlerine dönüştürülmüştür. Mikroekstraksiyon şartları optimize edilerek en uygun koşullar belirlenmiştir. Zeytin yağı, kekik yağı ve balık yağında linoleik asit, γ -linolenik asit ve linolenik asit analizi için HS-SDME yöntemi kullanılmıştır. 2,0 μ l sodyum dodesil sülfat:1-bütanol (1:3, h/h) karışımı ekstraksiyon çözeltisi olarak kullanılmış, 2,0 ml'lik vial içerisinde 360 μ l FAMES kullanılarak, 0,07 g NaCl, 450 °C'de ve 35 dak ekstraksiyon süresi en iyi mikroekstraksiyon şartları olarak belirlenmiştir. SDME yönteminde ise mikroekstraksiyon çözücüsü olarak karbon tetra klorür kullanılmış, diğer mikroekstraksiyon şartları; ekstraksiyon çözücü miktarı (20 μ l CCl₄), tuz etkisi (*salting out*) için NaCl derişimi (%10), mikroekstraksiyon sıcaklığı (25 °C), karıştırma hızı (1000 rpm) ve mikroekstraksiyon süresi (20 dak) optimize edilmiştir. SDME-GC-FID yönteminin kesinlik çalışmasında (%RSD) %2,1-32,1 (n= 4) ve doğruluk çalışmasında geri kazanım değeri %95-105 olarak hesaplanmıştır. Yöntemlerin doğruluğu için standart GC-FID analiz sonuçları SDME-GC-FID ve HS-SDME-GC-FID sonuçları student-t testine göre karşılaştırılmış ve %95 güven aralığında (p= 0,05) fark anlamsız bulunmuştur.

Bilim Kodu : 1004

Anahtar Kelimeler : Yağ asitleri, mikro ekstraksiyon, gaz kromatografi, tepe boşluk

Sayfa Adedi : 111

Danışman : Doç Dr. Aysel BERKKAN

ANALYSIS OF FATTY ACIDS BY HEAD SPACE GAS KROMATOGRAPHY

(HS-GC)

(Ph. D. Thesis)

Aslıhan EKİCİ

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF HEALT SCIENCES

July 2020

ABSTRACT

Fatty acids are the essential components for cells. They take part in metabolic functions from membrane structure to signal transmission cascades, energy storage and acylation of proteins. Some fatty acids are essential and are taken into the body only through nutrition. Fatty acid's types, and amounts are the sign of the nutritional, and health value of the food. So, single drop micro extraction (SDME) and headspace single drop micro extraction (HS-SDME) methods followed by gas chromatography–flame ionization detector (GC–FID) were developed for the analysis of fatty acids (FAs) in some oils (butter, margarine, olive oil, sun flower oil, thyme oil, fish oil). Before micro extractions step, derivatization was carried out with 0.2 ml of 2 M KOH in methanol to transfer the FAs into the methyl esters (FAMES). Then proposed methods' micro extraction conditions were optimized. Linolenic acid, γ -linolenic acid, and linoleic acid in olive oil, thyme oil, and fish oil were determined by HS-SDME. 2.0 μ l of sodium dodecyl sulphate:1-butanol (1:3, v/v) mixture was used as the head space single drop micro extraction solvent. Most suitable extraction conditions were that 360 μ l of the fatty acid methyl esters (FAMES), 2.0 ml vial, 0.07 g NaCl, 45 °C, and 35 min. In SDME method carbon tetra chloride (CCl₄) was used as a single drop microextraction solvent to trap the FAMES before the gas chromatographic analysis. Amount of micro extraction solvent (20 μ l CCl₄), concentration of NaCl (10%, w/v) as salting out effect, microextraction temperature (25 °C), stirring rate (1000 rpm), and micro extraction time (20 min) that affect the extraction yield were optimized using the relative peak area. The precision (RSD%) of SDME-GC-FID was found as 2.1-32.1% (n= 4) and the recovery of the method was calculated as 95-105%. According to the student t-test no differences were found between GC-FID (n= 3), SDME-GC-FID (n= 3), and HS-SDME-GC-FID results in the 95% confidence limit (p= 0.05).

Science Code : 1004

Key Words : Fatty acids, micro extraction, gas chromatography, head space

Page Number : 111

Advisor : Assoc. Prof. Dr. Aysel BERKKAN

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince bilgi, birikim ve tecrübeleriyle yol gösterici, sadece tez için değil her konuda desteğini ve zamanını hiçbir şekilde esirgemeyen kıymetli hocam Sayın Doç. Dr. Aysel BERKKAN’a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Başarımdaki manevi katkıları çok büyük olan, bana her zaman güvenen, her koşulda ve her kararında beni destekleyen ve yanımda olup hayatımı kolaylaştıran eşime, aileme ve en değerli varlıklarım oğlum A. Alpuğ Ekici’ye bir yaşından beri tezimi bitirmemi beklediği ve diğer oğlum ve kızıma ev çalışmalarımda bana gösterdikleri sabır için sevgi ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xii
RESİMLERİN LİSTESİ	xvi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xvii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Yağların Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	5
2.2. Bitkisel Yağların Üretimi.....	9
2.2.1. Soxhlet ekstraksiyonu	11
2.2.2. Zeytinyağı çeşitleri.....	12
2.3. Yağ Asitleri	14
2.3.1. Doymamış yağ asitleri.....	16
2.3.2. Doymuş yağ asitleri.....	19
2.3.3. Esansiyel yağ asitleri.....	23
2.3.4. Yağ asitlerinin adlandırılması	24
2.4. Kromatografi ve Temel Kavramlar	26
2.5. Gaz Kromatografi.....	30
2.6. Numune Hazırlama Yöntemleri	40
2.6.1. Türevlendirme	40
2.6.2. Sıvı Faz Mikroekstraksiyon Teknikleri (LPME)	41

	Sayfa
2.7. Yağ Asitlerinin Analizi	48
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	55
3.1. Gereçler ve Kimyasallar.....	55
3.2. Cihazlar	56
3.3. Yöntem.....	56
3.3.1. FAME mix, FAME37, C4-24 yağ asitleri standart çözeltisinin hazırlanması ve analizi	57
3.3.2. Linoleik asit, linolenik asit, γ-linolenik asit metil ester standart çözeltilerinin hazırlanması ve analizi	58
3.3.3. Yağ örneklerinin türevlendirilmesi ve GC-FID ile analizi	58
3.3.4. Tepe Boşluk Mikroekstraksiyon (HSME) Yöntemi ile yağ asitleri metil esterlerinin önzenginleştirilmesi ve GC-FID ile analizi	59
3.3.5. Tek damla mikroekstraksiyon (SDME) yöntemi ile yağ asitleri metil esterlerinin önzenginleştirilmesi	60
4. BULGULAR	63
4.1. Standart Yağ Asiti Metil Esterlerinin (Supelco 37 comp. FAME mix, FAME37, C4-24) Gaz Kromatografi-Alev İyonlaşma Dedektörü (GC-FID) ile Analizi.....	63
4.2. Linoleik Asit, Linolenik Asit, γ-Linolenik Asit Metil Ester Standartlarının Gaz Kromatografi-Alev İyonlaşma Dedektörü (GC-FID) ile Analizi	66
4.3. Asit ve Baz Katalizli Türevlendirilen (Esterleştirilen) Zeytinyağı Numunesinin GC-FID ile Analizi	67
4.4. Üst Katman Mikroekstraksiyon (HSME) Yönteminin Optimizasyonu	68
4.4.1. Çeşitli yağlardaki yağ asitlerinin GC-FID ve HSME-GS-FID ile analizi.....	73
4.4.2. HSME–GC-FID Analizine ait kromatografik veriler	76
4.5. Tek Damla Mikroekstraksiyon (SDME) Yönteminin Optimizasyonu	77
4.5.1. Optimum Koşullarda Tek Damla Mikroekstraksiyon (SDME) Yönteminin yağ numunelerinde uygulanması	84
4.5.2. SDME-GC-FID Yöntemi için Kromatografik Veriler	87
4.6. SDME-GC-FID Yöntemi ile Yağ Asitlerinin Miktar Tayini	88

Sayfa

5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	95
KAYNAKLAR	103
ÖZGEÇMİŞ	111



ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Bazı doymamış yağ asitlerinin özellikleri	16
Çizelge 2.2. Doymuş yağ asitleri ve özellikleri.	19
Çizelge 2.3. Çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA)	22
Çizelge 2.4. Yağ asitleri.....	25
Çizelge 2.5. 100 °C’de bazı gazlarının vizkozite ve termal iletkenlik değerleri	34
Çizelge 4.1. Supelco 37 comp. FAME mix, FAME37, C4-24 standart yağ asitleri metil esterlerinin GC-FID analizi alıkonma zamanları	63
Çizelge 4.2. Supelco 37 comp. FAME mix, FAME37, C4-24 standart yağ asitleri metil esterlerinin GC-FID analizi referans alıkonma zamanları	65
Çizelge 4.3. Mikroekstraksiyon çözücü oranının (sodyum dodesil sülfat: 1-bütanol; h/h) linoleik asit metil ester pik alanına etkisi (2,0 ml vial, 360 µl zeytinyağı yağ asidi metil ester, 20 dakika mikroekstraksiyon süresi, 45 °C mikroekstraksiyon sıcaklığı)	72
Çizelge 4.4. GC-FID (n= 3) ve HS-SDME (n= 3) ile elde edilen FAMEs miktarları, % (a/a),.....	75
Çizelge 4.5. Balık yağı metil esterlerinin HSME–GC-FID analizine ait kromatografik veriler	76
Çizelge 4.6. Balık yağı metil esterlerinin GC-FID analizine ait kromatografik veriler	76
Çizelge 4.7. Organik çözücülerin fiziksel ve kimyasal özellikleri	77
Çizelge 4.8. SDME yönteminde optimum koşullar	84
Çizelge 4.9. Gün içi kararlılık.....	86
Çizelge 4.10. SDME-GC-FID ile tereyağı yağ asiti metil esterleri için kromatografik veriler	87
Çizelge 4.11. Tereyağı yağ asiti metil esterlerinin GC-FID analizinde kromatografik veriler.	87
Çizelge 4.12. Tereyağı yağ asit miktarları.....	90
Çizelge 4.13. Margarin yağ asit miktarları	91
Çizelge 4.14. Ayçiçek yağı yağ asit miktarları.....	91
Çizelge 4.15. Zeytinyağı yağ asit miktarları	92

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.16. SDME-GC-FID yönteminin tekrarlanabilirlik çalışmaları	92
Çizelge 4.17. SDME-GC-FID yönteminin doğruluk çalışması.....	93



ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Yağların hidrolizi ile sabun oluşma reaksiyonu.....	6
Şekil 2.2. Yağların gliserol ve yağ asidine hidroliz reaksiyonu.....	7
Şekil 2.3. Soxhlet Ekstraksiyon Cihazı (1. Karıştırma çubuğu ve ekstraksiyon çözeltisi 2. İmbik 3. Damıtma yolu 4. Ekstraksiyon tüpü 5. Kartuş ve numune 6. Sifon başı 7. Sifon çıkışı 8. Genişletme adaptörü 9. Geri soğutucu 10. Soğutma suyu çıkışı 11. Soğutma suyu girişi)	12
Şekil 2.4. Düz zincirli yağ asiti	15
Şekil 2.5. Karbon zincirinde cis ve trans konfigürasyonları	17
Şekil 2.6. Cis ve trans yağ asitleri	17
Şekil 2.7. (a) Konjuge yağ asiti zinciri, (b) Konjuge olmayan yağ asidi zinciri.....	18
Şekil 2.8. Konjuge yağ asiti izomerlerinin yapıları a- konjuge dienoik asitler, b- konjuge trienoik asitler	18
Şekil 2.9. Cis ve trans oleik asit.....	21
Şekil 2.10. Linoleik asit.....	21
Şekil 2.11. Araşidonik asit ($20:4 \Delta^{5,8,11,14}$).....	22
Şekil 2.12. Alfa-linolenik asit ($18:3 \Delta^{9,12,15}$).....	22
Şekil 2.13. Esansiyel yağ asitlerinin metabolizması (EPA: Eikosapantenoik asit, DPA: Dokosapantenoik asit, DHA: Dokosaheksanoik asit).....	24
Şekil 2.14. Gaz kromatografi şeması	31
Şekil 2.15. Gaz kromatografisi enjeksiyon bloğu	32
Şekil 2.16. a) Karboksilik asitlerinin asit katalizli esterleşme reaksiyonu b) Asit katalizli transesterleşme	40
Şekil 2.17. Doğrudan daldırma tek damla mikroekstraksiyon (DI-SDME) yöntemi.....	43
Şekil 2.18. Tepe boşluk tek damla mikroekstraksiyon (HS-SDME) yöntemi	43
Şekil 2.19. Dispersive sıvı-sıvı ekstraksiyon	45
Şekil 2.20. Gözenekli lif ekstraksiyon yöntemi (a) İki faz (b) üç faz (c) LPME sistemi	47

Şekil 4.1. Supelco 37 comp. FAME mix, FAME37, C4-24 standart yağ asitleri metil esterlerinin GC-FID kromatogramı.....	63
Şekil 4.2. Supelco 37 comp. FAME mix, FAME37, C4-24 standart yağ asitleri metil esterlerinin referans GC-FID kromatogramı.....	65
Şekil 4.3. Linolenik asit metil esterinin GC-FID kromatogramı (t_R linolenik asit metil ester= 35,82 dak)	66
Şekil 4.4. γ -linolenik asit metil esterinin GC-FID Kromatogramı (t_R γ -linolenik asit metil ester= 35,04 dak)	67
Şekil 4.5. Linoleik asit metil esterine ait GC-FID Kromatogramı (t_R linoleik asit metil ester= 34,32 dak)	67
Şekil 4.6. IUPAC yöntem 2,301'e göre türevlendirilen zeytinyağının GC-FID kromatogramı	67
Şekil 4.7. Avrupa farmakopesi 7,0'a göre türevlendirilen zeytinyağının GC-FID kromatogramı	68
Şekil 4.8. Asit katalizli (H_2SO_4) türevlendirilen zeytinyağının GC-FID kromatogramı	68
Şekil 4.9. Farklı mikroekstraksiyon sıcaklıklarında HSME-GC-FID ile elde edilen zeytin yağı FAMES kromatogramları a) 25 °C b) 45 °C c) 70 °C	69
Şekil 4.1. HSME-GC-FID yönteminde linoleik asit metil ester pik alanlarına sıcaklığın etkisi	69
Şekil 4.11. Farklı mikroekstraksiyon sürelerinde HSME-GC-FID ile elde edilen zeytinyağı FAMES kromatogramları a) 15 dak b) 25 dak c) 35 dak d) 45 dak (2,0 ml vial hacmi, 360 μ l yağ asidi metil ester, mikroekstraksiyon sıcaklığı 45 °C)	70
Şekil 4.12. Ekstraksiyon süresinin linoleik asit metil ester pik alanına etkisi (2,0 ml vial, 360 μ l yağ asidi metil ester, mikroekstraksiyon sıcaklığı 45 °C)	71
Şekil 4.13. Farklı mikroekstraksiyon çözücü oranlarında (sodyum dodesil sülfat:1-bütanol, h/h) HSME-GC-FID ile elde edilen zeytin yağı kromatogramları a) 1:0 b) 1:1 c) 1:2 d) 1:3 (2,0 ml vial, 360 μ l zeytinyağı yağ asidi metil ester, 45 °C mikroekstraksiyon sıcaklığı, 35 dak mikroekstraksiyon süresi)	72

RESİMLERİN LİSTESİ**Resim****Sayfa**

Resim 3.1. Tek damla mikroekstraksiyon (SDME) yöntemi ile yağ asitlerinin özümlenmesi (mikroekstraksiyon çözücü CCl_4)	61
---	----



SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
μm	Mikrometre
μM	Mikromolar
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
a/a	Ağırlık/ağırlık
C	Karbon
CH_2Cl_2	Diklorometan
CO_2	Karbondioksit
dak	Dakika
g	Gram
j	Joule
kg	Kilogram
kcal	Kilokalori
L	Litre
m	Metre
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
ppb	Parts per billion (milyarda kısım)
ppm	Parts per million (milyonda kısım)
R	Reaktif
t_R	Alıkonma zamanı
α	Alfa
β	Beta
γ	Gamma
δ	Delta

Kısaltmalar**Açıklamalar**

BSS	Bağıl standart sapma
BF₃	Bor tri florür
SDME	Tek damla mikroekstraksiyon
DLME	Dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyon
DLLME-SFO	Dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyon-Dondurarak yüzen organik damla
FAME	Yağ Asidi Metil Esteri (Fatty Acid Methyl Ester)
FID	Alev iyonlaşma dedektörü (Flame Ionization Detector)
GC	Gaz Kromatografi
GC-MS	Gaz Kromatografi-Kütle Spektrometrisi
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
H₂SO₄	Sülfirik asit
HCl	Hidroklorik asit
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi
KLA	Konjuge linoleik asit
KLNA	Konjuge linolenik asit
KYA	Konjuge yağ asitleri
LA	Linoleik asit
LCFA	Uzun zincirli yağ asiti
Ln	Linolenik asit
MS	Kütle Spektrometresi
MUFA	Tekli Doymamış Yağ Asidi (Monounsaturated Fatty Acid)
PUFA	Çoklu Doymamış Yağ Asidi (Polyunsaturated Fatty Acid)
SFA	Doymuş Yağ Asitleri (Saturated Fatty Acids)
SPE	Katı Faz Ekstraksiyon
SS	Standart sapma
USFA	Doymamış yağ asitleri (Unsaturated Fatty Acids)
USP	Amerikan Farmakopesi (United States Pharmacopeia)
UV	Ultraviyole

1. GİRİŞ

Hayvansal organizmanın başlıca besin kaynaklarından biri olan lipidler önemli depo yakıt maddeleridir ve özellikle sinir dokularında miktarları oldukça fazladır. Hücre ve sitoplazmik organellerin membranlarının %50'si lipidlerden oluşturmaktadır. Lipitler 9 kcal/g, karbonhidratlar ise 4.5 kcal/g enerji sağlarlar [1-3]. Lipitlerin görevleri yapılarında bulunan yağ asitlerine göre farklılık gösterirken en temel işlevleri; membranların yapı taşı olmaları, metabolizma için gerekli olan hücre yakıt maddesi olarak depo edilmeleri ve böceklerin, bakterilerin hücre duvarları ile cilt yapısını koruyucu özellikte olmalarıdır. Ayrıca lipitler, enzimlerin aktive edilmesinde, yağda eriyen vitaminlerin hedef doku ve organlara taşınmasında ve absorpsiyonunda, mitekondride elektron taşıma işlevinde, hücrelerde iletimde, bağışıklık olaylarında, hormonların özellikle prostoglandinlerin biyosentezinde prekürsör olarak önemli rol oynarlar. Nonpolar lipitler ise depolarizasyon dalgalarının miyelinli sinirler boyunca hızla yayılmasını sağlarlar [4, 1] .

Bazı lipitler organizmada sentezlenirken, büyük kısmı organizmaya dışarıdan alınır. Hayvansal organizmalar yalnızca bir tek çifte bağ sentezleyebildiğinden 2, 3,ve 4 çifte bağlı esansiyel yağ asitleri dışarıdan alınmak zorundadır. Yağ asitleri 2-34 karbon sayısında alifatik monokarboksilik asitler olup lipitlerin yapı taşıdır ve karbon uzunluğuna göre farklılık gösterirler. Çift bağ bulunmasına göre doymuş veya doymamış yağ asitleri, yapısındaki çift bağ sayısına bağlı olarak da tekli (MUFA) ya da çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) olarak sınıflandırılırlar. Uzun zincirli yağ asitleri (LCFA) 12 karbon ya da fazlasını içeren alifatik yağ asitleridir. Bu gruptaki yağ asitleri, çoklu doymamış yağ asitleri sınıfında yer alır, iki ya da daha fazla çift bağ bulundurur [5].

Yağların yüksek sıcaklıklara maruz kalmaları trans yağ asidi oluşma olasılığını artırır. Yüksek sıcaklık, nem ve bakteriyel kontaminasyon sonucu yağlar lipaz enzimiyle kısmen hidroliz olurlar. Ayrıca bazı mantarlar varlığında da yağda bozulma gerçekleşip ketonlar, aldehitler, kısa zincirli yağ asitleri ile yağ alkolleri oluşur. Işık, sıcaklık, nem, oksijen ve bazı katalitik maddelerle doymamış yağ asitlerini içeren yağlar otooksidasyona uğrayarak içeriklerindeki yağ asitleri parçalanarak serbest radikaller oluşabilir. Yağın oksijenle temas ettiği yüzeyin genişliği ve metaller (Cu ve Fe) oksidasyon hızını artırır. Lipitlerin peroksidasyonu yani otooksidasyonu sırasında oluşan serbest radikaller sadece gıdaların bozunmasına yol açmaz aynı zamanda lezzet kalitesinde de kayıplara ve dokulara zarar

vererek kanser, ateroskleroz, enflamatuar olaylar ve yaşlılığa neden olur. Bu bakımdan yağların oksidasyona uğrayıp uğramadığının belirlenmesi için içerdikleri yağ asitlerinin miktarının ve türünün gerek üretim aşamasındaki işlemler sonrasında gerekse depolama koşullarında rutin olarak kontrol edilmesi önemlidir. Bu amaçla kullanılan analiz yöntemlerinin kolay, güvenilir ve duyarlı olması gerekir. Analiz sonuçlarına göre oksidasyona neden olan etmenlerin ortamdaki uzaklaştırılması, işleme ve saklama sürecinde olabildiğince oksijen ile temasın kesilmesi, yağların depolama koşullarının iyileştirilmesi ve antioksidan madde kullanılması gibi basit önlemlerle lipid oksidasyonu önlenabilir.

Bitkisel yağların yağ asidi alkil esterlerinin içeriği, bitki tohumunun durumuyla da bağlantılıdır. Fermente edilmiş meyvelerden çıkarılan yağlar düşük kaliteli yağlardır. Bu yağların hoş olmayan kokuları nedeniyle ticari değeri düşüktür ve 100 °C'nin altındaki sıcaklıklarda kokudan arındırma sürecinden geçmeden tüketilmezler. Bu tür yağlar karıştırılarak piyasada satışa sunulabilmektedir. Yağların rafinerizasyonu sırasında özellikle de deodorizasyon yani kokudan arındırma işlemlerinde, buhar distilasyonu aşamasından sonra trans yağ asiti miktarlarında artış olup olmadığının belirlenmesi, kokudan arındırılmış yağ karışımı olarak markette bulundurulmalarının artışının engellenmesi için güvenilir analitik yöntemlerin geliştirilmesi önemlidir.

Tez çalışmamızda farklı bitkisel (zeytinyağı, ayçiçek yağı ve kekik yağı) ve hayvansal yağlardaki (tereyağ, margarin ve balık yağı) yağ asitleri analiz edilmiştir. Gaz kromatografisi yağ asitlerinin analizinde çok yaygın kullanılan bir yöntem olup yağ asitlerinin gaz kromatografik analize uygun olarak uçucu hale getirilmesi gerekmektedir. Yağ asitlerinin uçucu türlerine dönüştürülmesinde yapılarındaki karboksil gruplarının asidik ya da alkali ortamda alkollerle esterleşme reaksiyonu kullanılır [6, 7]. Serbest yağ asitleri, alkollerin ya da bazların nükleofilik ataklarına duyarlı olmadığından katalizörsüz şartlarda reaksiyon gerçekleşmez. Asidik ortamda yağ asidi metil esteri, metil alkolün aşırısının bulunduğu ortamda termal koşulda gerçekleşir. Asidik ortam, metil alkol içerisine hidroklorik asit (HCl) ya da sülfürik asit (H₂SO₄) ilave edilerek sağlanır. Metanol ve HCl kantitatif verimi yüksek türevlendirme reaktifi olmasına rağmen transmetilasyon hızının düşük olması nedeniyle reaksiyon süresi otuz dakikanın üzerindedir. Metanol ve H₂SO₄ ortamında ise çoklu doymamış yağ asitlerinin bozulma problemi ile karşılaşılır [8]. Yağ asidi metil ester türevi oluşturmada kullanılan diğer bir yöntem BF₃ asit katalizörü varlığında metil alkollün

aşırısının kullanıldığı reaksiyon ortamıdır. BF_3 kullanıldığında reaksiyon veriminin arttığı ve reaksiyon süresinin azaldığı, fakat GC kolonuna kalıcı zarar verdiği bildirilmiştir [5]. Yağ asidinin alkali ortamda türevlendirilmesinde ise anyonik bir ara basamak oluşur, bu da alkolün aşırısının bulunması halinde yeni bir estere dönüşebilir. KOH, NaOH ya da sodyum metoksit çok yaygın olarak kullanılan bazik katalizörlerdir. Bazik katalizör varlığında tepkime asidik katalizöre göre daha hızlıdır, fakat bazik kataliz reaksiyonları susuz ortam gerektirdiğinden biyolojik numunelerle çalışmak zordur. Ortamda su bulunduğunda, su güçlü bir elektron donor olduğundan alifatik alkollerden esterleşme işlemi tam olarak gerçekleşmez. Suyun ortamdan uzaklaştırılması için susuz sodyum sülfatın (Na_2SO_4) reaksiyon ortamına ilave edilmesi gereklidir [5].

Yağ asitlerinin metil esterlerini oluşturmak için basitliği, uygulanabilirliği, esterleştirme veriminin iyi olması ve kullanılan kimyasalların ulaşılabilir olmasından dolayı tezimizde IUPAC yöntem 2,301'e göre KOH katalizörü ortamında metanolün kullanıldığı türevlendirilme yöntemi tercih edilmiştir [9].

Matriks ortamında yapılan analizlerde genellikle analitleri alma, zenginleştirme gibi ön işlem uygulanması gerekmektedir. Zaman alıcı, karmaşık ekstraksiyon adımları içeren, aynı zamanda fazla miktarda örnek ve çözücü kullanımını gerektiren yöntemlerin yerine organik çözücü tüketimini en aza indiren (μl), otomasyona imkân sağlayan, ekstraksiyon basamaklarını basitleştiren ve daha iyi zenginleştirme sağlayan mikroekstraksiyon yöntemleri kullanılmaya başlanmıştır.

Tez çalışmamızda bitkisel ve hayvansal yağlardaki yağ asitleri esterleştirildikten sonra sıvı faz mikroekstraksiyon tekniklerinden üst katman mikroekstraksiyon (HSME) ve tek damla mikroekstraksiyon (SDME) yöntemleri ile önzenginleştirilmiştir. Küçük örnek hacminin gaz kromatografi analizlerine uygun olması ve uzun karbon zincirli yağ asitlerinin alev iyonlaşma dedektörü ile yüksek hassasiyetle tayin edilmesi mikroekstraksiyon yöntemi sonrası yağ asitlerinin analizinde avantaj sağlamaktadır. Yağ asidi metil ester standartlarının yüksek maliyetli olması, toplam yağ asidi miktarı üzerinden tayin yapma zorunluluğu doğurmaktadır. Kromatogramdaki tüm piklerin alanları hesaplanıp, analit yüzdesi, analit pik alanının toplam pik alanlarına bölünmesiyle hesaplanmıştır. HSME ve SDME yöntemleri ile yapılan önzenginleştirme yöntemi düşük derişimdeki yağ asitlerinin tayinine imkân verdiğinden toplam yağ asit miktarlarının doğru, duyarlı, güvenilir ve kolay

uygulanabilir bir yöntem olarak kullanılmasında doğrudan GC-FID analizine göre avantajlıdır.

SDME yönteminde sulu ortamda faz oluşturan ve karıştırma esnasında dağılmayan CCl_4 mikroekstraksiyon çözücüsü olarak seçilmiştir. Ekstraksiyon verimini etkileyen karıştırma hızı, sıcaklık, tuz etkisi için sodyum klorür derişimi, ekstraksiyon süresi ve ekstraksiyon çözücü miktarı parametrelerinin pik alanları üzerine etkisi incelenerek optimum koşullar belirlenmiştir. Optimizasyon çalışmalarında her seferinde bir parametre değiştirilerek diğerinin sabit tutulduğu ardışık optimizasyon yaklaşımı kullanılmıştır. Farklı marka tereyağ, margarin, ayçiçeğı yağı ve zeytin yağı numunelerinin içeriğindeki FAMES optimum koşullarda HSME-GC-FID ve SDME-GC-FID ile analiz edilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Yağların Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri [10]

Saf yağlar tatsız kokusuz ve renksizdir. Besinler için temel lezzet ve aroma kaynağıdır. Besinlerin yapısının oluşturulmasında rol oynarlar ve yağda eriyen vitamin ve bileşikler taşırlar. Bazı yağlar esansiyel yağ asitlerini içerirler.

Özgöl ağırlıkları 1'den küçük ve hidrofobik özellikte olduklarından su ile karışmayıp suyun yüzeyinde dururlar. Bitkisel sıvı yağların özgül ağırlıkları 0,941-0,930 arasında değişmektedir. Oksidasyonun artması özgül ağırlıklarının artmasına neden olur [10-12].

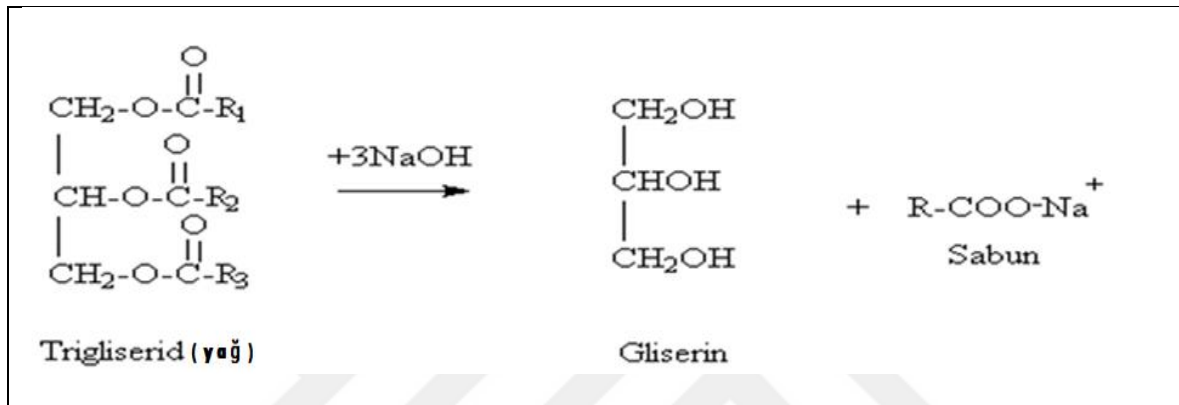
Erime noktaları: Yağların erime noktaları, zincir uzunluğuna ve yapısındaki doymamışlık derecesine göre farklılık gösterir. Erime noktası uzun zincirli yağ asitlerinde, kısa zincirli yağ asitlerine göre daha yüksektir. Çünkü bu yağın kristal yapısı daha güçlüdür ve kristaller arası bağı koparmak için daha yüksek ısı gerekir. Çift bağ sayısına göre erime noktası da değişir yani doymamışlık arttıkça erime noktası düşer. Çünkü çift bağlar yağ asitlerindeki düz zincirli yapıyı bozar ve kristal oluşumunu zorlaştırır [11, 13].

Çözünürlükleri: Yağın yapısında bulunan gliserol kısmı -OH grupları nedeniyle suda kolay çözünürken yağ asitlerinin hidrokarbon kısmı su ile karışmaz [10]. Ancak altı karbona kadar olan kısa zincirli yağ asitleri suda az miktarda çözünür. Uzun zincirli yağ asitlerinin sadece alkali metal tuzlarının (sabun) suda çözünürlüğü yüksektir. Gliserol yapısındaki -OH grupları tamamen esterleştiğinde, hidrofilik olan -OH grubu olmadığı için trigliseritler hidrofobik özellik gösterirler. Mono ve digliseritler ise hem yağın hem de suyun özelliklerini taşıdıklarından gıda endüstrisinde emülgatör olarak kullanılırlar. Fosfolipitler, yapılarındaki -PO₄ ve -OH grupları, glikolipitler ise şeker molekülündeki -OH gruplarından dolayı suda gliseritlere göre daha iyi çözünür.

Dumanlanma noktası: Yağlar yüksek sıcaklıkta ısıtıldıklarında yapıları parçalanır ve parçalanma ürünü olarak gazlar açığa çıkar. Dumanlanma noktası, yağların parçalanma ürünü olan bu uçucu gazların gözle görülebilecek bir şekilde ve belirli hızla açığa çıktığı en düşük derecedir.

Esterleşme: Yağ asitlerinin karboksil grupları ile alkollerin hidroksil grupları arasında su çıkışı ile gerçekleşen, yağ asidi ve alkolün ester bağı oluşma tepkimesidir.

Tuz oluşturma: Yağ asitleri, hidroksil grupları vasıtasıyla metaller ile tuzları oluştururlar. Karbon sayısı 6'dan fazla olan yağ asitlerinin metal ile oluşturduğu tuzlara sabun denir. Sabunlar yüzey gerilimini azaltıcı özelliği nedeniyle emülsiyon yapıcı ve emülsiyon sabitleyicidirler. Yağlar alkalilerle hidroliz edildikleri zaman sabun oluştururlar.



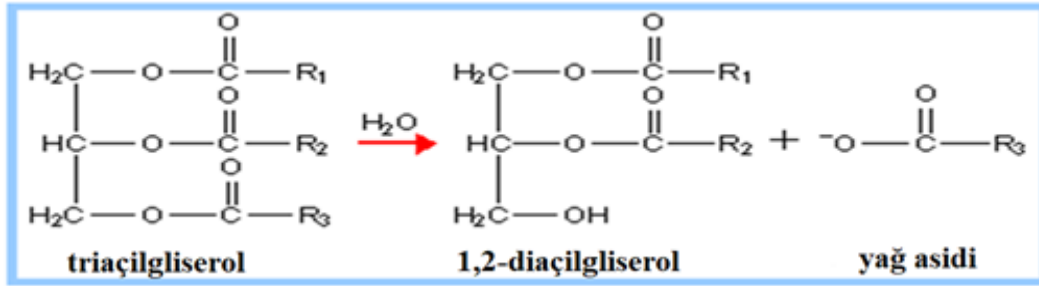
Şekil 2.1. Yağların hidrolizi ile sabun oluşma reaksiyonu [1]

Sabunlaşma sayısı: bir gram yağı sabunlaştırmak için gerekli olan KOH miktarı olarak tanımlanır.

Reichert-Meissl sayısı: 5 gram yağdaki asitleri nötralize etmek için gerekli olan 0,1 M KOH ml'si dir [14, 15].

Polenske sayısı: 5 gram yağda bulunan uçucu olmayan ve suda çözünmeyen yağ asitlerinin titrasyonunda harcanan 0,1 M bazın ml olarak miktarıdır [16].

Hidrolizi: Yağlar asit, baz ve enzimlerle yapılarını oluşturan gliserol ve yağ asitlerine hidroliz olurlar.



Şekil 2.2. Yağların gliserol ve yağ asidine hidroliz reaksiyonu [17, 3]

Oksidasyon: Yağın ekşimesine ransifikasyon denir. Işık, sıcaklık, oksijen ve bazı katalitik maddeler varlığında doymamış yağ asitlerini içeren yağlar otooksidasyona uğrarlar. Oksidasyon sonucunda yağ asitleri parçalanır ve serbest radikaller oluşur. Serbest radikaller oluşmaya başladıktan sonra ortamda antioksidan yoksa oluşan reaktif peroksitler diğer tekli doymamış yağ asitleri (MUFA) ve çoklu doymamış yağ asitlerinden (PUFA) bir hidrojen kopararak hidrojen peroksit ile serbest radikal oluşturur. Bu olaya yağların otooksidasyonu denir ve oluşan serbest oksijen türleri protein ve DNA'yı okside eden serbest radikal oluşumuna neden olurlar. Oksijene maruz kalan lipidlerin peroksidasyonu yani otooksidasyonu sırasında oluşan serbest radikaller sadece gıdaların bozunmasına (ransifidikasyon) yol açmaz aynı zamanda lezzet kalitesinde kayıplara ve dokulara zarar vererek kanser, ateroskleroz, enflamatuvar olaylar ve yaşlılığa neden olur. Lipit otooksidasyonunu etkileyen faktörler, yağın bileşimindeki yağ asitlerinin çeşit ve miktarı, ortamdaki oksijen varlığı, ışık, sıcaklık ve nem gibi saklama koşullarıdır. Lipitin oksijenle temas ettiği yüzeyin genişliği ve metaller (Cu ve Fe) ise oksidasyon hızını artırır ve acımayı çabuklaştırır. Oksidasyona neden olan etmenleri ortamdan uzaklaştırmak, işleme ve saklama sürecinde olabildiğince oksijen ile teması kesmek, yağların depolama koşullarını iyileştirmek ve antioksidan madde kullanmak lipit oksidasyonunu önler.

Yağların diğer bozulma (rasidite) nedenlerinden yüksek sıcaklık ve nem varlığında bakteriyel kontaminasyon sonucu yağlar lipaz enzimiyle kısmen hidroliz olurlar. Ayrıca uçucu kısa zincirli yağ asitleri kötü kokuya neden olurlar. Aspergillus Niger gibi bazı mantarlar ile kontaminasyon sonucunda bozulma gerçekleşir ve ketonlar, aldehytler, kısa zincirli yağ asitleri ile yağ alkolleri oluşur. Nem miktarı arttıkça bu tür bozulma riskleri de artar.

Çift bağların hidrojenlenmesi (hidrojenasyon): Çoklu doymamış yağ asitleri içeren yağların basınç altında ve uygun bir katalizör kullanılarak çift bağların açılıp hidrojen ile doyurulması işlemidir. Hidrojenlenme ile sıvı yağlardan margarin ve yumuşak margarin elde edilir.

Halojenlenme: Doymamış yağ asitlerinin yapısında yer alan etilen bağının florür, klorür, bromür veya iyodür gibi halojenlerden biri ile doyurulması işlemidir.

Ozonoid içeriği: Yağ asitlerinin oksitlenmesinde oksitleyici olarak KMnO_4 kullanılır. Oksidasyon işlemi çok karmaşık olduğundan oksitlenme esnasında birçok ara metabolitler de meydana gelebilir. Oksidasyonda etken olan ozon (O_3), çift bağlara bağlanması ile ozonoid oluşur. Bu reaksiyonlar yağ asitlerindeki doymamış bağların hangi karbonlar arasında olduğunu belirlemeye yarar.

Peoksit sayısı: Yağlarda bulunan aktif oksijen miktarının ölçüsü olup, 1 gram yağda bulunan oksijenin mikrogram cinsinden miktarıdır.

İyot sayısı: 200 gram yağda adsorbe edilen iyodun gram cinsinden ifadesidir. Doymamış yağ asitlerinin çift bağına iyodür veya diğer halojenlerin bağlanmasıyla doymuş yağ asitlerinin halojenleri oluşur. Ticari yağların saflığını ya da bozulup bozulmadığını kontrol etmek için iyot sayısına bakılır.

Asetil sayısı: Yapısında hidroksil grubu içeren yağ asitlerini bulunduran yağlar asetik anhidrit ile tepkimelerinden ester oluştururlar. 1 g asetillenmiş yağın sabunlaştırılması sonucu oluşan asetik asidin bağlanması için gereken KOH'ın mg cinsinden miktarına "asetil sayısı" denir.

Asit sayısı: Yağlarda hidroliz ya da oksidasyon meydana gelen acılaştırmanın tayininde kullanılır. 1 gram yağda bulunan serbest yağ asitlerini nötralize etmek için gerekli KOH'ın mg cinsinden miktarıdır [18, 19].

Uçucu yağ asitleri sayısı: Yağdaki uçucu yağ asidi sayısı yağların niteliklerinin belirlenmesindeki en önemli karakteristik özelliklerden birisidir.

2.2. Bitkisel Yağların Üretimi

Yağlı tohum ve dokulara uygulanan yağ çıkarma işlemleri çok farklı uygulamaları içermektedir. Farklı yağ çıkarma işlemleri arasında rendering, presleme ve çözücü ekstraksiyonu gibi farklı işlemlere dayanan uygulamalar vardır. Ham yağı tüketime hazırlama işlemine rafinasyon denir. Rafinasyon kısaca yağın yapısında bulunan ve istenmeyen bileşenlerden kurtulmak için yapılan arıtma ya da saflaştırma işlemidir. Temel aşamalar aynı olsa da kademe sırası, uygulama şekli ve süresi ve yağa özgü nitelikler bakımından farklılaşan rafinasyonun aşamaları genel olarak aşağıdaki gibidir:

Musilaj giderme (degumming): Fosfatidlerce zengin (%1-2,5) olan ayçiçeği, keten ve soya gibi yağlı tohumlarda patolojik etkenler veya yaralanmalar sonucu meydana gelen zamksı maddelerdeki müsilaj giderilmezse rafinasyon işleminde kayıplar meydana gelir. Müsilaj giderme işleminde hidroklorik asit, fosforik asit, sodyum klorür veya pirofosfatın %40-65'lik çözeltisi kullanılır. Bu çözeltilerden herhangi biri ham yağa %2-3 oranında eklenir ve yağ karıştırılarak 40-50 °C'ye kadar ısıtılır. Bu işlem sonunda çöken sulu tabaka santrifüjlenerek yağdan ayrılır. Yapışkan maddeler bir elektrolit yardımıyla pıhtılaştırılırken fosfatidler gibi diğer yapışkan maddeler su ve sıcaklık yardımıyla hidrotasyon sonucu çöktürülür. Bu sırada yağda bulunan bazı yabancı maddeler ile birlikte çöken mineral maddelerde, bu maddelerle birlikte yağdan uzaklaştırılır. Müsilaj maddeleri lesitin eldesinde kullanılır.

Nötralizasyon: Yağ sanayiinde asitlik giderme işlemi serbest asitlerin bazlarla nötralizasyonu şeklinde tanımlanır. Yağda serbest halde bulunan yağ asitleri NaOH ile muamele edilince yağda çözünmeyen sabun ile asit karakterdeki bazı maddeler ve sabun tarafından adsorbe edilen maddeler çöker. Ayrıca, yüksek derecede vakumda damıtılarak serbest yağ asitlerinin yağdan ayrılması sağlanabilir. Buna fiziksel nötralizasyon denir. Nötralizasyon kuru ve yaş olarak yapılır. Nötralizasyon işleminde genellikle 10-12 tonluk kazanlar kullanılır. Bu kazanlar ısıtıcı buhar helezonları, karıştırma paletleri ve baz çözeltisi püskürten sistemlerle donatılmıştır. Kullanılacak NaOH miktarı, serbest asitlik derecesi 7 olacak şekilde hesaplanır. Fakat bazın bir kısmı nötr yağ ile reaksiyona girebileceğinden hesaplanan miktarın %10 fazlası kullanılır. Asit giderme kayıpları yabancı maddelerin cinsine, miktarlarına ve serbest yağ asitlerinin miktarına göre değişir.

Fosfatidler az olduğuunda kayıp azalır. Yemeklik, kızartmalık, margarin yapılacak yağlarda asitlik giderilmezse serbest yağ asitleri duman çıkararak yanar.

Ağartma (renk giderme): Yağ sanayiinde ağartma işlemi yapmanın amacı, ham yağın doğal olarak içerdđi ve tohumun yağ olarak işlenmesi sırasında oluşan renk maddelerinin uzaklaştırılmasıdır. Bu iş için Tonsil, Bentonit gibi çeşitli adlar altında satılan ve sanayide “ağartma toprağı” genel adı ile bilinen adsorban maddeler kullanılır. Son zamanlarda bu amaçla sülfirik asit veya hidroklorik asitle muamele edilerek aktif hale getirilmiş topraklar veya aktif kömür de kullanılmaktadır. Aktif kömür, özellikle kırmızı, mavi ve yeşil renklerin adsorbsiyonunda kullanılır. Pahalı olması aynı zamanda fazla yağ adsorplaması nedeniyle yalnız başına kullanılmaz. Kullanılacak ağartma toprağının miktarı yağın rengine, toprağın aktivitesine bağılı olarak değışebilir. Ağartma işleminde 25-30 tonluk kazanlar kullanılır. Kazanda ısıtıcı serpantin ve karıştırıcı bulunur. Yağın sıcaklığı 70-80 °C’ye çıkarılır ve toprak ilave edilerek sıcaklık 90-100 °C’ye arttırılır. Toprağın ilave edilmesi sırasında karıştırıcılar çalıştırılarak bir süspansiyon elde edilir. Isıtma tamamlandıktan sonra 15-20 dakika daha karıştırmaya devam edilir. Daha sonra yağ presli filtrelerden geçirilerek süzölür. Bu aşamada yağ kaybı en fazla, kullanılan toprak miktarı kadar olmaktadır. Süzme işleminden sonra kazana önce basınçlı hava verilerek serbest yağ, sonra basınçlı buhar verilerek de toprağın adsorbe ettiğı yağ alınır. Bu işlemler esnasında oksidasyonu önlemek için vakum uygulanır.

Koku giderme (deodorizasyon): İstenmeyen koku ve tat maddelerinin yağdan uzaklaştırılması amacıyla uygulanır. Koku giderme işleminde yağın tat ve kokusunu bozan bazı uçucu maddeler su buharı ile yağdan uzaklaştırılır. Koku giderme aşamasında kurutma, gazları uçurma, ısıtma, soğutma ve boşaltma işlemleri uygulanır. Kokusu giderilecek yağ kazana alınıp alttan buhar verilerek sıcaklık 180 °C’ye çıkarılır. Bu sırada yağda istenmeyen koku maddeleri buharla birlikte uzaklaştırılır. Kokusu giderilmiş yağ yüksek vakum altında 100 °C’ye soğutulur. Daha sonra da plakalı soğutuculara gönderilerek sıcaklık 30-50 °C’ye düşürölür. Bu asırada oksidasyonu önlemek amacıyla 1 kg yağa 50 mg sitrik asit eklenir.

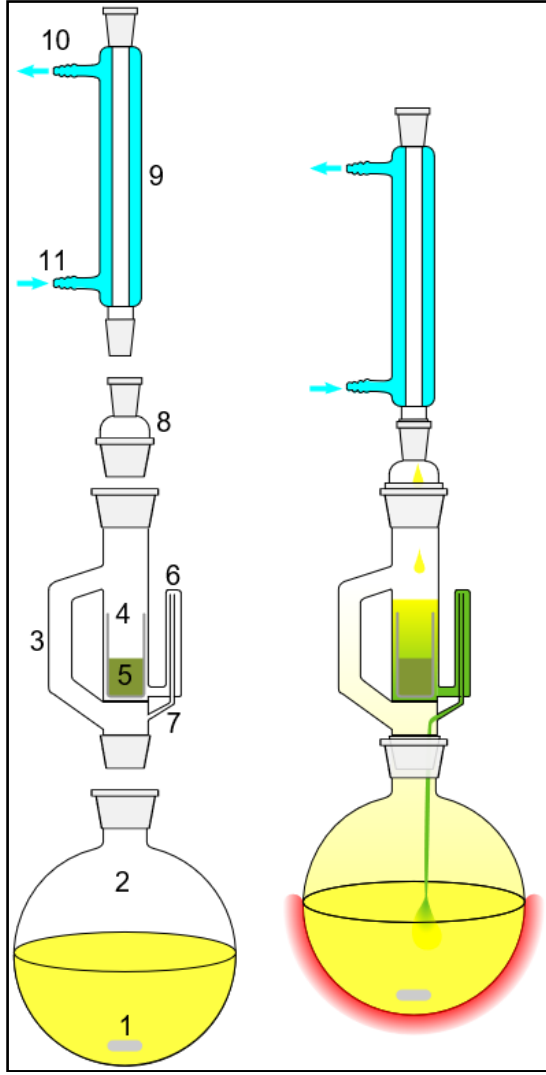
Vinterizasyon: Yemeklik yağlarda bulunan doymuş trigliseritlerin, özellikle de stearinlerin, 8-10 °C’de donarak yağı bulandırmalarını önlemek için yapılır. Bu işlem genellikle ayçiçeğı, çiğit ve mısırözü gibi yağlara uygulanır. Rafinasyonu biten yağ kristalizatörlere

alınır ve istenilen kristalizasyon sıcaklığına kadar (0-10 °C) soğutulur. Böylece yağlarda bulunan ve yüksek derecede eriyen trigliseritler (genelde stearin) ve vakslar (mumlar) ayrılır. Bu işlemle yağın oda sıcaklığında kristalleşmesi önlenmiş olur. Ayırma işleminden sonra yağ, soğutulmuş filtrelerden geçirilerek berrak kısım alınır. Vinterizasyonun başarılı olabilmesi için yağın mutlaka diğer rafinasyon aşamalarından geçmiş olması gerekir. Aksi halde ortamdaki serbest asitlik, yapışkan maddeler ve renk maddeleri kristalizasyonu güçleştirir [19].

2.2.1. Soxhlet ekstraksiyonu

Yağlı tohumlardan yağ eldesinde geleneksel olarak kullanılan presleme yöntemlerinin temel eksikliği olan düşük ekstraksiyon verimini arttırmak amacıyla günümüzde genellikle çözücü ekstraksiyonu veya çözücü destekli presleme kullanılmaktadır [20, 21]. Diğer yöntemlere kıyasla, çözücü destekli ekstraksiyon ile yağ eldesi daha yüksek verimle gerçekleşmektedir [22]. Yeni ekstraksiyon yöntemleri geliştirilse de, soxhlet gibi geleneksel çözücü destekli ekstraksiyon yöntemlerinin sağladığı yüksek verim, yeni yöntemlerin başarı ölçüsünün referansı olmuştur [23]. Yüksek verimde yağ elde edilmesinde en kritik unsurlardan biri olan yüksek sıcaklık, ekstraksiyon sırasında hücre duvarlarının parçalanarak çözücünün kolaylıkla hücre içine etki etmesini kolaylaştırır [24, 25].

Soxhlet ekstraktörü bir çözücü şişesi, orta çemberde bir sıvı akış borusu (sifon), soğutulmuş bir yoğuşturucu ve ısıtma sisteminden meydana gelir (Şekil 2.3). Katı numune orta çemberin içindeki ekstraksiyon bölmesine yerleştirilir, çözücü şişesi uygun ekstraksiyon çözücüsü ile doldurulup kaynama sıcaklığına kadar ısıtılır. Kaynayan çözücü buharı yoğunlaşmanın olduğu kondansatöre hareket ederek yoğunlaşıp örneğe doğru damlayarak örneği ıslatır. Çözücü seviyesi sifonun tepesine ulaştığında çözücü tüm örnek bölmesini boşaltarak çözücü şişesine geri damlamaya başlar. Böylece sıcak çözücü birkaç kez örnek içerisinde sirküle olur. Ekstrakte olan analitler çözücü şişesinin içinde kalırken, yalnızca temiz çözücü buharlaştığından, her dolaşımında taze çözücü kullanılır. Ekstraksiyon zamanı 6-24 saat arasında değişir ve oldukça büyük çözücü hacimleri (100-500 ml) gereklidir. Çevrim sayısı ve ekstraksiyon zamanı ekstraksiyon verimini etkiler.



Şekil 2.3. Soxhlet Ekstraksiyon Cihazı (1. Karıştırma çubuğu ve ekstraksiyon çözeltisi 2. İmbik 3. Damıtma yolu 4. Ekstraksiyon tüpü 5. Kartuş ve numune 6. Sifon başı 7. Sifon çıkışı 8. Genişletme adaptörü 9. Geri soğutucu 10. Soğutma suyu çıkışı 11. Soğutma suyu girişi) [26]

2.2.2. Zeytinyağı çeşitleri

Zeytinyağı, elde edilış şekillerine ve üretimde uygulanan yöntemlere göre natürel zeytinyağı, rafine zeytinyağı ve riviera zeytinyağı olmak üzere üç sınıfa ayrılır.

Natürel zeytinyağı (sızma); serbest yağ asitliği oleik asit cinsinden her 100 gramda 1 gramdan daha fazla olmayan yağa denir.

Natürel birinci zeytinyağı; serbest yağ asitliği oleik asit cinsinden her 100 gramda 1 ve 2 gram arasında olan yağdır.

Natürel ikinci zeytinyağı; serbest yağ asitliği oleik asit cinsinden her 100 gramda 2,0 gramdan az, 3,3 gramdan fazla olmayan yağlardır. Asit derecesi yüksek olduğu için bu yağlar hafif kusurlu olarak değerlendirilir.

Rafine zeytinyağı; doğal halde gıda olarak tüketilemeyen ham zeytinyağının, doğal trigliserit yapısında değişikliğe yol açmayan yöntemlerle rafine edilmeleri sonucu elde edilen, rafinasyon artığı madde içermeyen ve gıda olarak tüketilebilen yağlardır. Yüksek asit, kötü tat ya da kokuya sahip zeytinyağlarının doğal yapısını bozmadan yağdan uzaklaştırılarak (rafine edilerek) yenilebilir hale getirilmiş yağlara rafine zeytinyağı denir. Rafinasyon artığı içermeyen bu yağlarda serbest yağ asitliği, oleik asit cinsinden her 100 gramda 0,3 gramdan fazla olmayan yağlardır.

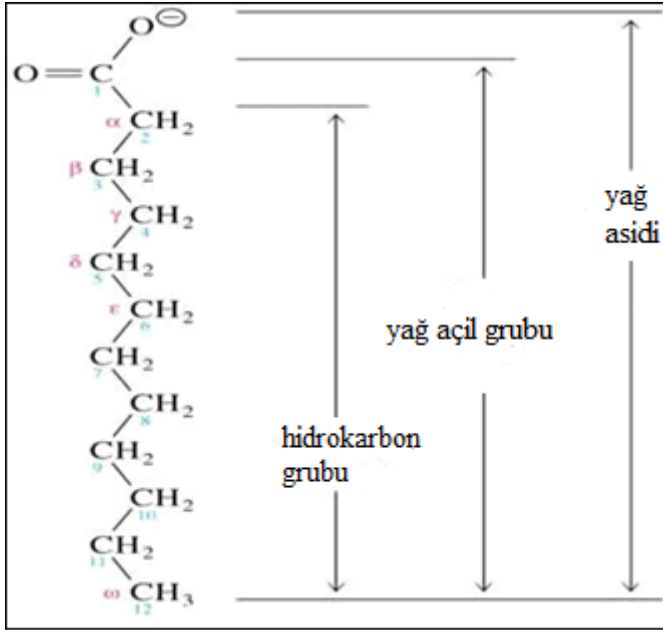
Riviera zeytinyağı; naturel zeytinyağı ile rafine zeytinyağı karışımı olup, özellikleri naturel zeytinyağı ile rafine zeytinyağı arasında değişen ve gıda olarak tüketilebilen yağlardır. Oleik asit türünden 100 gramda 1 gramı geçmeyen yağlardır [27].

Tohumların preslenerek veya modern sistemlerle sıkılarak ve çıkan yağın zeytin suyundan ve pirina denen zeytin posasından ayrılması ile elde edilen yağlar natürel yağlardır. Bitkisel yağların yağ asidi alkil esterlerinin içeriği, bitki tohumunun durumuyla bağlantılıdır. Örneğin zeytinin, hidrolitik ortama maruz bırakılmasıyla ya da bünyesinde bulunan şekerin laktik asit bakterileri tarafından parçalanarak laktik asite dönüşmesiyle fermentasyonu sonucu serbest yağ asitleri ve alkol miktarları artar. Fermentasyon işlemi zeytinin yapısındaki oleuropein isimli acı maddeyi azaltarak zeytini tatlandırmayı, salamura işlemi ile zeytine dayanıklılık kazandırarak uzun süre saklamayı amaçlar. Fermente edilmiş meyvelerden çıkarılan yağlar düşük kaliteli natürel zeytinyağlarıdır. Bu yağlar arıtım sürecinden geçmeden tüketilmezler. Bu nedenle, 100 °C'nin altındaki sıcaklıklarda "kokudan arındırma", bu yağların kokularını düzeltmek için kullanılır ve böylece bu yağlar natürel sızma zeytinyağlarıyla karıştırılarak illegal olarak kullanılabilir. Kokudan arındırma işlemi, trans yağ asitlerinin oluşumu gibi kimyasal değişimlere sebep olmaz. "Arıtılmış" zeytinyağlarını belirlemek için genellikle trans yağ asitlerine bakılır. Böylece, kokudan arındırılmış zeytinyağlarının karışım ya da saf olarak markette bulundurulmalarının artısını engellemek için bu güvenilir işaretler kullanılabilir. Bu yağların belirlenmesi için kullanılan yöntemler kokudan arındırma işlemi sırasında veya zeytinyağlarının yaşlandırılması esnasında oluşan konjuge linoleik asit ve digliserit

izomerlerin miktarlarının belirlenmesi ile klorofilin açığa çıkarılmasıdır [28]. Analitik metotlar kokudan arındırılmış zeytinyağlarını yaşılanmış zeytinyağlarından ayırt etmek için yeterli olmayabilir. Avrupa Birliği, kokudan arındırılmış ve düşük kaliteli yağların natürel sızma zeytinyağlarından ayırt edilebilmesinde Uluslararası Zeytin Komisyonu tarafından önerilen GC–FID ile yağ asidi alkil esterlerinin tespit edilebilmesi yöntemini kabul etmiştir. Yöntemin temeli, kokudan arındırma sürecinin düşük kaliteli yağlardaki yağ asidi alkil esterlerinin içeriğini azaltmamasına dayanır. Fakat yöntem, öncelikle yağın içinden yağ asidi alkil esterlerinin ayrıştırılmasını gerektirir. Bunun için klasik cam seviyeli kromatografi, emici madde olarak silika jel, eluent olarak da hekzan ve etil eter kullanılmakta ve rotavapor ile çözücüler buharlaştırılmaktadır. Bu süreç hem zaman kaybına sebep olmakta hem de yaklaşık 300 ml gibi yüksek miktarda çözücü gerektirmektedir. Alternatif olarak yağ asidi alkil esterlerinin ayrıştırılmasında katı faz ekstraksiyon (SPE) yöntemi de kullanılmaktadır [29, 30]. SPE çözücü miktarını yaklaşık 30 ml'ye düşürmüştür fakat dietil eter yerine toluen kullanılması sağlık riskini artırmış ve tekrarlanabilirlik artmamıştır [30].

2.3. Yağ Asitleri

Yağ asitleri genel olarak çift karbon sayılı, cis yapısında, dallanmamış veya düz zincirli, asiklik yapıda monokarboksilik asitlerdir (Şekil 2.4). Az olmakla birlikte doğada trans yapısında (elaidik asit), tek karbon sayılı (propiyonik asit, valerik asit) ve dallanmış yağ asitleri (tüberkülostearik asit veya laktobasillik asit) ile siklik yağ asitleri (hidnokarpik asit ve şolmugrik asit) de bulunmaktadır. Yağ asitleri doğal sıvı ve katı yağlar içerisinde esterler halinde bulunurlar. Esterleşme yağ asitlerinin karboksil grupları ile alkollerin hidroksil grupları arasında su çıkışı sonucu olur. Ancak plazmada serbest yağ asitleri esterleşmemiş halde bulunurlar. Yağ asitlerinin erime noktaları zincir uzunluğuna, doymamışlık derecesine göre değişir. Doğada bulunan yağ asitleri çift sayıda karbon atomu içerir ve çift bağların sayısı arttıkça yani doymamışlık arttıkça erime noktaları düşer. Kısa zincirli yağ asitlerinin erime noktaları uzun zincirli yağ asitlerinin erime noktalarından daha düşüktür [28, 31, 32].



Şekil 2.4. Düz zincirli yağ asiti [33]

Yağ asitlerindeki karbon sayısı 4-28 arasında değişmektedir. Yağ asitleri yapılarındaki karbon sayılarına, hidrokarbon zincir yapısına ve hidrokarbon zincirindeki bağlara göre sınıflandırılırlar [33].

Hidrokarbon zincir uzunluğuna göre yağ asitleri [33];

- a) Kısa zincirli yağ asitleri (karbon sayısı 6'dan az)
- b) Orta zincirli yağ asitleri (karbon sayısı 6 –10 arasında)
- c) Uzun zincirli yağ asitleri (karbon sayısı 12'den fazla)

Hidrokarbon zincir yapısına göre yağ asitleri;

- a) Düz zincirli yağ asitleri
- b) Substitüe olmuş yağ asitleri
- c) Halka içeren yağ asitleri
- d) Dallanmış yağ asitleri

Hidrokarbon zincirdeki bağlara göre;

- a) Doymuş yağ asitleri (çift bağ sayısı sıfır, $C_nH_{2n}O_2$)

b) Doymamış yağ asitleri (en az bir çift bağ içeren yağ asitleri, $C_nH_{2n-2x}O_2$; x = çift bağ sayısı)

- Monoen yağ asitleri (çift bağ sayısı 1)
- Polien yağ asitleri (çift bağ sayısı > 1)
- İzo yağ asitleri
- Konjuge yağ asitleri

Zinciri dallanma gösteren yağ asitlerinin radikal gruplarında metil, etil ya da propil kökü bağlı olabilir. Yapısında metil kökü bulunanlarına izo yağ asidi denir. Bunlar en çok bakterilerde bulunur.

2.3.1. Doymamış yağ asitleri

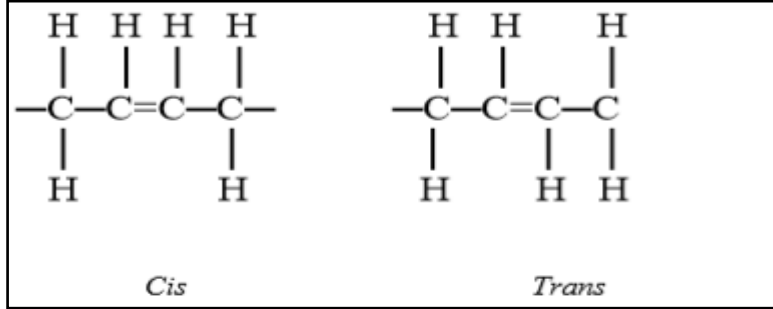
Yapılarında bir veya daha fazla çift bağ içerirler ve genellikle bitkisel kaynaklıdır. Yağdaki çift bağ sayısı yağın fiziksel ve kimyasal özelliklerini önemli şekilde etkiler (Çizelge 2.1). Linoleik asit (18 C'lu), linolenik asit (18 C'lu), araşidonik asit (20 C'lu) ve oleik asit (18 C'lu) doymamış yağ asitlerinden olup oleik asit tabiatta en yaygın bulunan yağ asididir. Araşidonik asitten sentezlenen prostaglandinler ise birçok biyolojik özelliğe sahiptir [34, 35].

Doymamış yağ asitleri oda sıcaklığında sıvı halde bulunurlar. Bu yağ asitlerince zengin yağlar hidrojenize edilerek yarı sıvı ya da katı hale getirilebilir. Çift bağları sayesinde kimyasal tepkimelere kolaylıkla girerler. Çift bağ sayısı arttıkça erime noktası düşer ve metaller, ısı, oksijen varlığı, ışık ile oksidasyon kolaylaşır [34, 36].

Çizelge 2.1. Bazı doymamış yağ asitlerinin özellikleri [34, 37]

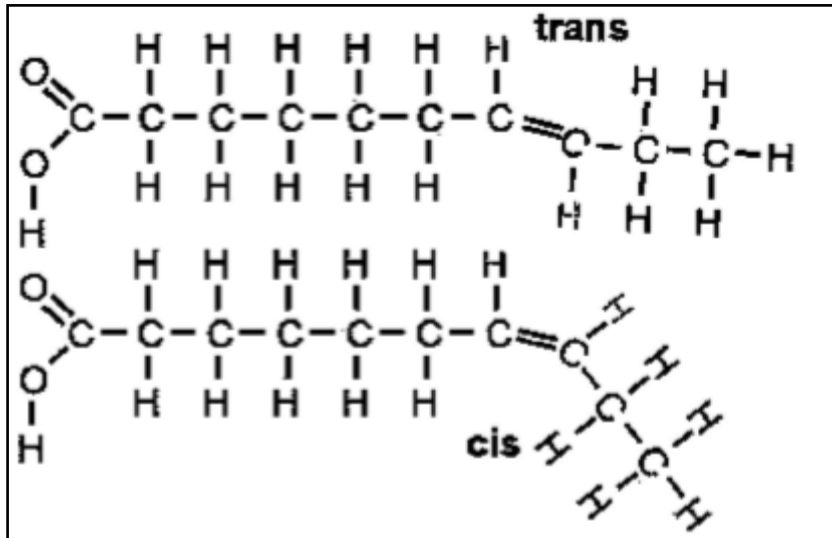
Yağ asitleri	Zincir uzunluğu, çift bağ sayısı	Erime noktası, (°C)	Kaynak
Palmiteloik asit	C-16:1	1	Balık ve hayvansal yağlar
Oleik asit	C-18:1	13	Hayvan ve bitki yağları
Linoleik asit	C-18:2	-6	Soya yağı
Linolenik asit	C-18:3	-11	Keten ve soya yağı
Araşidonik asit	C-20:4	-50	Hayvansal yağlar

Doymamış yağ asitleri, çift bağlı karbon atomlarının bağlı oldukları hidrojen atomlarının, zincirin aynı tarafında ya da zıt yönlerde olmalarına göre cis ya da trans olarak adlandırılır. Hidrojen atomları aynı taraftaysa cis, zıt yöndelerse trans olarak adlandırılır (Şekil 2.5).



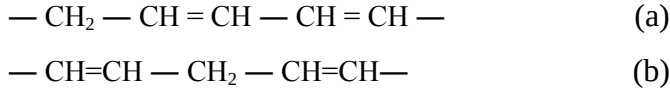
Şekil 2.5. Karbon zincirinde cis ve trans konfigürasyonları [38]

Cis formundaki yağ asitlerinin erime noktaları trans formundakilerden daha düşüktür. Cis konfigürasyonunda hidrojen atomlarının aynı tarafta bulunmasından kaynaklı zincirde burkulma vardır (Şekil 2.6). Trans konfigürasyonu doymuş yağlar gibi düzdür. Bu düzlük yağ molekülünün kristal yapısının kuvvetlendirdiğinden erime noktasını yükseltmektedir [38].



Şekil 2.6. Cis ve trans yağ asitleri [33]

Yağ asitleri çift bağların bağlı bulundukları yere göre konjuge ve konjuge olmayan yağ asitleri olmak üzere iki grupta incelenir. Konjuge yağ asidinde yapıdaki çift bağlar bir doymuş bir doymamış şekilde yani iki çift bağlı karbonun bir tek bağlı karbon ile ayrılması şeklindedir (Şekil 2.7) [39].

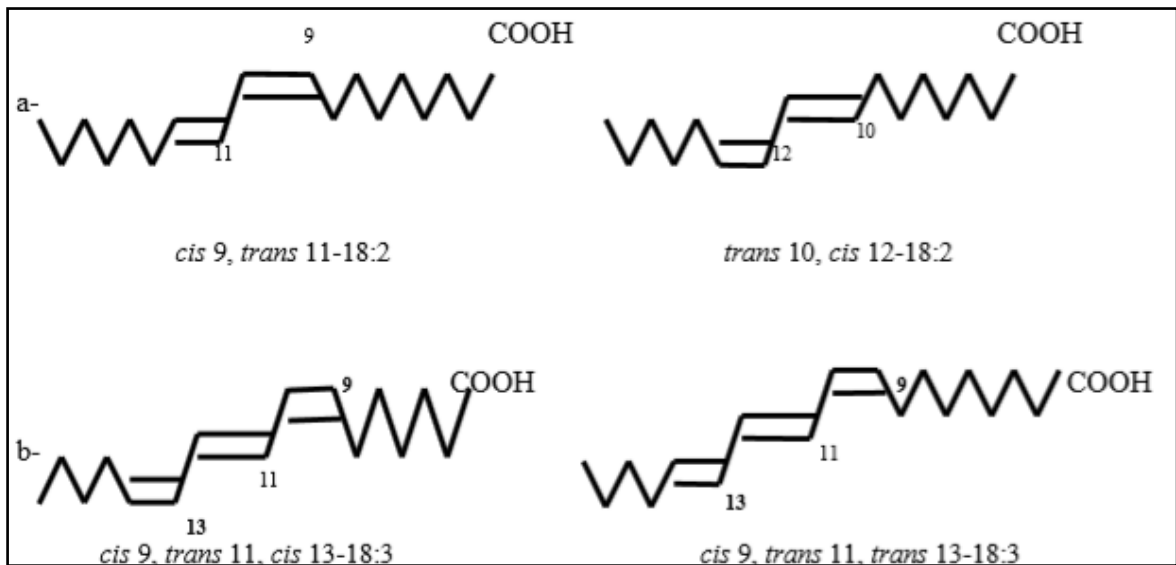


Şekil 2.7. (a) Konjuge yağ asiti zinciri, (b) Konjuge olmayan yağ asidi zinciri

Konjuge yağ asitleri (KYA) çoklu doymamış yağ asitlerinin konjuge çift bağlı geometrik ve pozisyonel izomerleridir. Konjuge linoleik asitin, kalp ve damar hastalıkları, kanser, diyabet, vücut kompozisyonu, bağışıklık sistemi ve kemik sağlığı üzerinde faydalı etkileri mevcuttur. Ancak hayvan modellerinde yapılan çalışmalar sonucu elde başarılı sonuçlar klinik çalışmalara henüz tam olarak yansımamıştır. Ancak her KYA izomerinin sahip olduğu biyolojik etkiler ve mekanizmaları farklılık sergilemektedir [40, 41, 5].

Sahip oldukları konjuge yapıya bağlı olarak kimyasal tepkimelere meyilli olmaları nedeniyle konjuge yağ asitleri sanayide çok yönlü işlenebilmektedirler. Konjugasyona bağlı olarak kromofor yapı içermeleri ve belirli dalga boylarındaki ışığı absorplamaları nedeniyle yapısında yer aldıkları bileşikte saptanabilmeleri mümkündür [35].

Konjuge yağ asitlerinde oksidasyon ve polimerizasyon reaksiyonları çok daha kolay meydana gelmektedir. Alkali katalizli interesterifikasyon, sabunlaşma ve kısmi hidrojenasyon işlemleri esnasında da çoklu doymamış yağ asitlerinin konjugasyonu ile konjuge yağ asitleri oluşur [42]. Konjuge yağ asitlerinin izomerleri Şekil 2.8’de gösterilmiştir.



Şekil 2.8. Konjuge yağ asiti izomerlerinin yapıları a- konjuge dienoik asitler, b-konjuge trienoik asitler [40]

KYA'lar arasında en çok bilinen ve üzerinde çalışmalar yapılanları konjuge linoleik asit (KLA) ve konjuge linolenik asit (KLNA)'tir. Bitki tohumu yağlarında bulunan linolenik asitin konjuge izomeri olan konjuge linolenik asit (KLNA) birçok biyolojik özelliğe sahiptir [40]. KLA ve KLNA doğal gıdalarda çok az miktarlarda bulunan önemli yağ asitleridir. Bunların dışında, sorbik asit, trikosanoik asit, punisinik asit, α -eleostearik asit ve α -parinarik asit doğada rastlanan konjuge yağ asitlerinden bazılarıdır. Bunlardan sorbik asit koruyucu madde olarak gıda sanayinde yaygın olarak kullanılır. KLA'nın dışındaki konjuge yağ asitleri doğada çeşitli tohum yağlarında bulunurlar. Fakat KLA ile ilgili yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında onların biyolojik aktiviteleriyle ilgili kapsamlı çalışmalar çok fazla değildir [43].

2.3.2. Doymuş yağ asitleri

Hayvansal yağlar doymuş yağ asitlerince zengin yağlardır [39]. Genel formülleri $C_nH_{2n}O_2$ şeklindedir. Doymuş yağların zincir uzunlukları (molekül ağırlıkları) arttıkça viskozite ve kırılma indisleri artar, yoğunlukları azalır ve erime noktaları yükselir. Bu nedenle doymuş yağ asitleri, bir yağın sıvı veya katı olma durumunda, sertliğinde önemli ölçüde etkinliğe sahiptirler. Bütirik asit (4 C'lu), palmitik asit (16 C'lu) ve stearik asit (18 C'lu) doymuş yağ asitlerinden bazılarıdır [44]. Çizelge 2.2'de bazı doymuş yağ asitlerinin özellikleri verilmiştir.

Çizelge 2.2. Doymuş yağ asitleri ve özellikleri [45].

Yağ Asiti					Yağ asiti metil esteri		
C: † çift bağ Zincir Uzunluğu	Sistemik Adı	Kapalı Formülü	EN (°C)	KN ^(a) (°C)	EN (°C)	KN ^(a) (°C)	Molekül Ağırlığı
C4:0	Bütanoik Asit	CH ₃ (CH ₂) ₂ COOH	-5,3	164	-	103	88,1
C6:0	HeksanoikAsit (Kaproik Asit)	CH ₃ (CH ₂) ₄ COOH	-3,2	206	-69,6	151	116,2
C8:0	OktanoikAsit (Kaprilik Asit)	CH ₃ (CH ₂) ₆ COOH	16,5	240	-36,7	195	140,2
C10:0	Dekanoik Asit (Kaprik Asit)	CH ₃ (CH ₂) ₈ COOH	31,6	271	-12,8	228	172,3
C12:0	Dodekanoik Asit (Laurik Asit)	CH ₃ (CH ₂) ₁₀ COOH	44,8	130 ⁽¹⁾	5,1	262	200,3

Çizelge 2.2. (devam) Doymuş yağ asitleri ve özellikleri [45].

Yağ Asiti					Yağ asiti metil esteri		
C: ‡ çift bağ Zincir Uzunluğu	Sistemik Adı	Kapalı Formülü	EN (°C)	KN ^(a) (°C)	EN (°C)	KN ^(a) (°C)	Molekül Ağırlığı
C14:0	Tetradekanoik Asit (Miristik Asit)	CH ₃ (CH ₂) ₁₂ COOH	54,4	149 ⁽¹⁾	19,1	114 ⁽¹⁾	228,4
C16:0	Hekzadekanoik Asit (Palmitik Asit)	CH ₃ (CH ₂) ₁₄ COOH	62,9	167 ⁽¹⁾	30,7	136 ⁽¹⁾	256,4
C18:0	Oktadekanoik Asit (Stearik Asit)	CH ₃ (CH ₂) ₁₆ COOH	70,1	184 ⁽¹⁾	37,8	156 ⁽¹⁾	284,5
C20:0	Eikosanoik Asit (Araşidik Asit)	CH ₃ (CH ₂) ₁₈ COOH	76,1	204 ⁽¹⁾	46,4	188 ⁽²⁾	312,5
C22:0	Dokasanoik Asit	CH ₃ (CH ₂) ₂₀ COOH	80,0	-	51,8	206 ⁽²⁾	340,6
C24:0	Tetrakosanoik Asit	CH ₃ (CH ₂) ₂₂ COOH	84,2	-	57,4	222 ⁽²⁾	368,6

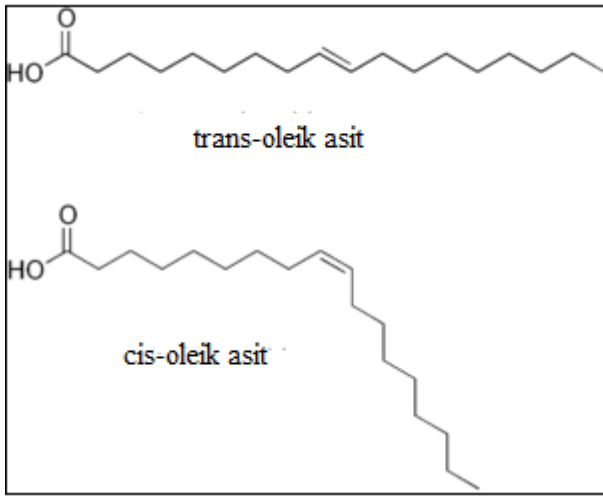
a: Kaynama noktaları normal atm basıncında elde edilmiştir; 1: Kaynama noktaları 1 mmHg vakumda elde edilmiştir; b: Kaynama noktaları 2 mmHg vakumda elde edilmiştir.

Kısa ve Orta Zincirli Doymuş Yağ Asitleri (C4-C14): Kısa zincirli yağ asitleri yaygın olarak tereyağında (C6-C12) ve süt yağında bulunan yağ asitleridir. İnek sütünde bütirik asit (bütanoik asik) ~%4 oranındadır. Bazı tohum yağları (kakao ve palm çekirdeği yağı) yüksek oranlarda (~%50) laurik (C12), kaprilik (C8), kaprik (C10) ve miristik asit (C14) içerirler.

Uzun Zincirli Doymuş Yağ Asitleri: Zincir uzunluğu 16 ve daha fazla olan yağ asitleridir. 20 veya daha fazla karbon içeren yağ asitlerine mum asitleri de denir. Doğada yaygın olarak bulunmazlar. Ancak yer fıstığı yağında %5-8 oranında araşidik, behenik ve lignoserik yağ asitleri bulunmaktadır.

a) Tekli doymamış (monoen) yağ asitleri (Mono Unsaturated Fatty Acid; MUFA): Doğada 10 ila 30 karbon içeren 100'e yakın monoen yağ asidi mevcuttur. 16, 18 ve 22 karbon içeren, cis yapısında yağ asitleri en yaygın olanlarıdır. Palmitoleik asitin (zoomerik asit) bitkisel ve hayvansal yağlarda oranı %1'in altındadır. Ancak balık yağlarında oranı %10

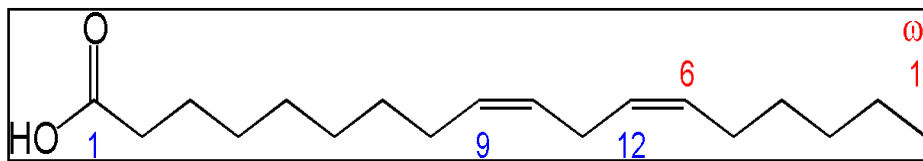
civarına çıkmaktadır. Bunun yanında *S. cerevisiae* mayasında %30-50 arasında bulunur. En yaygın monoen yağ asiti oleik asit (Şekil 2.9) zeytin, fındık, antep fıstığı ve ceviz yağlarında %60-80 oranında bulunur. Kanola ve yer fıstığı yağları da önemli oranlarda oleik asit içerirler. Ayrıca bazı transgenik tohum yağlarındaki oleik asit oranı artırılmıştır. Elaidik asit oleik asitin trans formudur ve daha çok hidrojenasyon sırasında oluşmaktadır. Oleik asitin erime noktası 13-14°C iken, elaidik asitin erime noktası 43 °C'dir. Erusik asit kolza yağında %45 civarında bulunur. Nervonik asit daha çok sinir hücrelerinde ve sfingolipitlerin yapısında yer alır [11].



Şekil 2.9. Cis ve trans oleik asit [11]

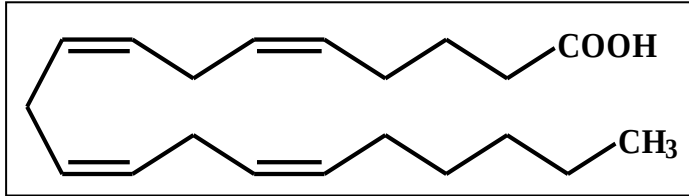
b) Çoklu doymamış (polien) yağ asitleri (Poly Unsaturated Fatty Acid; PUFA): Çoklu doymamış yağ asitleri 2'den daha fazla çift bağ içeren, genellikle cis ve izolen yapısında olan yağ asitleridir (Çizelge 2.3). Bitkisel yağlarda 18 karbonlu doymamış yağ asitleri, balık yağlarında ise 20 karbon ve üzeri çoklu doymamış yağ asitleri bulunur.

Linoleik asit bitkisel yağların çoğunda önemli major bileşen olarak bulunan, ikili çift bağ içeren çoklu doymamış yağ asididir (Şekil 2.10). Ayçiçeği, aspir, mısır özü, pamuk ve susam yağlarında linoleik asit miktarı %50'nin üzerindedir [11].



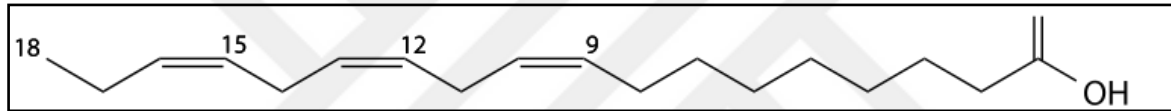
Şekil 2.10. Linoleik asit [46]

Araşidonik asit (Şekil 2.11) daha çok hayvansal ürünlerin fosfolipitlerinde bulunan, vücutta prostoglandin ve lökotrien gibi metabolitlerin üretiminde önemli rol oynayan bir yağ asididir [47].



Şekil 2.11. Araşidonik asit (20:4 $\Delta^{5,8,11,14}$) [11]

Alfa-linolenik asit (Şekil 2.12) cevizde %10-17, soya ve kanola yağlarında %7-10, keten tohumu yağında %50-60 oranında bulunan bir yağ asididir.



Şekil 2.12. Alfa-linolenik asit (18:3 $\Delta^{9,12,15}$) [11, 47]

En önemli kaynağı balık yağları olan ve oranları %30'a kadar çıkan omega-3 (ω -3) yağ asitlerinin en önemli temsilcileri eikozapentaenoik asit (EPA) ve dokozaheksaenoik asit (DHA)'dır. EPA vücutta eikosanoitlerin üretiminde kullanılırken DHA retinada bulunur.

Çizelge 2.3. Çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) [11]

Yaygın Adı	Yapısı	Çift Bağıın Pozisyonu
Linoleik asit	18:2 (n-6)	9, 12
α -linolenik asit	18:3 (n-3)	9, 12, 15
Stearidienoik asit	18:4 (n-3)	6, 9, 12, 15
Dihomo- γ -linolenik asit	20:3 (n-6)	8, 11, 14
Mead's asit	20:3 (n-9)	5, 8, 11, 14
Eikozapentaenoik asit (EPA)	20:5 (n-3)	5, 8, 11, 14, 17
Dokosapentaenoik asit (DPA)	22:5 (n-3)	7, 10, 13, 16, 19
Dokosaheksaenoik asit (DHA)	22:6 (n-3)	4, 7, 10, 13, 16, 19

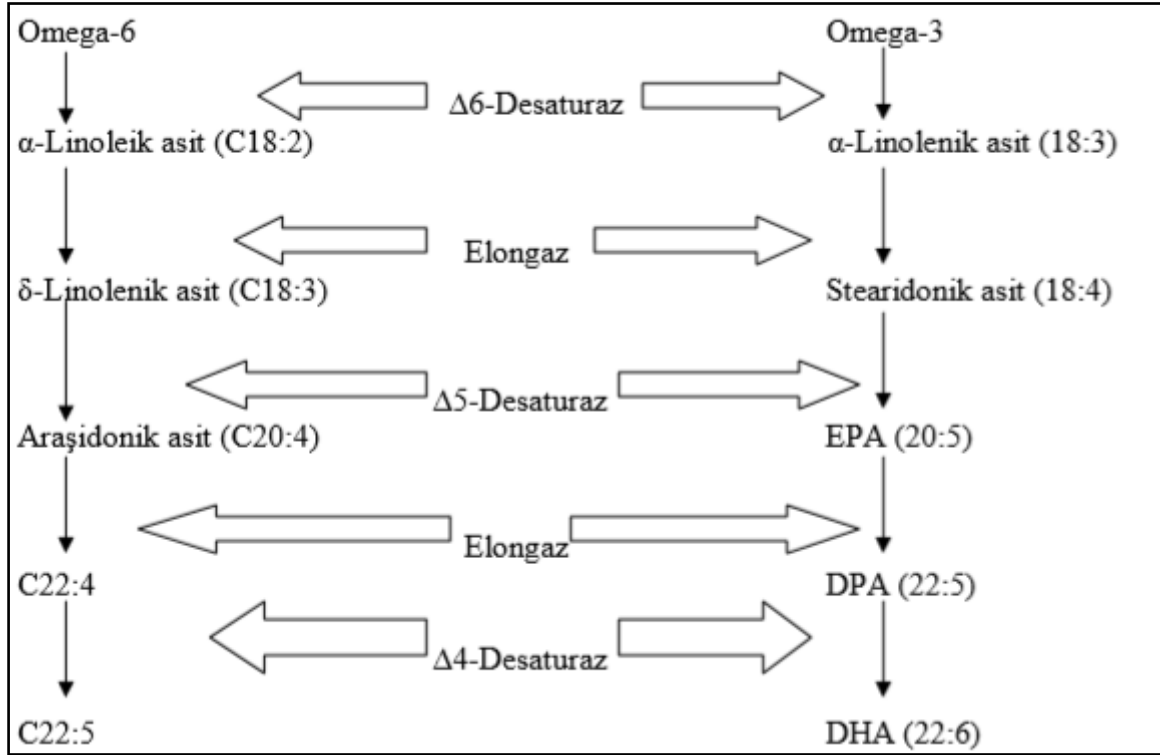
c) Trans yağ asitleri: Trans yağ asitlerinin en önemli kaynağı kısmi hidrojenasyonla üretilmiş yağlar ile memeli hayvansal ürünlerin yağlarıdır (süt yağı). Hayvanlarda trans yağ asitleri, yağ üretimi sırasında hayvanın midesindeki rumen bakterileri enzimleri ile yağ doyurularak oluşmaktadır. Oluşan trans asitler büyük oranda vaksenik asit (trans-11 oktadesenoik asit) ve konjuge linoleik asit (KLA) yapısındadır. Elaidik asit (18:1) ise oleik asitin trans izomeridir ve kısmi hidrojenasyonla üretilir.

Yağların yüksek sıcaklıklara maruz bırakılmaları trans yağ asidi oluşma olasılığını artırır. Uzun deoderizasyon süreleri ve sıcaklıklarında (240 °C üzeri) trans asitler oluşmaktadır. Soya ve kanola yağlarında bulunan linolenik asit (9c 12c 15c), ısıt işlemler sonucu 9c 12c 15t ve 9t 12c 15c izomerlerine, linoleik asit ise 9c 12t ve 9t 12c izomerlerine dönüşebilmektedir.

2.3.3. Esansiyel yağ asitleri

Hayvansal organizmada ancak bir tek çift bağlı yağ asitleri sentezlenebilmektedir. Birden fazla çift bağlı olan linoleik, alfa-linolenik ve araşidonik asitler hayvansal organizmada sentezlenemez ve dışarıdan alınması gereklidir [48, 49, 5]. Organizmada sentezlenemeyen ve besinlerle birlikte alınması gereken linoleik, linolenik, araşidonik asit, omega-3 ve omega-6'ya esansiyel yağ asitleri denir. Esansiyel yağ asitleri metil grubundan başlanarak yapılan numaralandırmaya göre $\omega 3$ ve $\omega 6$ gruplarında yer alırlar. Omega-6 (ω -6) yağ asitleri linoleik asitten türerken, omega-3 (ω -3) yağ asitleri alfa-linolenik asitten türer. Vücut tarafından üretilemeyen omega-3 ve omega-6 yağ asitleri, vücuda alındığında daha uzun zincirli yağ asitlerine dönüştürülebilir. Daha uzun zincirli yağ asitleri ise prostaglandin benzeri etkileri olan eikozanoidlerin yapı taşlarını oluşturur [50, 48].

Eikozanoidler hücre zarı oluşumunda, kanın pıhtılaşmasında, yaraların iyileşmesinde ve inflamasyonda görev alır. Vücut, düşük oranda da olsa alfa-linoleik asidi uzun zincirli eikosapentaenoik aside (EPA) ve dokosaheksaenoik (DHA) aside dönüştürebilir (Şekil 2.13).



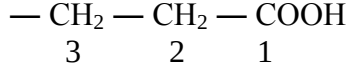
Şekil 2.13. Esansiyel yağ asitlerinin metabolizması (EPA: Eikosapantenoik asit, DPA: Dokosapantenoik asit, DHA: Dokosaheksanoik asit) [51, 52]

Büyüme ve gelişim için gerekli olan yağ asitlerinden omega-3 ve omega-6'nın en zengin kaynağı yağlı balıklardır. Bu yağ asitlerinin organizmaya yeterli miktarlarda alınamaması çocuklarda dermatitis ve beyin gelişmesinin yavaşlamasına neden olur. Böbreklerde harabiyet ve hematüri görülür. Esansiyel yağ asidinin kaynağı, yağda eriyen vitaminlerin taşınmasını ve insan vücudu için besin ya da antioksidan rolünü belirler. Yağların besin olarak önemli olmasının yanı sıra yapılan çalışmalarla kronik hastalıklar, obezite, diabet, kanser, astım ve kalp hastalıklarından korunmada da faydalı olduğu görülmüştür [53, 54, 52]. Yüksek linoleik asit içeriğine sahip gıdaların alımının kistikfibroz, diyabet ve dermatit gibi bazı hastalıklarda profilaktik ve tedavi edici etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Doğru miktarda, doğru yağ özellikle konjugelinoleik asit tüketmek ve kilo kaybı arasında doğrusal ilişki olduğu gösterilmiştir [55, 5]. İzole yağ asitleri, beslenme açısından büyük önem taşıyan esansiyel yağ asitlerini içerirler.

2.3.4. Yağ asitlerinin adlandırılması

Yağ asitlerinin adlandırılmasında zincirdeki karbon atomları —COOH grubundan başlayarak numaralandırılır ve karboksil grubuna bitişik karbon atomu (2 nolu karbon) α-

karbon, üç nolu karbon atomu β -karbon, son metil grubundaki karbon atomu ise ω -karbon atomudur.



Doymamış yağ asitlerinde çift bağın yerinin gösterilmesinde delta (Δ) simgesi kullanılır [56, 57]. Çift bağın zincirin kaçınıcı karbon atomunda olduğu deltanın üzerine yazılarak belirtilir. Örneğin linoleik asiddeki (oktadekadienoik asit) 9. ve 12. karbon atomlarındaki çift bağlar $\Delta^{9,12}$ şeklinde gösterilir. Diğer bir adlandırmada, yağ asidinin karbon sayısı yazılıp “:” veya “;” işareti konduktan sonra çift bağ sayısı ve açılan parantez içerisinde de çift bağın yeri belirtilir [56, 57]. Doymamış yağ asitlerindeki bu sistem yerine, karbon ve çift bağ sayısının önüne hidrokarbon zincirdeki ω -karbon atomdan itibaren sayılarak ilk çift bağın yerinin gösterildiği sistem de kullanılmaktadır (Çizelge 2.4).

Çizelge 2.4. Yağ asitleri [11, 58]

Yağ asitleri	Sistematik adı	Karbon sayısı ve çift bağın yeri	Erime Noktası (°C)	Kaynak
Kaproleik asit	9-desenoik asit	10:1 Δ^9	-	Süt yağı
Lauroleik asit	9-dodesenoik asit	12:1 Δ^9	-	Süt yağı
Miristoleik asit	9-tetradesenoik asit	14:1 Δ^9	-5	İnek sütü, balina depo yağı
Palmitoleik asit	9-hekzadesenoik asit	16:1 Δ^9	1	Balık, Hayvan ve Bitki Yağları
Petroselinik asit	6-octadesenoik asit	18:1 Δ^6	30	Maydanoz tohumu
Oleik asit	9-octadesenoik asit	18:1 Δ^9	13	Hayvan ve Bitki Yağları
Elaidik asit	trans 9-octadesenoik asit	18:1 Δ^9 t	44	
Vaksenik asit	11-octadesenoik asit	18:1 Δ^{11}	40	Hayvan depo ve süt yağları
Linoleik asit	9,12-oktadekadienoik asit	18:2 $\Delta^{9,12}$	-6	Soya Yağı
α -Linolenik asit	9,12,15-oktadekatrienoik asit	18:3 $\Delta^{9,12,15}$	-11	Keten ve Soya Yağı
Gadoleik asit	9-eikosenoik asit	20:1 Δ^9	24	Deniz hayvanları yağları
Araşidonik asit	5,8,11,14-eikosatetraenoik asit	20:4 $\Delta^{5,8,11,14}$	-50	Hayvan yağları
Erüsik asit	13-dokosenoik asit	22:1 Δ^{13}	34	Kolza tohumu

2.4. Kromatografi ve Temel Kavramlar

Kromatografi (chroma-renk, ve graphein-yazma) terimi ilk defa 1906'da Rus kimyacı ve botanikçi Michael Semenovich Tswett tarafından kullanılmıştır [59]. IUPAC tanımına göre kromatografi, biri hareketli diğeri sabit olan iki faz arasında dağılmış bileşenlerin ayrılmasında kullanılan bir yöntemdir [59, 60]. Bir kolon içine veya düz bir yüzeye tutturulmuş faz durgun faz, durgun fazın üzerinden veya arasından geçen ve analiti de içeren faz ise hareketli fazdır. Kromatografi, gaz veya sıvı hareketli fazda karışım halinde bulunan birbirine yakın özellikteki bileşenlerin durgun fazdan geçme hızlarına bağlı olarak ayrıldığı, teşhis ve tayin edildiği birçok farklı yöntemi kapsar ve analitin durgun faz ile etkileşme mekanizmalarına göre çeşitli sınıflara ayrılır:

Adsorpsiyon kromatografisi: Bir katı durgun faz ile sıvı veya gaz haldeki hareketli fazda analitin katı tanecikler üzerine tutunma (adsorplanma) dengesine göre ayırım gerçekleşir.

Dağılma kromatografisi: Katı yüzeyine tutturulmuş sıvı faz ile sıvı hareketli faz arasında analitin çözünme dengesine göre ayırım gerçekleşir.

İyon değiştirme kromatografisi: $-\text{SO}_3^-$ yapısındaki anyonların veya $-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$ yapısındaki katyonların kovalent bağlandığı durgun fazda zıt yüklü analit iyonlarının yer değiştirme dengesine göre ayırım gerçekleşir.

Moleküler eleme kromatografisi: Analit moleküllerinin boyutlarına göre ayrıldığı kromatografidir. Boyut olarak daha büyük olan analitler kolonu ilk terkederler.

Etkileşim (afinite) kromatografisi: Analitin durgun faza kovalent bağlanmış (immobilize edilmiş) tür ile seçici etkileşimine dayanan kromatografidir.

Kromatografik bir yöntemde numune bileşenlerinin kolona verilmesinden dedektöre gelene kadar geçen süreye karşı, dedektör tarafından elektronik olarak algılanan sinyallerin grafiğine kromatogram denir [61]. Ayrımı iyileştirmek, uygun sabit faz ve hareketli faz seçimiyle doğrudan ilişkilidir. Koşulların uygunluğuna ise kromatogramlar yorumlanarak karar verilir. Bir kromatogram alıkonma zamanı (t_R), kapasite faktörü (k'), seçicilik faktörü (α), kolonun ayırma gücü (R_s), kolon verimliliğinin kantitatif göstergesi olan, tabaka sayısı (N) ve tabaka yüksekliği (H) parametreleri hesaplanarak yorumlanır.

Alıkonma Zamanı (t_R)

Numunenin enjeksiyonundan sonra, analitin dedektöre ulaşması için geçen zamana alıkonma zamanı denir ve t_R ile gösterilir.

Kapasite Faktörü (k')

Kapasite faktörü ya da alıkonma faktörü kolonda ilerleyen numune bileşenlerinin göç hızlarını ifade eder.

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (2.1)$$

Bir analit için alıkonma faktörünün 1 den küçük olması, numunenin kolondan çıkış süresinin çok hızlı olduğunu, alıkonma faktörünün 20-30'dan büyük olması ise çıkış süresinin çok uzun olduğunu gösterir. İdeal ayrımlar alıkonma faktörünün 2 ila 10 arasında olduğu koşullarda sağlanır.

Seçicilik Faktörü (α)

Kolonun iki bileşeni ayırma yeteneği seçicilik olarak adlandırılır ve seçicilik faktörü (α) ile ifade edilir. Hareketli faza daha kuvvetli tutunan tür için kapasite faktörü k_2' , daha az kuvvetle tutunan veya daha hızlı kolondan elue edilen tür için ise kapasite faktörü k_1' 'dir ve iyi bir ayırım için α 'nın 1'den büyük olması gerekir [59].

$$\alpha = \frac{k_2'}{k_1'} = \frac{(t_R)_2 - t_M}{(t_R)_1 - t_M} \quad (2.2)$$

k_2' kolonda daha kuvvetli tutulan analit için kapasite faktörü

k_1' kolondan daha hızlı ayrılan analit için kapasite faktörü

Kolon Ayırma Gücü (R_s)

Kromatografide analitlerin iyi ayrıldığıнын göstergesi analitlerin alıkonma süreleri arasındaki fark ve bantların genişliğidir. Kolon ayırma gücü (R_s), kolonun iki analiti ayrılabilmesinin kantitatif bir ölçüsüdür. Kolon ayırma gücü, pik genişliklerinin orta

noktaları açısından komşu iki pik arasındaki mesafeyi ifade eder. R_s 'nin 1.5 olması iki bileşenin tam olarak ayrıldığını gösterir. Bu durumda iki bileşenin sadece % 0.3'ü çakışır. Ayrılmanın 1.0 olduğu durumda ise A bileşenine ait pik % 2.8 B bileşeni içerirken aynı şekilde B bileşeni de A bileşenini içerir. Belli bir sabit faz için ayırma gücü kolon uzunluğunu arttırarak iyileştirilebilir. Ancak bu kez ayırma için gereken süre artar [59].

$$R_s = \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{(W_A + W_B)} \quad (2.3)$$

Kolon verimliliği

Kromatografik analizlerde pik genişliği kolon verimliliğinin göstergesidir. Kromatografik kolon verimliliğinin kantitatif bir ölçüsü olarak tabaka yüksekliği (H) ve tabaka sayısı (N) kullanılır.

$$H = \frac{L}{N} \quad \begin{array}{l} H; \text{Tabaka yüksekliği} \\ L; \text{kolonun uzunluğu (cm)} \\ N; \text{tabaka sayısı} \end{array} \quad (2.4)$$

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2 \quad W; \text{pik genişliği} \quad (2.5)$$

Kromatografi hızlı, kolay ve çok iyi bir ayırma yöntemi olması nedeniyle son 30 yılda çok fazla alanda kullanılmaktadır. Kantitatif analizlerde analit pikinin alanı veya yüksekliği bir veya daha çok sayıdaki standartla kıyaslanır ve pik yüksekliği veya alanı derişim ile doğrusal olarak değişir. Bu yüzden ayırımı etkileyen kolon sıcaklığı, hareketli fazın akış hızı, enjeksiyon hızı gibi parametrelerin ve standartların kromatogramlarının alındığı süre boyunca sabit tutulması ve kolonun aşırı yüklenmemesi gerekir. Örneğin kolona enjeksiyon hızı, bir kromatogramda ilk çıkan pikler için %5-10'a kadar ulaşan bağıl hatalara yol açabilir. Örneğin kolona enjeksiyon hızı pik alanına göre yapılan analizlerde daha az etkilidir ve dar piklerde bu yöntemle daha doğru sonuçlar alınır.

Kantitatif analizde kullanılan yöntemler

Alan Normalizasyonu yöntemi: Örnek enjeksiyonundaki düzensizlikten kaynaklanan hata, alan normalizasyonu ile giderilebilir. Bu yöntemde örnekteki tüm maddelerin kolondan

çıkması gerekir. Kromatogramdaki tüm piklerin alanları hesaplanır ve her madde için bilinen detektör algılama faktörü ile çarpılarak düzeltilir. Analitin derişimi, analit pikine ait alanın toplam pik alanlarına bölünmesiyle hesaplanır [60].

$$\%A = \frac{\text{pik alanıA}}{\text{toplam pik alanı}}$$

$$A+B+C$$

(2.5)

$$A+B+C$$

İnternal (iç) standart yöntemi: Kantitatif kromatografik analizlerdeki en önemli hata kaynağı, enjekte edilen standart ve analit örnek hacminin aynı olmayışı ve enjeksiyon hızıdır. Örnek miktarı çoğunlukla 1 mikrolitre gibi çok az miktarlardır ve her defasında aynı hacimde madde verebilmek için bir mikro şırınga kullanılarak bağıl hata % birkaç seviyesine kadar düşürülebilir. Bu hata gaz-sıvı kromatografisinde daha da büyüktür. Kantitatif kromatografik analizde en iyi kesinlik, iç standart kullanılarak elde edilir, çünkü bu metod ile numune enjeksiyonu, akış hızı ve kolon şartlarındaki belirsizlikler en aza indirilir. Bu yöntemde standart ve numune çözeltilerinin her birine bilinen miktarda bir iç standart madde eklenir, analit pik alan (veya yükseklik) değerinin iç-standart pik alan (veya yüksekliği) değerine oranı analitik parametre olarak kullanılır. Bu yöntemin başarılı olabilmesi için iç standart piki numunedeki bileşenlerin piklerinden ayrılmalı ve analit pikine yakın olmalıdır [62].

Eksternal (dış) standart yöntemi: Kantitatif kromatografik analizde en çok uygulanan bu yöntemde bilinmeyen maddelerin bileşimine yakın bileşimlerdeki bir seri standart çözelti hazırlanır. Standartların kromatogramları alınarak pik yüksekliklerinin veya alanlarının, analit derişimlerine göre "kalibrasyon grafiğı" çizilir ve grafik orijinden geçen bir doğru şeklindedir. Örneğın pik yüksekliğinden/alanından kalibrasyon doğru denklemi yardımıyla analit derişimi hesaplanır. Bu yöntemde standart çözeltilerin ve kalibrasyon grafiğinin belirli aralıklarla tekrarlanması gerekir [62].

Standart katma yöntemi: Bir ya da iki maddenin analizi için uygulanabilen bu yöntemde, aynı miktarda numune içeren 5 ayrı çözelti hazırlanır. İlk çözelti hariç diğerlerine giderek artan miktarlarda standart çözelti eklenir. Herbiri için okunan pik alanı/yüksekliği değerleri grafiğı geçirilerek elde edilen doğrunun ekstrapolasyonu ile numunedeki madde miktarı tayin edilir [63].

2.5. Gaz Kromagrafi

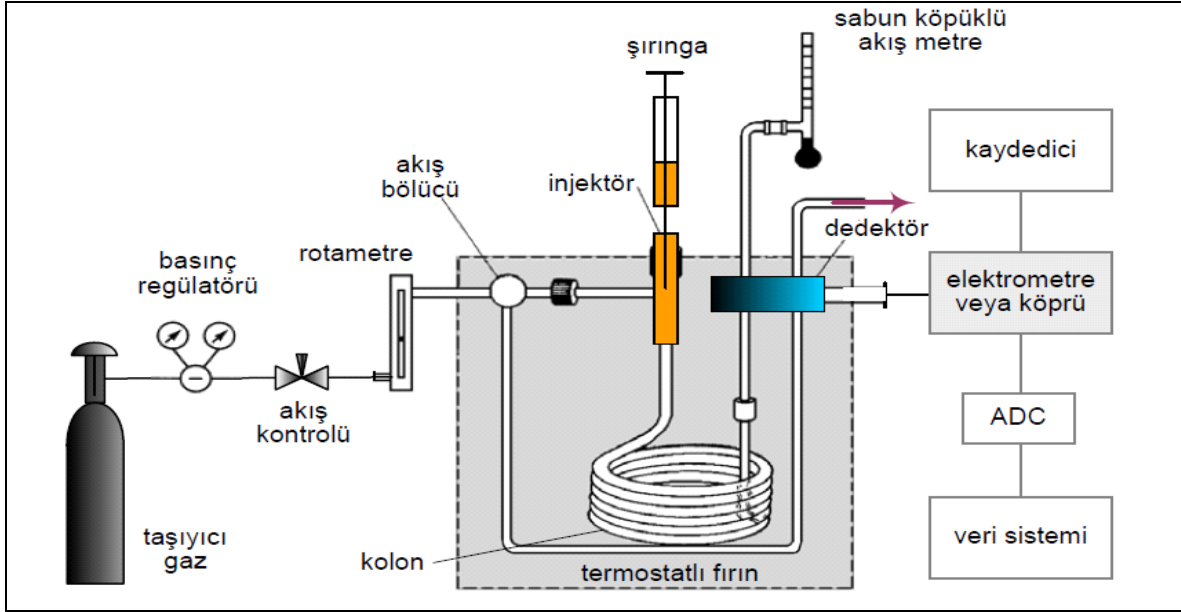
Gaz kromatografisinin temelini ilk kez 1941 yılında Martin ve Synge oluşturmasına rağmen, cihaz olarak Martin ve James tarafından 1952 yılında geliştirilmiştir. 1952'den beri GC özellikle 1960'larda hızlı bir şekilde gelişerek analitik kimyada ve pek çok alanda araştırmalarda kullanılmaya başlanmıştır [59].

Gaz-katı kromatografi katı bir durgun fazda, analitlerin fiziksel adsorbsiyon sonucu tutulmasına dayanırken adsorbsiyon izotermlerinin doğrusal olmayan özelliklerinden dolayı piklerde kuyruklanma görölür. Ayrıca aktif gazların sabit faz üzerinde kalış sürelerinin kararlı olmaması gibi dezavantajlardan dolayı gaz-sıvı kromatografisi (GLC) geliştirilmiştir [62].

Gaz-sıvı kromatografisinde hareketli faz inert bir gaz, sabit faz ise kolonun iç tarafına veya ince inert bir katı destek üzerinde tutturulmuş uçucu olmayan bir sıvıdır ve gaz-sıvı dağılma dengesine göre ayırım geręekleřir. Numunede bulunan bileşenlerin sabit sıvı fazdaki çözünölükleri birbirinden farklı olduğunda, denge kanununa göre bileşenler gaz fazı ile sabit sıvı faz arasında dağılırlar (partisyon kromatografisi). Kolon boyunca hareket eden maddelerin hareket hızı, o maddelerin sıvı fazdaki çözünölüklerine bağlıdır. Sıvı fazdaki çözünölüğü düşük olan maddelerin kolondaki ilerleme hızları da düşüktür, ayrıca akışkanlıkları az olan maddelerin hareketleri daha yavaş olur. En ideal durum, maddeler arasında şan eğrisi (Gaussian) veren taşıma eğrileri ile elde edilir.

Gaz kromatografide uçucu sıvı veya gaz halindeki örnek bir septum (lastik disk) içinden enjeksiyon odacığına tatbik edildikten sonra ısı ile gaz formuna dönüştürölür. Gaz halindeki örnek, helyum (He) veya azot (N₂) gibi inert bir taşıyıcı gaz ile kolon boyunca taşınır, inert gaz basınçla kolondan akar. Kolon, analitlerin uygun sürede kolondan geri alınması (elue edilmesi) için yeterli buhar basıncını sağlayacak sıcaklıkta olmalıdır. Kolonu terk eden analitler kolondan daha yüksek sıcaklıkta olan dedektöre ulaşarak sinyal oluşturur.

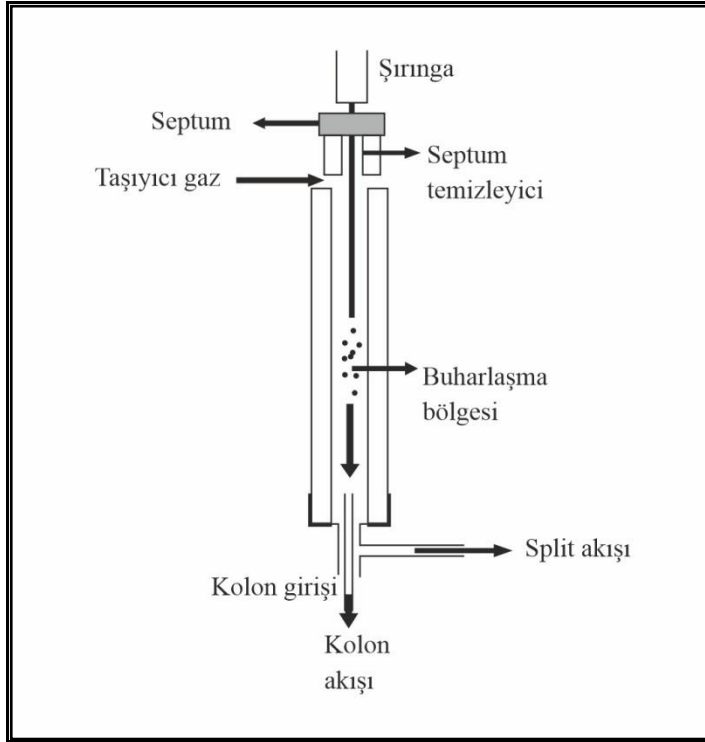
Gaz kromatografi taşıyıcı gaz, numune enjeksiyon bölmesi, bölücölü-bölücösüz (μ /splitless) enjektör kısmı, kolon ve dedektörden oluşur (şekil 2.14).



Şekil 2.14. Gaz kromatografi şeması [64]

Taşıyıcı Gaz: Taşıyıcı gazlar helyum (He), azot (N₂) gibi kimyasal olarak inert gazlardır ve basınçlı tüplerde bulunurlar. Kolona gaz, basınç düzenleyicileri, göstergeler ve akışmetreler yardımıyla verilir. Su veya diğer safsızlıkların tutulması için taşıyıcı gaz sisteminde bir moleküler elek bulunur.

Numune Enjeksiyonu: Numunenin verildiği kısımdır. Kolonun verimli çalışabilmesi için uygun miktarda numunenin gaz halinde verilmesi gerekir. Enjeksiyonun yavaş yapılması veya gereğinden fazla numune verilmesi bant genişlemesine ve ayırımın kötü olmasına neden olur. Enjeksiyon, silikon lastik diyaframdan veya septumdan yapılır. Septumun arkasında, kolonun giriş ucunda hızlı buharlaştırıcı bölmesi bulunur. Bu kısım numune içinde kaynama noktası en yüksek analitin kaynama noktasından 50 °C daha yüksek sıcaklığa kadar ısıtılır. Enjeksiyon hacmi 0,2-10 µl'dir. Geliştirilmiş enjeksiyon bloğu sayesinde bölücülü ve bölücüsüz enjeksiyon yapılabilmektedir (Şekil 2.15) [65].



Şekil 2.15. Gaz kromatografisi enjeksiyon bloğu [66]

Bölücülü-Bölücüsüz (Split-Splitless) Enjektör: Derişik örneklerin kapiler kolonlara enjeksiyonunda kullanılan bölücülü-bölücüsüz enjektörlerde örnek, ısıtılarak cam kılıf içine enjekte edilerek buharlaştırılır. Bölücülü enjeksiyonda kolonun girişine konulan bir numune- bölücü sayesinde numunenin sadece %0,2-2 kadarı kolona verilir, diğer kısmı dışarı atılır. Bölücü oranı 50/1- 600/1 arasında değişir. Genellikle derişik örneklerde (analit miktarı > %0,1) uygulanır. Örnekteki bileşikler 1 ng'dan daha az olduğunda, en iyi rezolüsyon 1 ml'den daha az miktarlardaki numunelerle çalışıldığında elde edilir. Bölücü sabit olmadığından kantitatif uygulamalarda tercih edilmez.

Bölücüsüz enjeksiyonda kolona örneğin tamamı verilir. Analit miktarının, örneğin %0,01'den küçük olduğu eser miktarların analizinde uygulanan bir yöntemdir. Fazla miktarda numune (yaklaşık 2 ml) enjekte edilir. Bu sistemde bir karıştırma odacığı veya bölücü ventili bulunmaz. Enjeksiyon sıcaklığı çözücünün kaynama noktasından 40 °C daha düşük sıcaklıktadır.

Kolon: Dolgulu, kılcal (açık borusal) kolonlar 2-100 m uzunluğunda olabilir. Paslanmaz çelik, cam, eritilmiş silis, teflon kolonlar sıcaklığı sabit tutmak için kullanılan etüve sığmaları için 10-30 cm çapında spiraller halindedir. Dolgulu kolonlarla kıyaslandığında

kapiler kolonların (açık borusal kolonlar) daha verimli, kısa analiz süresi, daha yüksek seçicilik gibi avantajları yanında düşük örnek kapasitesi gibi dezavantajı vardır.

GC kolonlarında kullanılan durgun sıvı fazlar düşük uçuculuk (ideal olarak sıvının kaynama noktası kolonun sıcaklığından 100 °C fazla olmalıdır), termal kararlılık, kimyasal inertlik, ayrımı yapılacak türler için uygun aralıkta kapasite ve seçicilik faktör değerlerini verebilecek çözücü niteliklerine sahip olmalıdır. Bu amaçla polidimetil siloksan, dimetil siloksan, fenil-polidimetil siloksan, siyanopropil-polidimetil siloksan, polietilen glikol ve trifloropropil- fazları kullanılmaktadır.

Gaz kromatografisinde tekrarlanabilir çalışmalar ve iyi bir ayırım yapabilmek için kolon sıcaklığı önemli bir parametre olup sıcaklık derecenin onda biri düzeyinde kontrol edilebilmelidir. Bu yüzden kullanılan kolonlar sıcaklığı kontrol edilebilen bir etüv içine yerleştirilirler. Optimum kolon sıcaklığı numunenin kaynama noktasına ve istenen ayırma verimine bağlıdır. Geniş aralıkta kaynama noktası içeren numuneler için sıcaklık programlaması yapılır. İzotermal ya da gradient sıcaklık programı yapılarak numune bileşenlerinin kolonda etkin bir biçimde ayrılmaları sağlanabilir. İzotermal sıcaklık programında sıcaklık sürekli olarak arttırılırken gradient sıcaklık programında basamaklar halinde arttırılır. Uygun sıcaklık programına göre numune bileşenlerinin elüsyonu 2-30 dakika arasında gerçekleşebilir. Genel olarak, optimum ayrılma en düşük sıcaklıkla ilgilidir, düşük sıcaklığın sakıncası ise, elüsyon süresinin ve dolayısıyla analiz süresinin artışıdır [59].

Dedektör: Kolonda ayrılan analitler gaz fazında dedektöre gelerek atık kısmından çıkarlar. Kromatogram, kolonda ayrılan numune bileşenlerinin zamana karşı dedektörde oluşturdukları pik şeklinde sinyallerden oluşur. Gaz kromatografisinde kullanılan dedektörler [60];

Alev İyonlaştırma Dedektörü (Flame Ionization Detector-FID): Alev iyonlaştırmalı dedektör, gaz kromatografide yaygın bir şekilde kullanılmakta olup aynı zamanda da en genel kullanım alanı olan bir dedektördür. Kolondan gelen gaz, hidrojen ve hava ile karışıp kıvılcım ile ateşlenerek alev oluşur. Organik bileşiklerin çoğu Hidrojen/hava ortamında yakıldığında alevde elektrik iletkenliği oluşturan iyon ve elektronlar meydana getirerek alevden elektrik akımının geçmesini sağlarlar. Alev başlığının ucu ile üzerinde bulunan

toplayıcı elektroda birkaç yüz voltluk bir gerilim uygulanırsa 10^{-12} amper akım oluşur. Bu akım işlemsel yükselticiye ölçüm için gönderilir. Bu dedektör karbonil, alkol, halojen, amin gibi fonksiyonel gruplar, H_2O , CO_2 , SO_2 , NO_x gibi gazlara duyarlı değildir.

Termal İletkenlik Dedektörü (TCD): Termal iletkenlik dedektörü ya da katarometre, gaz kromatografide ilk kullanılan detektörlerden biridir. Kolondan geçen gazın içinde analit moleküllerinin bulunması halinde termal iletkenlikte meydana gelen değişime dayanır. Elektriksel olarak ısıtılan Pt, Au veya W'nin sıcaklığı, etrafından geçen gazın ısı iletkenliğine bağlı olarak değişir. He ve H_2 'nin ısı iletkenliği çoğu organik bileşiğe göre altı ile on kat daha fazladır (Çizelge 2.5) [64, 60]. Çok az miktarda organik maddenin varlığında dahi kolonu terk eden gazın iletkenliğinde büyük değişiklik meydana gelir ve kolon dedektör sıcaklığı değişir. Organik gazların termal iletkenlikleri birbirine yakın olduğundan, termal iletkenlik dedektörlerinde ısı iletkenliği çoğu organik bileşiğe göre altı ile on kat daha fazla olan He, H_2 gazları kullanıldığında daha iyi duyarlık elde edilir.

Çizelge 2.5. 100 °C'de bazı gazlarının vizkozite ve termal iletkenlik değerleri

Gaz	Molekül ağırlığı	Vizkozite, $\eta \times 10^{-6}$ (μp)	Termal iletkenlik ($cal.s^{-1} \cdot ^\circ C^{-1} cm^{-1}$) $\times 10^{-4}$
CO_2	44	189	42
Ar	40	269	44
O_2	32	256	66
N_2	28	219	64
He	4	228	369
H_2	2	108	459
CH_4	16	-	86
C_2H_5OH	46	-	35

Elektron Yakalama Dedektörü (ECD): Pestisit gibi halojen içeren numunelerin analizinde kullanılan dedektörlerdir. Kolondan çıkan gazlar bir beta yayıcısının (genellikle Ni-63) üzerinden geçirilir. Beta tanecikleri, genellikle azot olan taşıyıcı gazı iyonlaştırarak çok sayıda elektron oluşmasına neden olur. Organik maddelerin yokluğunda dedektördeki bir çift elektrod arasında belli bir akım meydana gelir. Elektron yakalama özelliği olan organik madde kolondan geldiğinde elektronların bir kısmı tutulur ve elektrotlarda akım düşmesi gözlenir.

Atomik Emisyon Dedektörü (AED): Kolon gazları mikrodalga ile enerjilendirilmiş He plazmasına gönderilir. He plazması, bir dinod serili optik emisyon spektrometreye bağlıdır. Plazmada numunedeki tüm elementler atomlaştırılır ve karakteristik atomik emisyon spektrumu oluşturulur.

Kütle (Mass) Dedektörü (MS): Atom veya moleküllerden gaz fazında iyonlar oluşturulması ve bu iyonlar kütlelerine göre birbirinden ayrılması prensibine dayanır. İyonların bağıl miktarlarının (kütle/yük) oranlarına göre oluşan grafiğine kütle spektrumu denir.

Nitrojen-Fosfor Dedektörü (NPD): Nitrojen-fosfor dedektörü (termiyonik dedektör), alev iyonizasyon dedektörüne benzeyen, fakat bunlardan tamamen farklı prensiplere göre çalışan çok hassas özel ve seçici bir dedektördür. Nitrojen veya fosfor içeren bileşiklere özgü olan bu dedektör bir fosfor atomuna karşı, bir azot atomundan 10 kat, bir karbon atomundan da $10^4 - 10^6$ kat daha fazla cevap verir. Bu nedenle özellikle fosfor içeren pestisitlerin tayin edilmesinde kullanılan bir dedektör olup çevresel uygulamalar ya da adli tıp uygulamaları için uygundur. NPD hidrojen jetine yakın bir mesafeye yerleştirilmiş, içinde ısıtıcı bir sarım olan bir ribüdyum veya sezyum klorür tanecik içerir ve taneciğin bulunduğu yerde, H_2 ve taşıyıcı gaz N_2 karışır. Dedektör hem nitrojen ve hem de fosforun algılanması için kullanıldığında hidrojen akımı en düşük düzeyde tutulmalıdır; bu durumda jette gaz yanmaz. Dedektörün sadece fosforu algılanması istendiğinde daha fazla hidrojen verilir ve karışım jette yanar. Isıtılan alkali tanecik, termiyonik emisyonla elektronlar yayar, bunlar anotta toplanır ve elektrot sisteminde arka plan akımını oluştururlar. Nitrojen veya fosfor içeren bir örnekle çalışıldığında kısmen yanmış nitrojen ve fosforlu maddeler taneciğin yüzeyinde adsorblanır. Adsorblanmış madde yüzeyin iş fonksiyonunu düşürür, bunun sonucu olarak elektron emisyonu artar ve anotta toplanan akım yükselir.

Fotoiyonizasyon Dedektör (PID): Bir fotoiyonizasyon dedektöründe, kolondan çıkan karışım yüksek enerjili fotonlarla (tipik olarak UV ışık) ışınlanır ve molekülleri pozitif yüklü iyonlar haline dönüştüren bir iyon dedektörüdür. Moleküller yüksek enerjili UV ışığı (10.6 eV, 11.7 eV veya 11.8 eV) absorblar ve iyonizasyon potansiyeli fotonun enerjisinden daha düşük olanlar iyonlaşarak pozitif iyonlar meydana gelir. Meydana gelen bu iyonları içeren hücreye potansiyel uygulanırsa bir iyon akımı oluşur; iyon akımı amplifiye edilir ve okuyucuya gönderilir.

Alev Termoçift Dedektör (FTD): İlk üretilen GC dedektörlerinden olan bu dedektör, alev iyonizasyon dedektörlerin (FID) öncüsü olarak kabul edilebilir. FID'lerin üretilmesi ile birlikte FTD'lerin çok fazla ticari önemi kalmamıştır. FTD'de taşıyıcı gaz olarak hidrojen veya hidrojen, nitrojen karışımı kullanılır. Kolondan gelen gazın küçük bir jetin ucunda yakılması ile oluşan alev jetin üst kısmına yerleştirilmiş olan termoçifti ısıtır. Eğer gaz akımında analitin olması halinde gazın yanma ısısı artacağından alevin sıcaklığı ve termoçiftin çıkışı da yükselir. Çıkış, bir potansiyometrik kaydediciye gönderilir. Dedektörün cevabı, maddenin yanma ısısıyla orantılıdır.

Emisyon Dedektörü: Alev termoçift dedektörün daha gelişmiş şekli olan yenilikçi bir dedektördür. Kolon akımı ile yanabilen bir gaz karıştırılır ve bir jette yakılarak alevin parlaklığının veya renginin artması algılanır. Alevin ters tarafında, yayılan ışığa odaklanmış bir mercek (bir fotoselin üzerinde) bulunur. Alev ışığının çıkışı, basit bir potansiyometre ağıyla dengelenmiştir. Dedektör, aromatik hidrokarbonlara karşı seçicidir. Alevin parlaklığı veya rengi değiştiğinde sistemdeki mevcut denge bozulur ve cevap potansiyometrik kaydedicide algılanır. Hassasiyet 10^{-6} g/ml seviyesindedir. Doygun hidrokarbonlar, aromatik hidrokarbonların tersine, yandıkları zaman alevin parlaklığını yeteri kadar değiştirebilme özelliği olmadığından cevapları zayıftır ve dolayısıyla bu tür bir dedektörle tayinlerinde hassasiyet düşük olur.

Alev Fotometrik Dedektör (FPD): Yaygın olarak hava ve sudaki kirleticiler, pestisitler ve kömür hidrojenasyonu sonucu oluşan ürünleri analiz etmek için kullanılır. Özellikle sülfür veya fosfor içeren bileşiklere seçici olup bunların tayininde yaygın olarak kullanılan dedektörlerdir. Kolondan çıkan gaz hidrojen/hava alevinden geçirilir; bu esnada fosforun bir kısmı 510 ile 526 nm dolaylarında emisyon yapan HPO türüne dönüşürken kükürt ise 394 nm pik verecek şekilde emisyon bandı oluşturan S₂ türüne dönüşür. Bu türlerin karakteristik kemiluminesans emisyonu bir fotoçoğaltıcı tüple, uygun optik filtreler kullanılarak ölçülür. Dedektör cevabı fosfor için doğrusal, sülfür içinse derişiminin karesine bağlıdır. Seçici algılama yapılabilmesi için, alev ve fotoçoğaltıcı tüp arasına bir girişim filtresi konulmuştur. Sistemde bir yanma odacığı, hidrojen (yakıt) ve hava (oksitleyici) girişleri için gaz hatları ve yanma ürünlerinin uzaklaştırıldığı bir eksoz çıkışı bulunur. Ayrıca, alevden yayılan UV ve görünür ışınların tutulması için termal bir filtre (bandpass) kullanılır. Fotoçoğaltıcı tüp, yanma odacığından fiziksel olarak izole edilmiştir.

Pulslu Alev Fotometrik Dedektörler (PFPD): Eski alev fotometrik dedektörleri (FPD) sadece sülfür ve fosfor için seçici iken yeni geliştirilen PFPD, başta sülfür ve fosforun yanı sıra N, Ga, Sn, Se, Ge, Te, Sb, Br, As, In ve Cu için de seçicidir. Alev fotometrede olduğu gibi PFPD’de de bir yanma odacığı (veya yakma tüpü) ve bir fotoçoğaltıcı tüp bulunur; farklı olarak ise iki tane gaz akımı girişi vardır. İkinci gaz akımı, yanma işleminde analit emisyon parlaklığını düzeltmede kullanılır. PFPD’nin üst kısmındaki yakma teli sürekli olarak kızgın (kırmızı) haldedir. Gazlar ve kolondan gelen akım yakıcının içine akar ve burada alevlenebilir karışım oranına ulaştıklarında yakma teli tarafından yakılır ve alev geriye, yakma tüpüne döner. Yakma tüpünde bulunan kolay alevlenebilir tüm maddeleri 10 milisaniyeden daha kısa bir sürede süratle yakar. Bu kısa alev pulsundan sonra daha zor alevlenebilen analitler uyarılır ve elementlerinin özelliklerine uygun emisyon oluşur. Bu aşamalar esnasında fotoçoğaltıcı tüp, yakma odacığındaki olaylar sonucu analitten yayılan emisyonu kaydeder. 300 milisaniye sonra, giriş tüpleri ve kolondan yeni bir akım gelir, alev pulsu ile aynı işlemler tekrarlanır. Saniyede üç alev pulsu kaydedilecek şekilde işlem devam eder.

β -Işını İyonizasyon Dedektörü: β -ışını dedektörü üretilen ilk iyonizasyon dedektörü (1956) olup; içinden saf taşıyıcı gazın geçtiği bir referans hücre ile kolon akımını taşıyan bir sensör hücreden oluşur. Her hücrede, β emisyonu veren ve üç kademeli fisyon işlemiyle kararlı Zr(90) atomuna dönüşen stronsyum (90) kaynağı bulunur. Bu sırada iyonizasyon akımları birbirlerini yok edecek, yani sistemi dengede tutacak yönlerde düzenlenir. Bu durumda dengede olan iki hücrede meydana gelebilecek küçük bir basınç veya sıcaklık farkı bile dengeyi bozar. Test edilecek maddeyi içeren kolon akımının bulunduğu hücrede oluşan diferensiyel sinyal amplifiye edilir ve kaydedilir.

Termiyonik İyonizasyon Dedektörü: Isıtılan bir filamentten üretilen elektronlar uygun bir potansiyel ile hızlandırıldığında, yolu üzerindeki herhangi bir gaz veya buhar moleküllerini iyonlaştırabilecek kadar enerjiye sahip olur. Bu bakış açısıyla, gaz kromatografi çalışmalarının ilk yıllarında (1957), standart bir vakum iyonizasyon geyci modifiye edilerek bir GC dedektörü olarak kullanılabilir hale getirilmiştir. Algılayıcı, içinde bir filament, ızgara toplayıcı-elektrot ve anot bulunan bir vakum tüpüdür; şekil olarak termiyonik triod valfe benzer. Tüp vakum altında çalışır; kolon akımını alabilecek ayarlanabilir bir giriş deliği vardır. Taşıyıcı gaz olarak helyum kullanılır. Dedektörün cevabı, içindeki gazın basıncı ile orantılıdır (0.02-1 5 mm Hg).

Argon İyonizasyon Dedektörleri: İlk iyonizasyon dedektörlerini takiben pek çok organik bileşiği dahi iyonize edebilecek yeterli enerjiye sahip yarı-kararlı (metastabil) atomlar üretebilen asal gazlar kullanılarak tamamen farklı prensiplere göre çalışan iyonizasyon dedektörleri geliştirilmiştir. Metastabil atomlar yüksüzdür, fakat dış orbitteki bir elektronun yer değiştirmesi sırasında çarpışmalarla oluşan yüksek enerjiyi absorplar. Metastabil atom bir organik bileşiğe çarptığında absorpladığı enerjiyi (11.6 eV kadar) moleküle aktarır; sonuçta, elektronu orijinal orbitine dönerken molekülden de bir elektron kopar. Bu işlemle üretilen elektronlar anot akımında büyük bir artış meydana getirirler. 11.6 eV enerji pek çok organik maddeyi iyonlaştırmaya yeterli bir enerjidir. Bu grupta toplanabilen dedektörler; basit veya makro, mikro ve termal argon dedektörleridir.

Helyum İyonizasyon Dedektörü (HID): Helyum iyonizasyon dedektörün kullanım alanı oldukça yaygındır. Özellikle NO_x , CO, CO_2 , O_2 , N_2 , ve H_2 gibi, FID ve diğer dedektörler tarafından algılanamayan inorganik uçucu bileşiklerin tayininde kullanılır. Helyum atomunun iyonlaşması için radyoaktif bir kaynak kullanılır. Taşıyıcı gaz helyumdur. Gaz kromatografi cihazından çıkan akım helyum iyonlarıyla karıştırılarak bileşenlerin iyonlaşmaları sağlanır. Bu iyonlar bir elektrik akımı yaratırlar; iyon miktarı ne kadar fazla ise o kadar büyük akımlar meydana gelir. HID'ler algılayacakları bileşiği bozmaz veya tüketmez; bu nedenle birden fazla dedektör kullanılması gereken sistemlerde diğer dedektörlerin önünde olacak şekilde yerleştirilir. Helyum dedektörü, argon dedektörü prensibine göre çalışır ve metastabil helyum atomu hızlandırılmış elektronlar tarafından üretilir; enerjileri 19.8 ve 20.6 eV civarında olduğundan kolayca iyonlaşırlar ve kararlı gazları ve diğer uçucu bileşikleri algılayabilirler. HID'lerde, radyoaktif bir kaynak kullanılmadan da elektron üretimi yapılabilir. Elektronlar, bir elektrik deşarjıyla veya fotometrik olarak üretilir, uygun bir potansiyel altında bir inert gaz atmosferinde hızlandırılır ve helyumla karşılaştırılarak metastabil helyum atomlar üretilir.

Pulslu helyum deşarj iyonizasyon dedektörü: Pulslu helyum deşarj dedektöründe üst kısım çapı 1,6 m deşarj bölgesi olan bir tüp ve alt kısım ise metastabil helyum atomları ve fotonların oluştuğu 3 mm çaplı bir tüp olmak üzere iki bölümden oluşur. Helyum takviye gaz dedektörün üst kısmından girer deşarj kısmına geçer. Deşarj elektrotlara potansiyel uygulandığında elektronlar yüksek enerjili fotonlar ve biraz da metastabil helyum atomları üretilir.

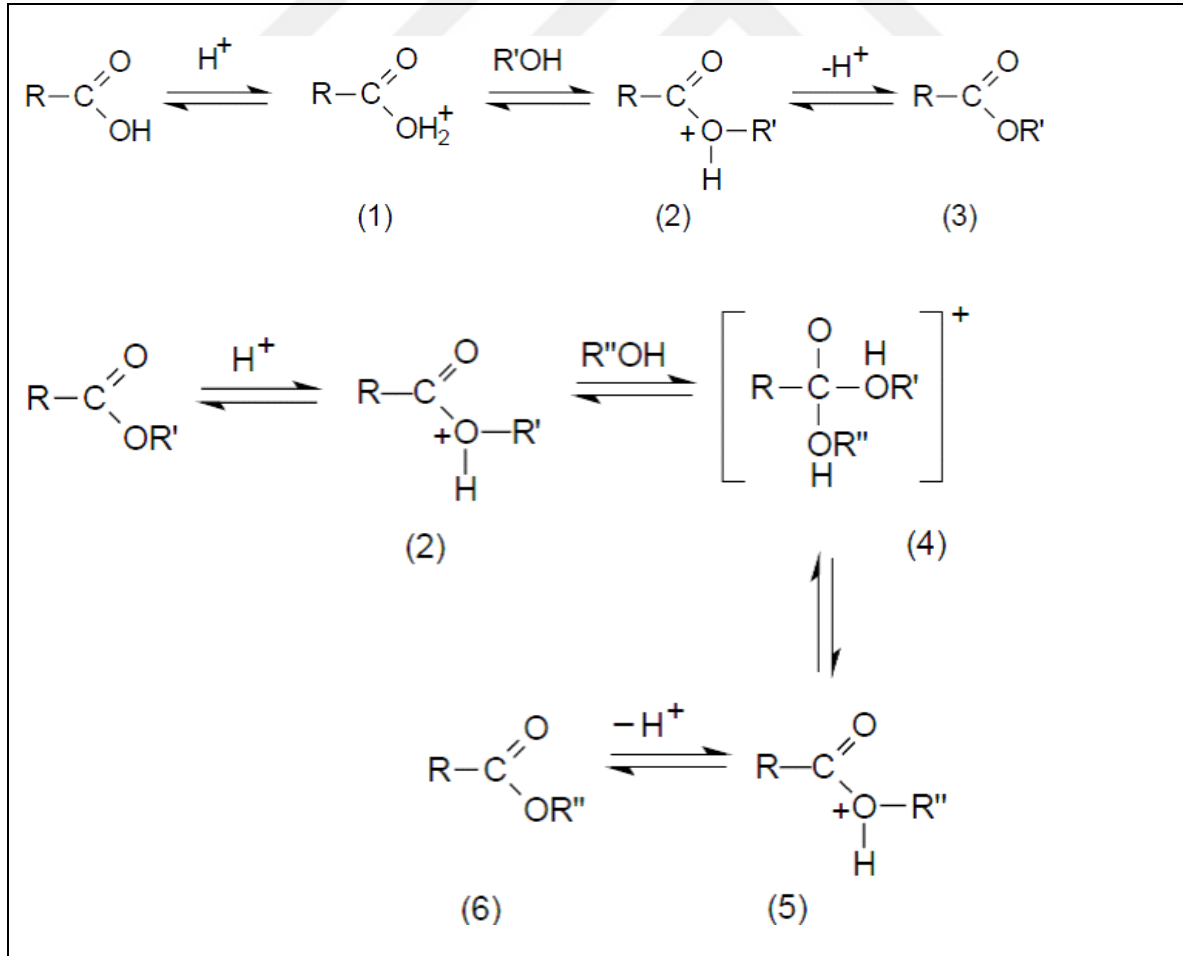
Pulsu Deşarj Elektron Yakalama İyonizasyon Dedektörü: Pulsu elektron yakalama dedektörü, pulslu deşarj helyum iyonizasyon dedektörünün gelişmiş bir tipidir. Çalışma prensibi, geleneksel elektron yakalama dedektörüne benzer; fakat elektron üretim yöntemi daha farklıdır. Dedektör iki kısımdan oluşur; üst kısım deşarj olayının meydana geldiği çapı daha küçük olan bir bölmedir. Alt kısım kolon akımında elektron yakalama işleminin meydana geldiği geniş çaplı bir bölmedir. Elektrotlar arasına potansiyel uygulandığında, deşarjla elektronlar, yüksek enerjili fotonlar ve bir miktar da metastabil helyum atomları meydana getirir. Propanla doplanmış helyum ikinci elektrodun tam altından girer ve metastabil atomların parçalanmasıyla ve fotonlar tarafından elektronlar üretilir.

Radyoaktivite Dedektörü: Radyoaktif dedektörlerin iki tipi vardır; biri sadece ^{13}C ölçer, diğeri ^{13}C ve ^3H ölçer. Her iki türdede de taşıyıcı gaz olarak helyum veya argon kullanılabilir; kolon akımı, bakır oksit doldurulmuş bir fırına gönderilir. Bu fırında tüm maddeler oksitlenerek karbon dioksit ve su oluşturur. Sadece ^{13}C 'ün sayılması istendiğinde yanma ürünleri bir kurutma tüpünden geçirilir, sonra %10 propan karıştırılır ve sayıcı tüpe gönderilir. Sayıcı tüpte radyoaktif tanecikler tarafından iyonlaşır ve elektronlar üretilir ve anoda doğru hızlandırılır. Böylece aynı işlemler devam ederek taşıyıcı gazın iyonizasyonu ilerler ve alınan sinyal artar. Bu reaksiyonlar kararlı bir deşarj oluştuğunda sonlanır. Reaksiyonların durmaması için ortamın soğutulması gerekir; bu iş akıma karıştırılan soğutucu gaz olan propan ile gerçekleştirilir. Sayıcı tüp metal bir silindirdir, merkezinde izole edilmiş çubuk şeklinde bir elektrot bulunur. Dışı topraklanan kasa ve merkez elektron arasına yüksek potansiyel uygulanır. Sayıcıdan alınan sinyal zamana göre integre (toplanır) edilir ve böylece integratörden çıkış akımı, saniyede meydana gelen parçalanma sayısı ile orantılıdır. ^{13}C ve ^3H 'in birarada sayılması istendiğinde, kolon akımındaki maddelerin tümünün karbon ve suya dönüşmesinden sonra, gaz akımına bir miktar hidrojen ilave edilir ve diğeri bir fırındaki ısıtılmış demir tozlarından geçirilir. Bu fırında karışımındaki hidrojenler ve trityuma indirgenir. Ayrıca, hidrojenin fazlası sistemdeki adsorbif uçları doyurarak trityumun adsorblanmasını minimum düzeye düşürür. Sonra çıkış gazı, %10 propan ile karıştırılır ve sonra sayıcıya gönderilir bundan sonrası için işlem ^{13}C de olduğu gibi devam eder; sonuçta, hem ^3H ve hem de ^{13}C sayılır.

2.6. Numune Hazırlama Yöntemleri

2.6.1. Türevlendirme

Türevlendirme, kromatografik seçiciliği ve duyarlılığı arttırmaya yönelik olarak yapılan kimyasal işlemlerdir. GC ile yapılan çalışmalarda bileşiklerin termal kararlılığının artırılması, bileşiklerin uçucu hale getirilmesi için türevlendirme gerekmektedir. Özellikle $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$, $-\text{NH}$ ve $-\text{SH}$ gibi polar fonksiyonel gruplar içeren bileşikler kendi aralarında hidrojen bağı yaptıklarından gaz kromatografi analizleri için uçuculukları yetersiz olmakta veya kolon ile etkileşime girmeleri söz konusu olabilmektedir. Bileşiklerdeki polar gruplar üzerinden alkilleme, açılma ve sililleme tepkimeleri ile türevlendirme yapılarak bileşikler uçucu hale getirilerek gaz kromatografik analizleri yapılabilir. Karboksilik asitler katalizör varlığında (asit, baz) alkollerle esterleşme reaksiyonu vererek uçucu türlere dönüşürler (Şekil 2.16) [67, 68].



Şekil 2.16. a) Karboksilik asitlerinin asit katalizli esterleşme reaksiyonu [42] b) Asit katalizli transesterleşme [68]

Şekil 2.16.a’da ilk basamakta asitin proton vermesiyle oksonyum iyonu oluşuktan sonra (1) alkolün nükleofilik atağı ile bir ara basamak oluşarak (2) susuz ortamda estere dönüşür (3). Karboksilik asitlerin asit katalizli esterleştirilmesi ya da trans esterleştirilmesinde ortamda alkolün fazlasının olması gerekirken suyun ortamdaki uzaklaştırılması gerekir. Ortamda suyun bulunması halinde kararsız ara basamak üzerinden tekrar karboksilik asit oluşur. Reaksiyon ortamından suyun uzaklaştırılması için susuz sodyum sülfat kullanılır.

Yağ asitlerinin gaz kromatografi ile analizinde yağ asitlerini uçucucu türevlerine dönüştürmek gerekir. Yağ asitlerinin –COOH fonksiyonel grubu üzerinden asit katalizli esterleştirme reaksiyonu pratik olarak kullanışlıdır ve reaksiyon gerçekleşirken istenmeyen yan ürünlerin oluşumu minimumdur. Pratikte bu yöntemde bütün alkoller kullanılabilirken alkolün fazlasını reaksiyon ortamından buharlaştırarak kolaylıkla uzaklaştırmak için metil alkol ya da etil alkol tercih edilir. Serbest yağ asitlerinin etanol, metanol gibi düşük molekül ağırlıklı alkollerle esterleşmesi asit ya da alkali ortamda sıcaklığa ve reaktifin içeriğine bağlı olarak kolayca meydana gelir.

2.6.2. Sıvı Faz Mikroekstraksiyon Teknikleri (LPME)

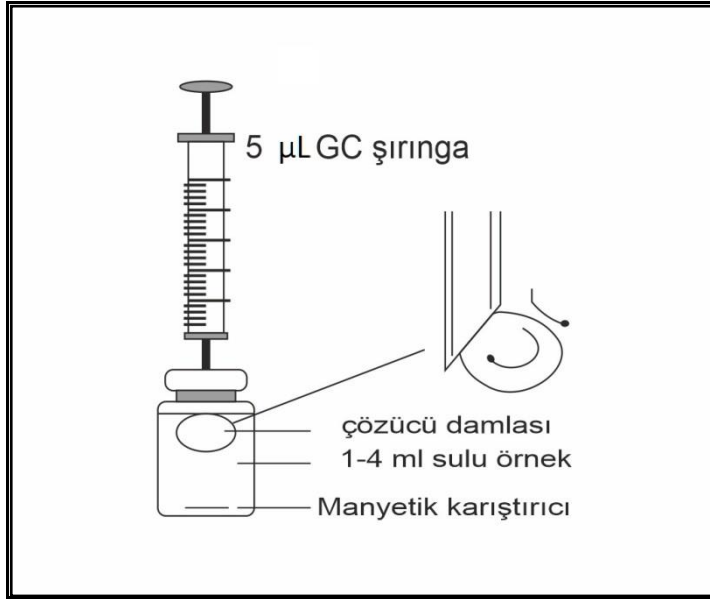
Hassas, doğru ve hızlı analizler için yeni cihazlar geliştirilmesine rağmen karmaşık matris varlığında örneklerin analizinde bu cihazlar yetersiz kalabilmektedir. Bu nedenle matris ortamından analitleri ayırmak ve zenginleştirmek için genellikle ön işlem uygulanmaktadır. Örnek hazırlamanın amacı numuneyi analitik sisteme göndermeden önce saflaştırıp deriştirmektir. Analitik örnek hazırlama yöntemleri çeşitli basamaklardan oluşmaktadır. Yöntemlerin çoğunda fazla miktarda kimyasal ve zaman harcanmaktadır [67]. Son yıllarda örnek hazırlama basamaklarını basitleştirmek, küçültmek ve kullanılan çözücülerin miktarlarını azaltmak için farklı ekstraksiyon teknikleri geliştirilmiştir [69]. Akışa enjeksiyon ekstraksiyon, katı faz ekstraksiyon bu dezavantajları ortadan kaldırmak için geliştirilmiş yöntemlerdir. Sıvı- sıvı ekstraksiyon (LLE) yöntemi çok tercih edilen klasik bir örnek hazırlama yöntemi olmasına rağmen zaman alıcı olması ve çok fazla organik çözücü kullanımı gerektirmesi yöntemin dezavantajıdır. Çok kullanılan diğer bir örnek hazırlama yöntemi ise katı faz mikroekstraksiyon (SPME) yöntemi olup LLE yöntemine göre daha az çözücü kullanımı gerektirir fakat karmaşık ekstraksiyon basamaklarını içerir. Bu dezavantajlar nedeniyle daha kolay uygulanabilir, ekstraksiyon basamaklarını basitleştiren, otomasyon imkânı sağlayan, organik çözücü kullanımını μL

seviyelerine indiren, daha iyi zenginleştirme imkânı sağlayan, gaz kromatografi, kapilarelektroforez ve yüksek performanslı sıvı kromatografi ile uyumlu mikroekstraksiyon yöntemlerine ilgi artmıştır. Single drop mikroekstraksiyon (SDME) ucuz, çok fazla aşama içermeyen, kolay uygulanabilir, çok az çözücü kullanımı ve analitik sistemde direkt çalışılan bir ön zenginleştirme şekli olması nedeniyle sıvı faz mikroekstraksiyon teknikleri içerisinde en çok tercih edilen yöntemdir. Gaz kromatografide, indüktif eşleşmiş plazma kütle spektrometrisinde, kapiler elektroforezde ve elektrotermal atomik absorpsiyon spektrometresinde kolaylıkla uygulanabilir [70]. Günümüzde kullanılan farklı LPME yaklaşımları aşağıdaki şekilde özetlenebilir [71, 29].

- 1- Tek damla mikroekstraksiyon (SDME)
 - Doğrudan daldırma tek damla mikroekstraksiyon (DI-SDME)
 - Tepe boşluk (head space) tek damla mikroekstraksiyon (HS-SDME)
 - Sıvı-sıvı-sıvı mikroekstraksiyon (LLLME)
 - Sürekli akış mikroekstraksiyon (CFME)
- 2- Dispersif sıvı-sıvı damla mikroekstraksiyon (DLLME)
- 3- Katı damla mikroekstraksiyon
- 4- Oyuk fiber sıvı faz mikroekstraksiyon (HF-LPME)
- 5- Doğrudan askıda damla mikroekstraksiyonu (DSDME)

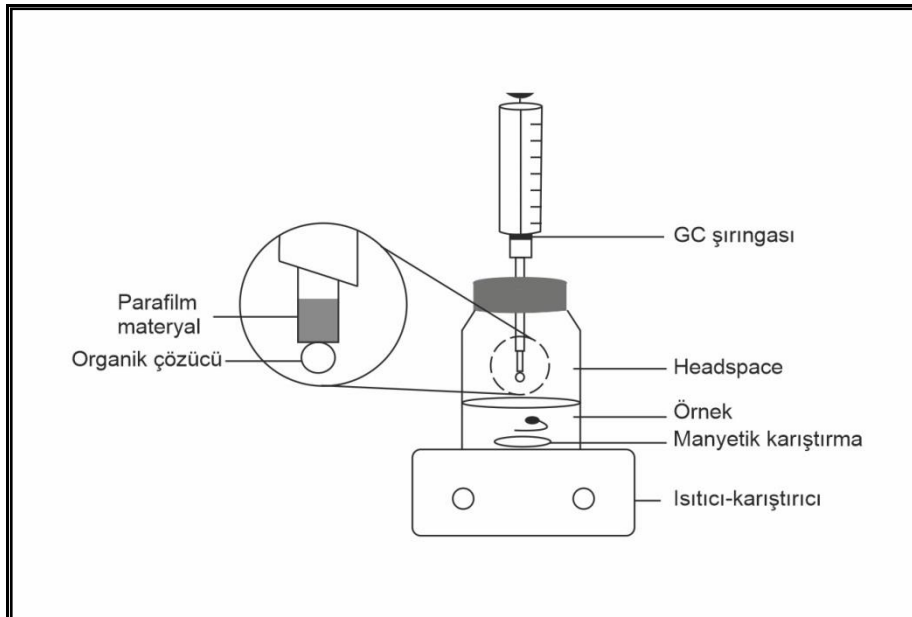
Tek Damla Mikroekstraksiyon (SDME): Mikro şırınga ile 1-10 µl hacminde organik çözücü damlacığı ekstraksiyon ortamında tutulur. Ekstraksiyon sonrası organik çözücü mikroşırıngaya tekrar geri çekilir ve analiz edilir.

DI-SDME yönteminde su ile karışmayan organik çözücünün enjektör ucunda oluşturulan damlası sulu örneğin içinde tutulur (Şekil 2.17). Bu yöntem sulu örnekteki apolar veya ortapolar analitlere uygulanabilir, damlacığın koparak çözeltiye karışma olasılığı vardır [72].



Şekil 2.17. Doğrudan daldırma tek damla mikroekstraksiyon (DI-SDME) yöntemi [73]

HS-SDME yöntemi uçucu organik bileşiklerin zenginleştirmesinde kullanılır. Yöntem uygun çözücünün mikro damlasının örnek çözeltinin üst kısmındaki boşluğa (headspace) yerleştirilip uçucu analitlerin mikro çözücüde ekstrakte edilmesine dayanır (Şekil 2.18). Bu yöntemde sulu ortam, gaz fazı ve organik damla olmak üzere üç faz söz konusudur. Yöntemde karmaşık matrislerde analitin kolaylıkla matristen uzaklaştırılması sağlanır [74].



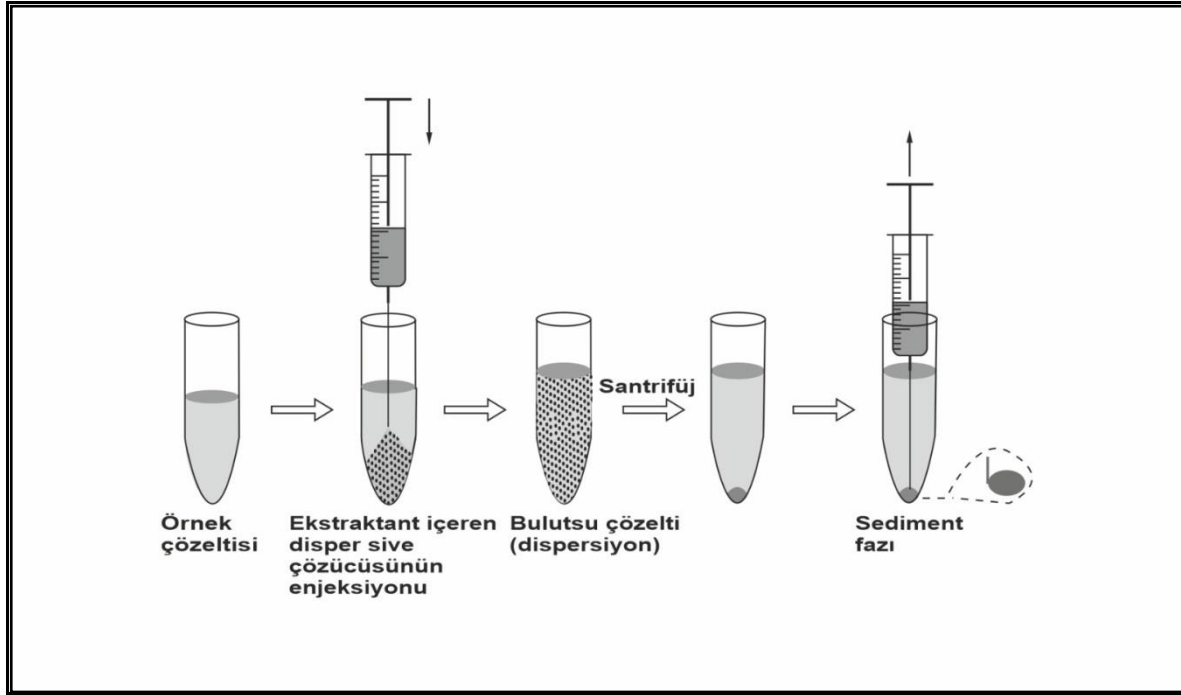
Şekil 2.18. Tepe boşluk tek damla mikroekstraksiyon (HS-SDME) yöntemi [73]

Sıvı-sıvı-sıvı mikroekstraksiyon (LLLME) tekniği asidik ve bazik analitlerin ekstraksiyonu için iki basamakta gerçekleştirilen bir yöntemdir. İlk basamakta iyonlaşabilen analitler pH'nın ayarlanması yapılarak moleküler forma getirilir ve organik faza alınır. İkinci basamakta ise analitler iyonlaşabilecekleri pH'lara ayarlanmış geri ekstraksiyon çözeltisi kullanılarak sulu faza alınarak sıvı kromatografi veya kapiler elektroforez ile analiz edilir. En sık kullanılan organik çözücüler 1-oktanol, n-oktan ve tolüendir [75].

Sürekli akış mikroekstraksiyon tekniğinde (CFME), ekstraksiyon çözücü damlacığı sürekli akış halinde olan örnek çözelti ile temas halindedir. Örnek çözelti sürekli akarken ekstraksiyon çözücü damlası ekstraksiyon işlemini gerçekleştirir [76, 77].

Dispersif Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyon (DLLME): Organik ve inorganik bileşiklerin sudan ekstraksiyonu ve analitlerin zenginleştirilmesi amacıyla uygulanır. Mikrolitre seviyesinde çözücünün kullanıldığı bir sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemidir. Ekstraksiyon, ekstraksiyon çözücüsü ve örnek çözelti arasındaki dağılım dengesine dayanır. Dağılım katsayısı (K), ekstraksiyon çözücüsündeki ve örnek çözeltisindeki analit derişimlerinin oranıdır. Yöntem yüksek veya orta derecede lipofilik özellikteki ($K > 500$) analitler için uygulanabilir ve yüksek derecede hidrofilik özellikteki nötr alanalitler için uygun değildir. Asidik ya da bazik analitlerin dağılım katsayısı, örnek çözeltisinin pH değerinin kontrol edilmesiyle artırılabilir.

DLLME yönteminde özkütlesi yüksek organik bir çözücü ekstraksiyon çözücüsü olarak, hem ekstraksiyon çözücüsü hem de suyla karışabilen bir çözücü dispersif olarak kullanılır. Ekstraksiyon çözücüsü ve dispersif çözücü karışımı sulu örneğe hızlı bir şekilde enjekte edildiğinde yüksek bir türbülans oluşur. Bu türbülans sulu çözeltide organik çözücü damlacıklarının oluşmasına neden olur. Bulutsu çözeltinin oluşmasından sonra ekstraksiyon çözücüsü ile sulu örnek arasındaki yüzey alanı çok büyüktür. Bu nedenle dengeye çabuk ulaşılır ve ekstraksiyon süresi kısadır. Bulutsu çözeltinin santrifüjünden sonra tüpün dibinde çökelek çöker ve uygun bir analitik teknik kullanılarak çökelek analiz edilir (Şekil 2.19) [74, 78].



Şekil 2.19. Dispersive sıvı-sıvı ekstraksiyon [79]

DLLME yönteminde ekstraksiyon çözücüsünün özellikleri;

1. Ekstraksiyon çözücüsünün sulu fazdan santrifüjle ayrılabilmesi için özkütlesi sudan büyük olmalıdır (klorobenzen, kloroform, karbontetraklorür ve tetrakloroetilen gibi halojenürlü hidrokarbonlar).
2. Analitleri ekstre edebilmelidir.
3. İyi kromatografik davranış göstermeli ve sudaki çözünürlüğü az olmalıdır [80].

Ekstraksiyon çözücü hacminin ön deriştirme faktörü üzerinde etkisi büyüktür. Çözücü hacminin artmasıyla santrifüjden sonra elde edilen organik faz hacmi artar ve analitin organik fazdaki derişimi azalır. Ekstraksiyon geri kazanımı sabit kalırken önderiştirme faktörü düşer ve duyarlık azalır. Bu yüzden ekstraksiyon çözücü hacmi hem yüksek önderiştirme faktörü sağlamalıdır, hem de santrifüjden sonraki basamaklar için hacmin yeterli olması gerekir. DLLME işlemlerinde genellikle 5-100 μ l ekstraksiyon çözücüsü kullanılır [80].

Ekstraksiyon çözücüsünün sulu fazda küçük damlalar halinde dağılması ve bulutsu çözeltinin oluşması için dispersif çözücünün ekstraksiyon çözücüsünde çözünmesi ve suyla karışabilir olması gerekir. Böylece ekstraksiyon çözücüsü ve sulu faz arasındaki yüzey

alanı büyük olur ve ekstraksiyon verimi artar. Aseton, metanol, asetonitril dispersif çözücü olarak kullanılır [45].

Dispersif çözücü hacmi, bulutsu çözeltinin oluşumunu, ekstraksiyon çözücüsünün sulu fazda dağılma derecesini yani ekstraksiyon verimini etkiler. Dispersif çözücü hacminin değişmesi çökelek miktarını değiştirir ve genellikle 0,5-1,5 ml dispersif çözücü kullanılır. İyi bir bulutsu çözelti elde etmek için gerekli uygun dispersif çözücü hacmi hem sulu fazın hem de ekstraksiyon çözücüsünün hacmine bağlıdır [80].

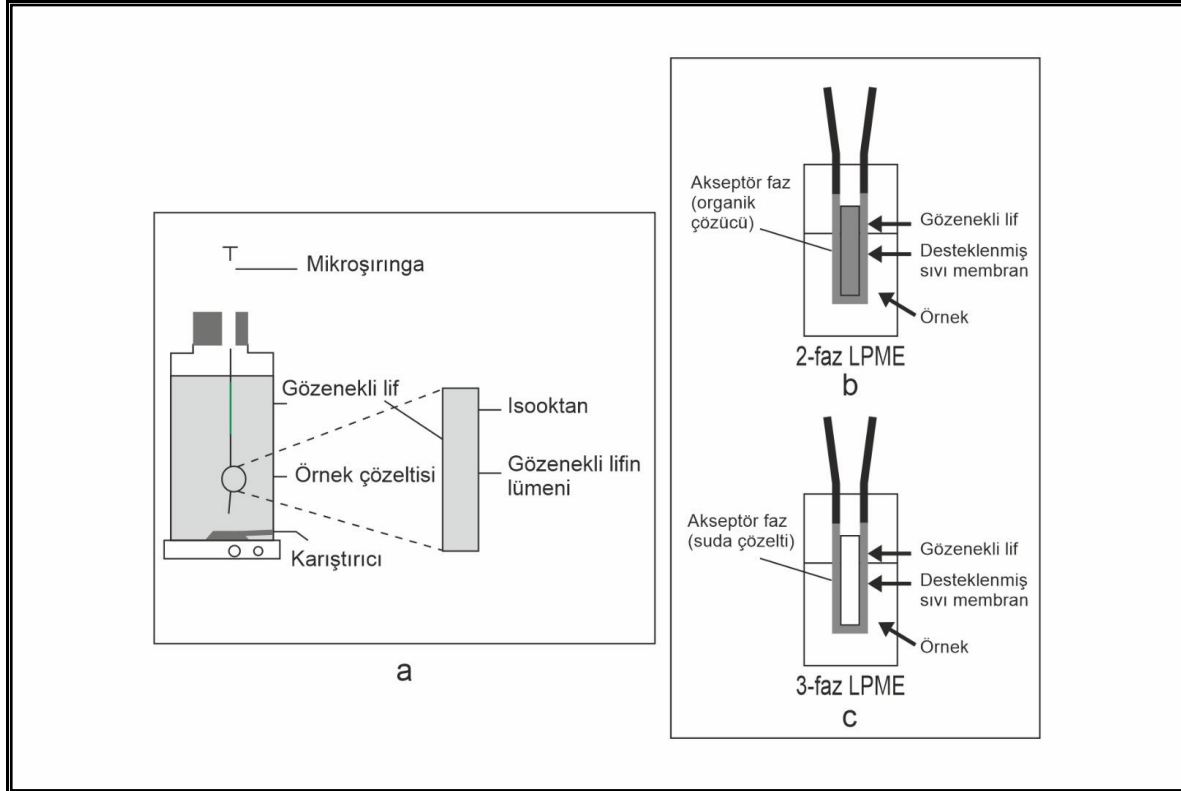
Ekstraksiyon süresi ve iyonik şiddet ekstraksiyon verimini etkileyen diğer faktörlerdir. DLLME’de ekstraksiyon süresi, dispersif çözücü-ekstraksiyon çözücü karışımının örneğe enjekte edilmesiyle santrifüje başlamadan önceki zaman aralığı olarak tanımlanır. Analitin ve ekstraksiyon çözücüsünün sulu fazdaki çözünürlüğü genellikle iyonik şiddetin artmasıyla azalır. Bu olay yüksek geri kazanım için faydalıdır. Bununla birlikte elde edilen organik fazın miktarı artar, bu da analit derişiminin ve önderiştirme faktörünün azalmasına neden olur [80, 81].

Katı damla mikroekstraksiyon: Katılaşıarak yüzen organik damla oluşumuna bağlı sıvı-sıvı mikroekstraksiyon tekniğinde organik çözücü damlasını tutmak için özel bir aparat gerekmemektedir. Analitleri içeren sulu çözelti tüpe aktarılır, donma noktası oda sıcaklığına yakın olan (1-undekanol, 1-dodekanol, difenileter gibi) organik çözücünün aktarılmasından sonra karışım soğutulularak organik çözücünün katılaşması sağlanır. Katılaştıran organik çözücü uygun bir teknik ile viale aktarılıp doğrudan veya dolaylı olarak analitik cihazlara enjekte edilir [82, 79].

Gözenekli lif sıvı faz mikroekstraksiyon (HF-LPME): Tek kullanımlık, polipropilenden üretilmiş gözenekli, oyuk liflerin kullanıldığı mikroekstraksiyon yönteminde oyuk fiberin lumen olarak adlandırılan kısmında birkaç mikrolitre hacminde organik çözücü bulunur ve mikro ekstraktant çözücüsü örnek çözeltisi ile doğrudan temas etmez [83, 84].

Ekstraksiyon öncesi gözenekli lif, su ile karışmayan bir organik çözücüye daldırılır. Bu işlem ile bu organik çözücü liflerin gözeneklerinin içine yerleşerek lifin duvarlarında ince bir tabaka oluşturur. Daha sonra lumen kısmı akseptör çözelti ile doldurulur. Akseptör çözelti, organik çözücü (iki fazlı sistem) olabileceği gibi asidik veya bazik sulu çözelti de

(üç fazlı sistem) olabilir. Bu şekilde hazırlanmış gözenekli lif, analitlerin bulunduğu sulu çözelti kabına yerleştirilir. Ekstraksiyonu hızlandırmak için örnek çözeltisi sürekli karıştırılır. Analitler sulu çözeltiden porlardaki organik faz aracılığıyla ekstrakte olur. Sonra da lumen içindeki akseptör çözeltiliye geçer (Şekil 2.20) [85, 86].



Şekil 2.20. Gözenekli lif ekstraksiyon yöntemi (a) İki faz [87] (b) üç faz (c) LPME sistemi [85]

Doğrudan askıda damlacık mikroekstraksiyon (DSDME): Doğrudan askıda damla mikroekstraksiyon (DSDME) olarak isimlendirdirilen yeni bir mikroekstraksiyon yöntemidir [88, 89]. Bu yöntemde, bir manyetik karıştırıcı sulu örnek içeren bir kabın dibine yerleştirilerek düşük girdaplı bir karıştırma sağlanır. Eğer suyla karışmayan organik damla, sulu örneğin yüzeyine yerleştirilirse damla girdaba yakın veya merkezine yerleştirilmiş olur. Kütle transferi gerçekleşirken damla da sulu fazın yüzeyinde kendi etrafında döner. Bu yöntem diğer LPME sistemleri ile karşılaştırıldığında, işlemsel parametrelerin seçiminde, özellikle organik çözücü miktarında ve karıştırma hızı parametrelerinde daha çok esneklik sağlar. DSDME organik çözücünün büyük hacimlerinin de kullanımına izin verdiği için GC'nin yanı sıra HPLC sistemleri ile de kullanılabilir [82, 90].

2.7. Yağ Asitlerinin Analizi

Yağ asitlerinin analizinde GC-FID ve GC-MS en çok kullanılan yöntemlerdendir. GC-MS ile konjuge yağ asiti izomerlerinin kantitatif analizi mümkündür. Ecker J. ve ekibi [91] çalışmalarında yağ asitlerinin metilasyonunu asetil klorür ve metanol transesterifikasyonu ile gerçekleştirmişler, cis/trans izomerizasyonunun önlenmesi için türevlendirme sıcaklığını 95 °C den oda sıcaklığına düşürerek karbon uzunluğu C8-C28 arasında olan geometrik ve yapı izomerlerini kısa ve polar ciyano kolon kullanarak GC-MS ile 17,2 dak da analiz etmişlerdir. C20:2 (n-6) ve C21:0 gibi kısmi olarak çıkan yağ asitleri metil esterler ise selected ion monitoring (SIM) ile çözümlenmiştir. Bu yöntem, hem klinik çalışmalar hem de kararlı izotop bileşiklerinin uygulanmasını içeren temel araştırmalar için uygundur.

Kısa zincirli yağ asitleri, insan kalın barsağındaki bakteriyel metabolizmanın temel ürünü olup karbonhidratların bakteriler tarafından fermentasyonu sonucu oluşur ve miktarları insan sağlığı hakkında bilgi verir. Kim H. ve ekibi [92] mikrobiyal örneklerdeki kısa zincirli yağ asitlerini asit modifiye polietilen glikol kolon kullanılarak gaz kromatografi alev iyonlaştırma dedektörü ile analiz etmişlerdir. Gaz kromatografi analizinden önce yağ asitleri aminopropil kolonda etil eter:heksan (1:1 h/h) çözücüsü ile ekstre edilmiştir.

Bicalho B. ve ekibi [93] kandaki yağ fraksiyonlarında bulunan yağ asitlerini kapiler kromatografi (CGC) ile birleştirilmiş kütle spektrometre (MS) ile tayin etmişlerdir. Parmak ucundan alınan (50 µl) kan örneğindeki yağ asitleri metil alkol ile esterleştirilerek 100 m × 0,25 mm iç çaplı bis-siyanopropil polisiloksan (HP-88) kolon ile analiz edilmiştir. Elektron impakt (EI) ve pozitif kimyasal iyonlaştırma (PCI) kütle spektrometre kombinasyonu ile yağ asitleri alkil uzunluğu, doymamışlık derecesi, alıkonma zamanlarına göre belirlenmiştir. Solvent venting modda programlanabilir sıcaklık buharlaştırma enjektörü (PTV) ile çok küçük miktardaki örneklerin yüksek duyarlılıkta, 60 dak da analizi yapılmıştır. Bu çalışma metabolomik çalışmalara uygulanacak çok sayıda yağ asidi metil esteri alıkonma zamanları ve kütle spektral bilgileri ile yapılmıştır.

Yağ asitleri organizmalarda anahtar moleküller olup eikosanoid, prostaglandin ve leukodrin başta olmak üzere lipid bloklarından oluşarak hücre membran yapısında yer alırlar ve metabolik fonksiyonlarda enerji kaynağıdır. Bu çalışmada trigliserid, fosfolipid

ve kolesterol gibi farklı tür lipidlerin erterleştirme şartları karşılaştırılmıştır. Çalışmada yağ asitlerinin esterleştirilmesi 90 °C’de %2 H₂SO₄, %5 H₂SO₄, %5 asetil klorür, %10 asetil klorür, %14 BF₃ ve %5 HCl katalizli metanol ortamında gerçekleştirilmiştir. %5 asetil klorür ve %2 H₂SO₄ kullanıldığında daha iyi pik alanları elde edilmiştir [93].

Fosfolipid yağ asitleri (PLFA), çevresel örneklerdeki mikrobiyal toplulukların belirlenmesi için kullanılan biyobelirteçlerdir. PLFA’lerin ekstraksiyonu ester türevinin oluşturulması yöntemleri, standart olmayan fakat yaygın olarak yapılan çalışmalardır. Metil esterinin oluşturulmasında HCl/MeOH, KOH/MeOH ya da her ikisi birlikte kullanılabilir. Chowdhury T. R. ve ekibinin yaptığı çalışmada [94] topraktaki mikrobiyal profili değerlendirilirken katalizör türünün metilasyona etkisi incelenmiştir. Sulak arazilerde, sel baskınına uğramış arazilerde ve bunlara yakın olan yüksek bölgelerden alınan topraklardaki yağ asitleri ekstre edilerek HCl/MeOH ve KOH/MeOH katalizli metilasyon sonrası PLFA analiz edilmiştir. HCl/MeOH ile yapılan metilasyonda PLFA derişimi KOH/MeOH ile yapılan metilasyona göre daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca metil grupları içeren yağ asitleri HCl/MeOH katalizörü kullanıldığında belirlenemezken KOH/MeOH katalizörü ile kolaylıkla analiz edilebilmiştir.

Bal Y. ve ekibi [95] Zanthoxyli Semende bulunan palmitik asit, stearik asit, oleik asit, linoleik asit ve alfa linoleik asiti katı faz mikroekstraksiyon yöntemi ile zenginleştirilerek GC-FID dedektörü ile PEG-2M (30mx0,25mm 0,5 µl) kolon kullanılarak analiz etmişlerdir. Sıcaklık programı 170 °C’den başlatılıp dakikada 5 °C artarak 190 °C’ye çıkarılmış ve 10 dakika beklendikten sonra dakikada 5 °C artışla 210 °C’ye yükselttilip 5 dakika beklenmiştir. İnlet sıcaklığı 250 °C, dedektör sıcaklığı 250 °C, bölücü oranı 25:1’de analiz gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon verimini etkileyen ekstraksiyon çözeltisi (n-dodekanol) ve hacmi (20 µl), ekstraksiyon süresi (20 dak), karıştırma hızı (700 rpm), tuz derişimi (%10 NaCl) ve örnek miktarı (60 µl) gibi parametreler optimize edilerek en uygun ekstraksiyon şartları belirlenmiştir. γ-linolenik asit klasik sıvı-sıvı ekstraksiyon sonrası gaz kromatografi ile analiz edilmiş ve sonuçlar katı damla mikroekstraksiyon (SFODLPME) ile karşılaştırılmıştır. Doğruluk ve kesinlik parametreleri karşılaştırıldığında anlamlı fark olmadığı fakat çözücü hacminin az ve ekstraksiyon süresinin kısa olması nedeni ile katı damla mikroekstraksiyon yöntemi tercih edilmiştir.

Wejnerowska G.'nın yaptığı çalışmada [96] tek damlacık mikroekstraksiyon yöntemi kullanarak su içerisindeki uçucu yağ asitlerini (C2-C7) GC-FID ile analiz etmişlerdir. Mikroekstraksiyon çözücüsü (karbon tetra klorür) ile birlikte iç standart olarak kullanılan linoleik asit metil esterinden oluşan 2 µl damla sulu çözeltiye batırılarak doğrudan daldırma (DI-SDME) yöntemi ile ekstrakte etmişlerdir. Ekstraksiyon süresi (13 dakika), karıştırma hızı (500 rpm), örnek pH'sı (3), sıcaklık (oda sıcaklığında) ve iyonik güç (%4 NaCl) parametreleri optimize edilmiştir. Ekstraksiyondan sonra N-metil-N-(tersiyer-butildimetilsilil) trifloro aset amid ile sililleme tepkimesi sonunda gaz kromatografi analizi yapılmıştır.

Chen Y. ve ekibinin [97] yaptığı çalışmada kompleks matriks içindeki kısa zincirli yağ asitlerinin (SCFA) belirlenmesi için yağ asitlerinin esterleştirilmesi ve tepe boşluklu tek damla mikroekstraksiyon (HS-SDME) örnek hazırlama yöntemi geliştirilmiştir. Kısa zincirli yağ asitlerinin HS-SDME işleminden önce transesterifikasyonu BF₃/etanol kullanılarak yapılmıştır. HS-SDME için optimum şartlar 1,0 µl dibutilftalat (DBP) ile 1000 rpm karıştırma hızı, %30 (a/h) NaCl, 20 dak ekstraksiyon süresi ve 7 ml örnek hacmi, 12 ml vial içerisinde gerçekleştirilmiştir. Etil esterinin kantitatif analizi gaz kromatografi kullanılarak yapılmış, optimize edilen ekstraksiyon şartlarında lineer kalibrasyon eğimi ve iyi tekrarlanabilirlik elde edilmiştir.

He Y. ve ekibi [86] iki farklı sıvı faz mikroekstraksiyon (LPME) yöntemi (klorobenzen ile statik mikroekstraksiyon ve toluen ile dinamik tek damlacık mikroekstraksiyon) sonrası gaz kromatografi ile yağ asiti analizi gerçekleştirmişlerdir. Her iki sıvı faz mikroekstraksiyon yönteminde 50 µl mikroşırınga kullanılarak 2 µl'den az çözücü direkt gaz kromatografi cihazına enjekte edilmiştir. Klorobenzen ile statik ekstraksiyonda 12 kat zenginleştirme, iyi bir tekrarlanabilirlik (%9,7) ve kolay uygulanabilirlik avantajı sağlanırken daha uzun ekstraksiyon süresinde analiz gerçekleştirilmiştir. Toluene ile dinamik tek damlacık mikroekstraksiyon yönteminde ise daha yüksek zenginleştirme faktörü (~27 kat) ve kısa ekstraksiyon süresinde (~3 dak) düşük tekrarlanabilirlikle (%12,8) analiz gerçekleştirilmiştir.

Konjuge oktadekadienoik asit (18:2)'in 56 geometrik ve yapı izomeri olup bunlar konjuge linoleik asit (CLA) olarak bilinir. 9c, 11t 18:2 ve 10t, 12c 18:2 izomerlerinin sağlık açısından faydalı olduğu bilinirken, diğer izomerlerin besleyici özelliği yoktur. CLA

izomerlerinin, kanser riskini azalttığı, kalp hastalıklarını önlediği, bağışıklık fonksiyonlarını geliştirdiği ve şişmanlığı tedavi etmede önemli rolü olduğu bilinmektedir. Roach J.A.G. ve ekibi [98] yaptıkları çalışmada kompleks yapıdaki biyolojik örneklerdeki bu asitleri ve miktarlarını belirlemeye çalışmışlardır. Konjuge linoleik asit analiz öncesinde sodyum metoksit/metanol ile 50 °C, 15 dak ya da HCl/metanol ile 80 °C, 1 saatte metil esterlerine dönüştürülmüştür. Ag^+ HPLC'nin konjuge linoleik asit izomerlerinin analizinde çok etkili bir yöntem olduğu ve CLA izomerlerinin analizinin MS- NMR ya da GC-FTIR ile gerçekleştirilebileceği belirtilmiştir.

Brondz I. [99] insan kanındaki yağ asitlerinin tayininde $NaOCH_3/MeOH$ ve $BF_3/MeOH$ ile esterleşme reaksiyonlarını kullanmışlar ve BF_3 reaktifine karşı daha duyarlı ve daha fazla ester türevinin oluştuğunu belirtmişlerdir.

Eras J. ve ekibinin [100] yaptığı çalışmada yağ asitlerinin 1-propanol ile esterleşmesinde klorotrimetilsilan (CTMS) kullanılmış ve bu yöntem geleneksel yöntemlerle karşılaştırıldığında bazı avantajlar sağlamıştır. CTMS ile çalışmanın derişik HCl ve H_2SO_4 'e göre daha kolay olduğu, CTMS'nin BF_3 'e göre daha ucuz ve farklı alkollerin kullanımına uygun olduğu belirtilmiştir. Metanol yerine 1-propanolun kullanıldığı ortamda yağın çözünürlüğü daha fazla olduğu için reaksiyon süresi kısalmış ve gaz kromatografi ile analiz süresi önemli ölçüde azalmıştır.

Challinor J. M ve ekibinin [101] kullandığı termal katalizli hidroliz ve metilasyon yöntemi tetrametilamonyum hidroksit (TMAH) gibi organik bir bazın kullanıldığı basit ve hızlı örnek hazırlama tekniğidir. Termal hidroliz ve metilasyon yağ asitlerinin metilasyonunda geleneksel yöntemlere göre daha küçük örnek miktarı ile çalışabilme, daha hızlı analiz süresi gibi avantajlar sağlamaktadır.

Soria A. C. ve ekibi [102] farklı matrikslerdeki uçucu bileşenlerin ekstraksiyonu için statik headspace (S-HS) ve dinamik headspace (D-HS) tekniklerini kullanmışlardır. İyonik sıvı çözeltilerinde S-HS ve D-HS çok az miktardaki örnekler için hızlı, etkili bir örnek hazırlama yöntemidir. Örneklerdeki uçucu bileşenler matriks etkisinden dolayı birden çok aşamadan geçirilerek analiz edilmektedir. Girişimi engellemek için HS ile örnek hazırlama kullanışlı, hızlı, etkili ve çevreye dost bir tekniktir.

Ostermann, A. I [103] doku hücelerindeki yağ asitlerinin analizinde gaz sıvı kromatografi yöntemini kullanmıştır. Çalışma öncesinde yağ asitleri transesterifikasyon ile metil esterlerine dönüştürülerek uçucu hale getirilmiştir. Plazma ve dokudaki farklı lipid sınıflarının türevlendirilmesi için altı farklı yöntem karşılaştırılmıştır. Trimetilsülfonyum hidroksitin çoklu doymamış yağ asitlerinin esterleştirilmesinde yetersiz olduğu görülmüştür (PUFA <%50). KOH ile esterleştirme serbest yağ asitleri için başarısız bulunmuştur. Hekzan/CH₃OH içinde %7 BF₃ ile esterleştirme kolestrol esterlerinde ve triaçil gliserolde yetersiz bulunurken methanolik HCl ve BF₃ ile methanolik NaOH kombinasyonu serbest yağ asitlerinin, polar lipidlerin, triaçil gliserollerin ve kolestrollerin esterleşmesinde uygun bir yöntem olarak kullanılmıştır (>%80). Plazma yağ asitleri esterleştirildiğinde benzer sonuçlar elde edilmekle birlikte EPA+DHA (n-3)'da belirgin fark görülmüştür. Yağ asitleri plazma derişimi KOH ve BF₃ ile esterleştirildiğinde verim düşük bulunmuştur.

Roman Kandar [104] çalışmasında plazma ve kuru ter damlalarındaki yağ asitlerinin analizini gaz kromatografi alev iyonlaştırma dedektörü kullanarak yapmıştır. Ter örnekleri butil hidroksitoluen içeren kâğıtlarda toplanıp yağ asitlerinin metil ester türevleri metanol ve asetil klorür ile gerçekleştirilmiştir. Kuru ter damlaları butil hidroksitoluen ile birlikte -20 °C'de 3 hafta bekletilmiş, sonuçlar ter içerisinde kısa zincirli, uzun zincirli ve doymamış yağ asitlerinin olduğunu göstermiştir. Kan ve plazmada bulunan yağ asitleri yüzdesinin doğru orantılı olduğu gözlenmiştir.

Giuseppe Micalizzi ve ekibi [105], insan kanındaki yağ asitlerinin kalitatif ve kantitatif analizinin hastalıkların önlenmesi ve sağlıklı kalmak için önemli olduğunu göstermiştir. Yağ asitleri kişisel metabolik durum hakkında ayrıntılı bilgi sağladığından insan kanındaki bütün yağ asitlerinin hızlı ve düşük miktarlarda analiz edilmesi önemlidir. Örnek toplama, kan damlalarının kurutulması şeklinde gerçekleştirilmiştir. Sodyum metoksit ve bortriflorür kullanılarak yağ asitleri metil esterleri oluşturulmuştur. Yağ asitlerinin metil ester türevleri için örnekler CH₃ONa ve CH₃OH ile 15 dak 95 °C'de ısıtılıp, soğuduktan sonra 500 µl BF₃'ün metanolde hazırlanmış çözeltisi eklenmiştir. 15 dak 95 °C tekrar ısıtıldıktan sonra 300 µl doymun NaCl çözeltisi ilave edilip 350 µl n-heptan kullanılarak yağ asidi metil esterleri ekstre edilmiş ve gaz kromatografi ile analiz edilmiştir. İç standart kullanılarak tekrarlanabilirlik, doğrusal aralık, LOD (tayin sınırı) ve miktar tayini gerçekleştirilmiştir. Metodun doğruluğu insan plazmasına standartların ilavesi ve analizi

ile kontrol edilmiştir. Analitik yöntem kan dışında insan plazma ve serum örneklerine de uygulanmış ve otomasyona uygun bir analitik yöntem geliştirmiştir.

Beata Plutowska ve ekibi [106], patates püresi veya tohumların fermantasyonu ve distilasyonu sonucunda elde edilen saf ispiro içindeki yağ asitlerinin ölçümü için analitik metod geliştirerek optimize etmişlerdir. Bunun için headspace katı faz mikroekstraksiyon (HS-SPME) tekniği ve gaz kromatografi alev iyonizlaşma dedektörü (GC-FID) kullanmışlardır. HS-SPME yönteminde fiber tipinin seçimi en önemli aşamayı oluştururken ekstraksiyon sıcaklığı (45 °C), ekstraksiyon süresi (30 dak), örnek hacmi (8 ml), karıştırma hızı (700 rpm), iyonik şiddet gibi koşullar da önemlidir. Bütün bu parametreler çalışılarak en uygun koşullar belirlenmiştir. İç standart olarak metil oktanoat (4 µl) kullanılmıştır.

Gan Hui Siang [107], bitkilerdeki yağ asitlerinin (laurik asit, miristik asit, palmitik asit, stearik asit, palmitoleik asit, oleik asit, linoleik asit ve araşidik asit) ikili faz oyuk fiber mikroekstraksiyon ve GC-FID ile analizinde iç standart olarak heptanoik asit metil esteri kullanmıştır. Yağ asitleri mikroekstraksiyon öncesinde yağ asitleri metil ester türevlerine dönüştürülmüştür. Ekstraksiyon parametreleri olan ekstraksiyon çözücüsü, sıcaklık, süre, karıştırma hızı, tuz ilavesi çalışılarak en uygun şartlar belirlenmiştir. Ekstraksiyon çözücüsü olarak n-tridekan, ekstraksiyon süresi 35 dak, tuz eklemeyen oda sıcaklığında çalışılmıştır. Zenginleştirme faktörü 37-115 arasında bulunmuştur. Dokuz yağ asidi için 10-5000 µg l⁻¹ aralığında doğrusallık gözlenmiştir ($r^2 > 0,994$). Bu metot palm yağı ve diğer bitki yağlarındaki yağ asitleri için başarılı bir şekilde uygulanmıştır.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler ve Kimyasallar

100 mg Supelco 37 comp. FAME mix, FAME 37, C4-24 (Sigma Aldrich, USA),
Linoleik asit (Sigma-Aldrich, Germany),
Linolenik asit (Sigma-Aldrich, Germany)
 γ -linolenik asit (Sigma-Aldrich, Germany),
Kaproik asit metil esteri (Sigma-Aldrich, Germany),
Heptanoik asit metil esteri (Sigma-Aldrich, Germany),
Undekanoik asit metil esteri (Sigma-Aldrich, Germany),
Tridekanoik asit metil esteri (Sigma-Aldrich, Germany)
Myristik asit metil esteri (Sigma-Aldrich, Germany)
Dikloro metan, CH_2Cl_2 (MS SupraSolv®, Sigma-Aldrich, Germany)
Potasyum hidroksit, KOH (Sigma–Aldrich, Germany)
Heptan, C_7H_{16} (%99, Sigma Aldrich Co., Riedel-de Haën, Seelze, Germany)
Metanol, CH_3OH %0.5’den az su içeren (Merck, Darmstandt, Germany)
Sülfirik asit, H_2SO_4 (Merck, Darmstandt, Germany),
Hidroklorik asit, HCl (Merck (Darmstandt, Germany)
Sodyum klorür, NaCl (J.T.Baker (Deventer, Holland)
Karbon tetra klorür, CCl_4 (Sigma-Aldrich, Germany,)
Sodyum sülfat, Na_2SO_4 (Sigma–Aldrich, Germany)
Asetonitril (Merck, Darmstandt, Germany)
Kloroform (Merck, Darmstandt, Germany)
1-undekanol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
Sodyum hidroksit, NaOH (J.T.Baker, Deventer, Holland)
Sodyum dodesil sülfat (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
Etanol (Merck, Darmstandt, Germany)
Helyum (He) gaz kromatografik kalitede Oksan Co., Ltd. (Ankara, Turkey)
Hidrojen (H_2) gaz kromatografik kalitede Oksan Co., Ltd. (Ankara, Turkey)
Kuru hava, gaz kromatografik kalitede Oksan Co., Ltd. (Ankara, Turkey).

3.2. Cihazlar

Gaz Kromatografi – Alev İyonlaşma Dedektörü (Agilent Technologies 7890A GC System, Agilent Technologies Inc, Santa Clara, CA),

Auto sampler (Agilent 7693A Automatic Liquid Sampler, China)

Gaz Kromatografi kolonu (Rt-2560, 100 mx0.25 mm i.d., 0.20 µm) (Restek Corporation Bellefonte, US) ve HP-5 Agilent Technologies (30 m x 0,25 µm ID x 0,20 µm)

Hamilton gastight syringe (1700 series, SL syringe, 50 µl, needle size 22s ga, Germany)

Vial içine yerleştirilen 250 µl hacimli polimer ayaklı cam tüp (Agilent Technologies Inc., US)

Vial, screw top, 2 ml, ambr (Agilent Technologies Inc., US)

Cap, screw, blue, PTFE/red silicone septa (Agilent Technologies Inc., US)

Vortex (Firloba, Lyon)

Hassas terazi (Ohaus)

Derin dondurucu

Deiyonize su cihazı (Milli-Q Water Purification System)

3.3. Yöntem

Tez çalışmamızda tepe boşluk mikroekstraksiyon (HSME) ve tek damla mikroekstraksiyon (SDME) yöntemleri kullanılarak farklı tip yağlardaki yağ asitleri önzenginleştirildi. Tez çalışmalarımızda kullandığımız yağlardan yemeklik olarak kullanılan yağlar marketten, pastörize olmamış süttten elde edilen tereyağlar ise hayvancıkla uğraşıp bu ürünleri yapan kişilerden, balık yağı eczaneden, aromaretapi amaçlı kullanılan bitkisel yağlar ise aktardan temin edildi. Ayçiçek yağı, zeytin yağı, tereyağ ve margarin yağ asitleri SDME yöntemi ile zeytin yağı, kekik yağı ve balık yağı yağ asitleri ise HSME yöntemi ile önzenginleştirilerek GC-FID ile tayin edildi. Mikroekstraksiyon işlemlerinden önce yağ asitleri, yapılarındaki –COOH polar fonksiyonel gruplar üzerinden asit ve baz katalizörü varlığında alkol (metanol) ile esterleşme tepkimesiyle türevlendirilerek uçucu hale getirildi.

100 mg Supelco 37 comp. FAME mix; FAME 37; C4-24, linoleik asit, linolenik asit, γ-linolenik asit, kaproik asit metil esteri, heptanoik asit metil esteri, undekanoik asit metil esteri, tridekanoik asit metil esteri ve myristik asit metil esteri yağ asiti standartları olarak kullanıldı. Supelco 37 comp. FAME mix standart yağ asiti çözeltisi kromatografik kalitede

metilen klorür (CH_2Cl_2) içerisinde çözülerek hazırlandı ve $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 'de saklandı. Linoleik asit, linolenik asit, γ -linolenik asit yağ asitleri standartları CH_3OH ile KOH katalizörü varlığında esterleştirildi [108]. Numunelerin içeriğindeki yağ asitleri KOH [108], HCl [83] ve H_2SO_4 [83] katalizörleri varlığında metanol ile metil esterlerine dönüştürüldü ve reaksiyon ortamından suyun uzaklaştırılması için susuz sodyum sülfat kullanıldı.

SDME ve HSME işleminde tuz etkisi için NaCl , tek damla çözeltisi olarak HSME yönteminde sodyumdodesil sülfat:1-bütanol, SDME yönteminde ise CCl_4 kullanılarak yağ asitleri metil esterleri GC-FID ile analiz edildi.

3.3.1. FAME mix, FAME37, C4-24 yağ asitleri standart çözeltisinin hazırlanması ve analizi

100 mg Supelco 37 comp. FAME mix, FAME37, C4-24 (Sigma Aldrich, USA) $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edildi ve standart çözeltilerin tümü buz banyosunda hazırlandı. 400 mg/ml FAME 37 standart çözeltisi hazırlamak için 250 μl CH_2Cl_2 çözeltisi 100 mg FAME37 standartı üzerine ilave edilerek vortekslendi. Bu çözeltinin 75 μl 'si gaz kromatografi vialine alınıp üzerine 925 μl CH_2Cl_2 ilave edildikten sonra (30 mg/ml FAME37) ağzı kapatılarak vortekslendi. 100 μl , 30 mg/ml FAME37 standart çözelti vial içine yerleştirilen 250 μl hacimli polimer ayaklı cam tüp içerisine kondu ve 2 ml'lik amber renkli vial içerisinde ağzı kapatılarak GC-FID ile aşağıdaki kromatografik şartlarda analiz edildi.

Cihaz: Agilent Technologies 7890A GC System, Agilent Technologies Inc, Santa Clara, CA), FID dedektör

Kolon: Restek-2560, bisiyanopropil polisiloksan (Restek Corporation, Bellefonte, PA) (100 m x 0,25 μm ID x 0,20 μm)

Fırın sıcaklığı: 100 $^\circ\text{C}$ (4 dak), 3 $^\circ\text{C}/\text{dak}$ ile 240 $^\circ\text{C}$ 'ye çıkarılır (10 dak)

Enjeksiyon sıcaklığı: 225 $^\circ\text{C}$

Dedektör sıcaklığı: 250 $^\circ\text{C}$

Taşıyıcı gaz He : 1,0 ml/dak, 20 cm/saniye

Enjeksiyon hacmi: 2 μl

Bölücü oranı: 200:1

Alev iyonlaşma dedektör gazları: Hidrojen (H_2) ve kuru hava

Elde edilen kromatogramdaki (Şekil 4.1) alıkonma zamanları Rt-2560 (bissiyano-propil polisiloksan) kolon referans alıkonma zamanları (Şekil 4.2, Çizelge 4.1) ile karşılaştırılarak 37 adet yağ asiti metil esteri tayin edildi.

3.3.2. Linoleik asit, linolenik asit, γ -linolenik asit metil ester standart çözeltilerinin hazırlanması ve analizi [109]

Buz banyosu içerisinde linoleik asit, linolenik asit, γ -linolenik asit standartları üzerine 200 μ l heptan çözeltisi ilave edilip çalkalandıktan sonra 0,2 ml 2 M potasyum hidroksitli metanol çözeltisi eklenip kapakları kapatıldı. 30 saniye şiddetle vortekste karıştırıldıktan sonra berrak üst faz oluşana kadar bekletildi ve metil esterleri içeren üst faz ayrılıp 12 saat içinde GC-FID ile aşağıdaki kromatografik şartlarda analiz edildi. Linoleik asit, linolenik asit, γ -linolenik asit metil esterlerine ait kromatogramlar sırasıyla Şekil 4.3-5'te gösterildi.

Kolon: HP-5 Agilent Technologies, (%5-fenil)-metilpolisiloksan kolon, (30 m x 0,25 μ m ID x 0,20 μ m)

Fırın sıcaklığı: 80 °C (2 dak), 4 °C/dak ile 210 °C (5 dak), 15 °C/dak ile 300 °C (5 dak)

Enjeksiyon sıcaklığı: 270 °C

Dedektör sıcaklığı: 280 °C

Taşıyıcı gaz He: 1,0 ml/dak

Enjeksiyon hacmi: 1 μ l

Bölücü oranı: 100:1

Alev iyonlaşma dedektör gazları; hidrojen (H_2) ve kuru hava

3.3.3. Yağ örneklerinin türevlendirilmesi ve GC-FID ile analizi

Yağ asitlerinin gaz kromatografisi ile analizinden önce en önemli basamaklardan biri olan esterleştirerek uçucu hale getirme işlemi çeşitli yöntemlerle yapılabilmektedir. Tez çalışmamızda üç farklı yöntem ile (IUPAC yöntem 2,301 [110], Avrupa Farmakopesi 7,0 [108] ve H_2SO_4 katalizli [109, 9, 111]) esterleştirilen yağ örneklerinin GC-FID ile analizi bölüm 3.3.1'deki kromatografik şartlarda gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kromatogramlar (Şekil 4.6-8) değerlendirilerek çalışmanın devamında en uygun esterleştirme yöntemi belirlenmiştir.

a- Yağ asitlerinin (FAMES) IUPAC yöntem 2,301'e göre türevlendirilmesi [9]

Yağ örnekleri 100 °C'ye ısıtılmış etüvde 3 saat bekletildikten sonra 1 g yağ numunesi 5 ml kapaklı test tüp içerisinde tartıldı. Üzerine 2 ml heptan çözeltisi ilave edilip çalkalandıktan sonra 0,2 ml 2 M potasyum hidroksitli metanol çözeltisi eklenip kapakları kapatıldı. 30 saniye şiddetle vortekste karıştırıldıktan sonra berrak üst faz oluşana kadar bekletildi ve metil esterleri içeren üst faz ayrılıp 12 saat içinde GC-FID ile analiz edildi.

b- Yağ asitlerinin (FAMES) Avrupa Farmakopesi 7,0'a göre türevlendirilmesi [108]

2,0 ml zeytinyağı örneği düz tabanlı, yaklaşık 50 mm i.d x 30 mm kap içerisinde 100-105 °C'de etüvde kurutulduktan sonra içinde silika jel bulunan desikatörde soğutuldu. Buradan alınan 1,0 g yağ numunesi 25 ml yuvarlak altı rodajlı cam balonda tartıldı. 10 ml susuz metanol ve 0,2 ml metanol içinde hazırlanmış 60 g/l potasyum hidroksit çözeltisinden eklenerek geri dönüşümlü soğutucuya bağlanarak 50 ml/dak azot gazı akış hızında magnetik karıştırıcı ile karıştırılarak kaynama noktasına kadar ısıtıldı. Yaklaşık 10 dak'da berraklaşan çözelti 5 dak daha ısıtıldıktan sonra soğutulup içerik ayırma hunisine aktarıldı. 10 ml 200 g/l NaCl çözeltisi eklenerek kuvvetlice çalkalandı. Fazlar ayrılınca üstteki organik faz, susuz sodyum sülfat içeren viale alınarak süzülüp GC-FID ile analiz edildi.

c- Yağ asitlerinin asit (H₂SO₄) katalizli türevlendirilmesi [109, 5, 110]

10 ml zeytinyağı örneği 100 ml'lik cam balona alınarak üzerine CH₃OH içerisinde hazırlanmış 20 ml %3'lük H₂SO₄ karışımı ve ortamdaki suyu uzaklaştırmak için 1 g NaSO₄ eklendi. Kurutma başlığı takılmış geri soğutucu altında 2 saat ısıtıldı. Reaksiyon sonunda balonda oluşan iki fazdan üst faz viale alınarak GC-FID ile analiz edildi.

3.3.4. Tepe Boşluk Mikroekstraksiyon (HSME) Yöntemi ile yağ asitleri metil esterlerinin önzenginleştirilmesi ve GC-FID ile analizi

Zeytinyağı, kekik yağı ve balık yağındaki yağ asitleri IUPAC yöntem 2,301'e göre [9] türevlendirilip yağ asitleri metil esterlerine dönüştürülerek uçucu hale getirildi ve HSME ile önzenginleştirildi. HSME işleminde 360 µL yağ asidi metil esteri NaCl bulunan 2,0 ml vial içerisine konarak vial kauçuk septum ile kapatıldı. Ekstraksiyon ve enjeksiyon şırıngası olarak 50 µl'lik gaz kromatografisi Hamilton mikro şırınga kullanıldı. Ekstraksiyon

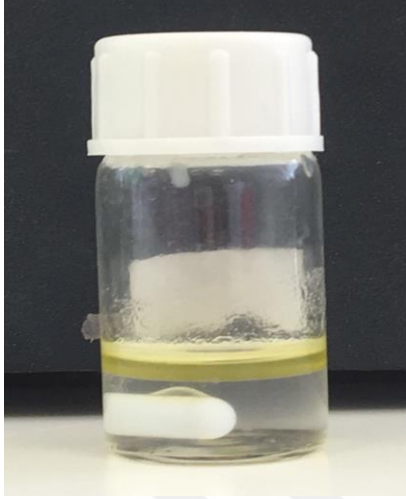
çözücüsü mikro şırınga içine çekildi ve şırınga iğnesi, numune vialinin kauçuk septumundan örnek çözeltisinin 0,5 cm üzerinde olacak şekilde tepe boşluğa yerleştirildi. Şırınga pistonuna yavaşça bastırılıp çözücü damlacığı iğne ucunda askıya alındı. Ekstraksiyon esnasında, mikro şırınga ekstraksiyon vialinin üzerine metal kelepçe kullanılarak sabitlendi. Ekstraksiyondan sonra, damlacık iğnenin içine geri çekilerek gaz kromatografiye enjekte edildi. Ekstraksiyona etki eden faktörlerden ekstraksiyon sıcaklığı (Şekil 4.9 ve Şekil 4.10), ekstraksiyon zamanı (Şekil 4.11 ve Şekil 4.12), çözücü türü ve oranı (1-bütanol, 1-oktanol, asetronitril, dietilasetat, toluen, hekzan, heptan, diklormetan:hekzan:toluen, sodyum dodesil sülfat) (Şekil 4. 13) (Çizelge 4.3) ve NaCl (tuz etkisi) miktarının optimizasyonu yapıldı. En yüksek pik alanının elde edildiği şartlarda ekstre edilen örnekler Bölüm 3.3.2'deki kromatografik koşullarda analiz edildi.

IUPAC yöntem 2,301'e göre esterleştirilen zeytinyağı, kekik yağı ve balık yağı yağ asitlerinin bir miktarı önzenginleştirilmeden GC-FID ile de Bölüm 3.3.2'deki kromatografik şartlarda analiz edilerek HSME-GC-FID analiz sonuçlarıyla karşılaştırıldı. Numunelerin içeriklerindeki linoleik asit, linolenik asit ve γ -linoleik asit miktarları standart linoleik asit, linolenik asit ve γ -linoleik asit metil esterlerinin alıkonma zamanları ile (Şekil 4.14-17) karşılaştırılarak pik alanları üzerinden % (a/a) olarak hesaplandı (Çizelge 4.4).

3.3.5. Tek Damla Mikroekstraksiyon (SDME) yöntemi ile yağ asitleri metil esterlerinin önzenginleştirilmesi

Ayçiçek yağı, zeytinyağı, tereyağı ve margarin yağ asitleri IUPAC yöntem 2,301'e göre türevlendirilerek yağ asitleri metil esterlerine dönüştürülüp uçucu hale getirildi ve gaz kromatografik analizden önce SDME yöntemi ile önzenginleştirildi. Mikroekstraksiyon çözücüsü olarak özgül ağırlığı sudan daha büyük olan kloroform, diklormetan ve karbontetraklorür denendi. Diklorometan ve kloroform numune içinde dağıldığı için ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanılamadı. CCl_4 mikroekstraksiyon çözücüsü olarak kullanıldığında numune içerisinde iki ayrı faz oluştu (Resim 3.1). Esterleştirilen yağ asitleri numunesinin 500 μl 'si 1 ml %10 (a/a) NaCl çözeltisine ilave edilip üzerine 20 μl CCl_4 eklenerek optimum ekstraksiyon koşullarında yağ asitleri metil esterleri CCl_4 damlacığına ekstre edildi. Damlada toplanan yağ asitleri metil esterleri GC enjektör ile alınıp 250 μl 'lik vial içerisine yerleştirilebilen polimer ayaklı cam tüp içerisine konup 2

ml'lik amber renkli vial içerisinde ağzı kapatılarak GC-FID ile Bölüm 3.3.1'deki kromatografik şartlarda analiz edildi.



Resim 3.1. Tek damla mikroekstraksiyon (SDME) yöntemi ile yağ asitlerinin önzenginleştirilmesi (mikroekstraksiyon çözücüsü CCl_4)

Ekstraksiyona etki eden faktörlerden sodyum klorür derişimi (tuz etkisi), karıştırma hızı, sıcaklık, mikroekstraksiyon süresi ve mikroekstraksiyon çözücü miktarı parametreleri ayrı ayrı çalışılarak optimum şartlar belirlendi. SDME-GC-FID ile analiz sonrası elde edilen pik alanları, önzenginleştirme yapılmadan elde edilen GC-FID kromatogramları ile karşılaştırıldı.

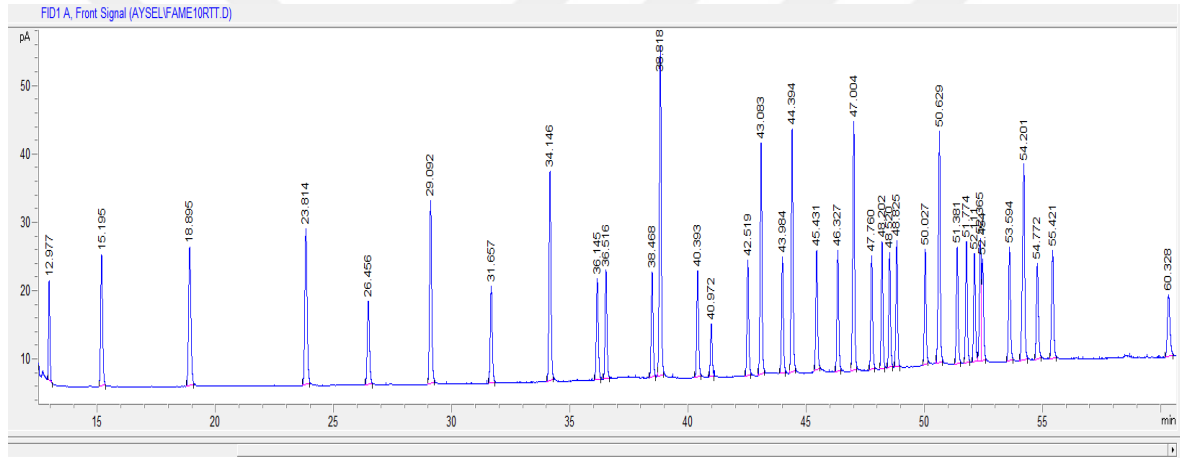
Ayçiçek yağı, zeytinyağı, tereyağı ve margarin numuneleri SDME-GC-FID ve GC-FID ile analiz edilerek içeriklerindeki yağ asiti miktarları, FAME37 standartların alıkonma zamanları ile karşılaştırılarak pik alanları üzerinden % (a/a) olarak hesaplandı (Çizelge 4.4).



4. BULGULAR

4.1. Standart Yağ Asiti Metil Esterlerinin (Supelco 37 comp. FAME mix, FAME37, C4-24) Gaz Kromatografi-Alev İyonlaşma Dedektörü (GC-FID) ile Analizi

Supelco 37 comp. FAME mix, FAME37, C4-24 standart yağ asitleri metil esterlerinin Bölüm 3.3.1'e göre yapılan analizinden elde edilen kromatogram Şekil 4.1'de, alıkonma zamanları Çizelge 4.1'de, Supelco 37 comp. FAME mix, FAME37, C4-24 standart yağ asiti metil esterlerinin aynı kromatografik şartlardaki referans GC-FID kromatogramı ve referans alıkonma zamanları ise sırasıyla Şekil 4.2 ve Çizelge 4.2'de verilmiştir.



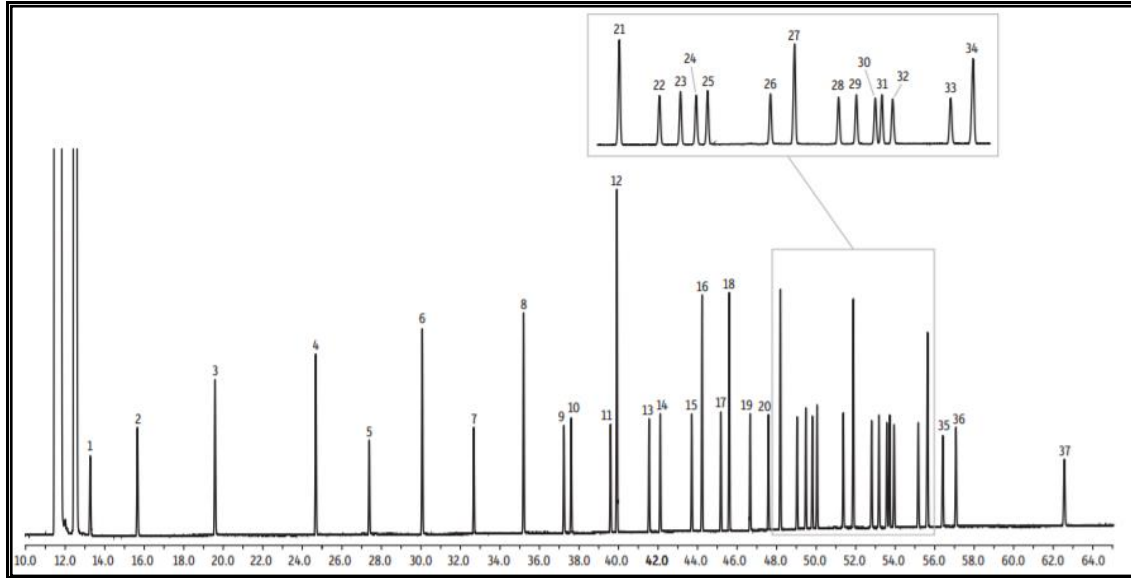
Şekil 4.2. Supelco 37 comp. FAME mix, FAME37, C4-24 standart yağ asitleri metil esterlerinin GC-FID kromatogramı

Çizelge 4.1. Supelco 37 comp. FAME mix, FAME37, C4-24 standart yağ asitleri metil esterlerinin GC-FID analizi alıkonma zamanları

Pik no	FAME	t _R (dak)	% (a/a)
1	Metil butirat; C4:0	12.977	4
2	Metil kaproat; C6:0	15.195	4
3	Metil oktanoat; C8:0	18.895	4
4	Metil dekanoat; C10:0	23.814	4
5	Metil andekanoat; C11:0	26.456	2
6	Metil laurat; C12:0	29.092	4
7	Metil tridekanoat; C13:0	31.657	2
8	Metil miristat; C14:0	34.146	4

Çizelge 4.1. (devam) Supelco 37 comp. FAME mix, FAME37, C4-24 standart yağ asitleri metil esterlerinin GC-FID analizi alıkonma zamanları

Pikler	FAME	t _R (dak)	% (a/a)
9	Metil miristoleat; C14:1	36.146	2
10	Metil pentadekanoat; C15:0	36.516	2
11	Metil pentadesenoat; C15:1 (c10)	38.468	2
12	Metil palmitat; C16:0	38.818	6
13	Metil palmitoleat; C16:1 (c9)	40.393	2
14	Metil heptadekanoat; C17:0	40.972	2
15	Metil heptadesenoat; C17:1 (c10)	42.519	2
16	Metil stearat; C18:0	43.083	4
17	Metil octadesenoat; C18:1 (t9)	43.984	2
18	Metil oleat; C18:1 (c9)	44.394	4
19	Metil linolelaidat; C18:2 (t9, t12)	45.431	2
20	Metil linoleat; C18:2 (c9, c12)	46.327	2
21	Metil araşidat; C20:0	47.004	4
22	Metil linolenat; C18:3 (c6, c9, c12)	47.760	2
23	Metil eikosenoat; C20:1 (c11)	48.202	2
24	Metil linolenat; C18:3 (c9, c12, c15)	48.520	2
25	Metil heneikosanoat; C21:0	48.825	2
26	Metil eikosadienoat; C20:2 (c11, c14)	50.027	2
27	Metil behenat; C22:0	50.629	4
28	Metil eikosatrienoat; C20:3 (c8, c11, c14)	51.381	2
29	Metil erukat; C22:1 (c13)	51.774	2
30	Metil eikosatrienoat; C20:3 (c11, c14, c17)	52.111	2
31	Metil trikosanoat; C23:0	52.365	2
32	Metil araşidonat; C20:4 (c5, c8, c11, c14)	52.454	2
33	Metil dokosadienoat; C22:2 (c13, c16)	53.594	2
34	Metil lignoserat; C24:0	54.201	4
35	Metil eikosapentaenoat; C20:5 (c5, c8, c11, c14, c17)	54.772	2
36	Metil nervonat; C24:1 (C15)	55.421	2
37	Metil dokosahekzaenoat; C22:6 (c4, c7, c10, c13, c16, c19)	60.328	2



Şekil 4.3. Supelco 37 comp. FAME mix, FAME37, C4-24 standart yağ asitleri metil esterlerinin referans GC-FID kromatogramı

Çizelge 4.2. Supelco 37 comp. FAME mix, FAME37, C4-24 standart yağ asitleri metil esterlerinin GC-FID analizi referans alıkonma zamanları

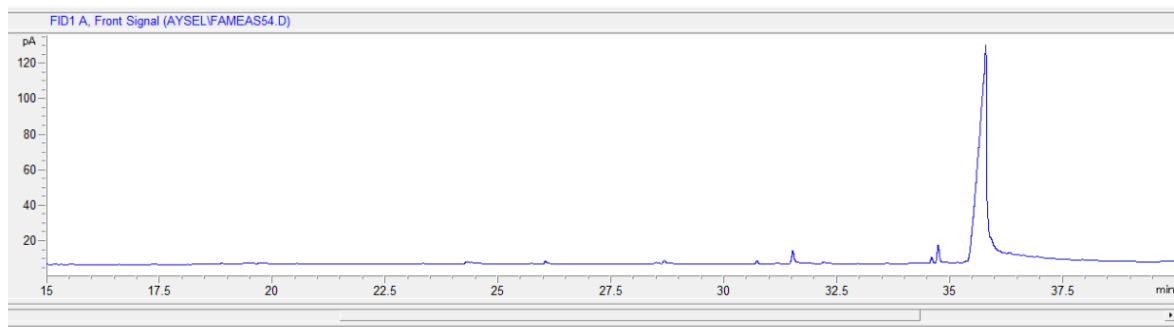
Pik no	FAME	t_R (dak)	% (a/a)
1	Metil butirat; C4:0	13.16	4
2	Metil kaproat; C6:0	15.53	4
3	Metil oktanoat; C8:0	19.43	4
4	Metil dekanoat; C10:0	24.50	4
5	Metil andekanoat; C11:0	27.20	2
6	Metil laurat; C12:0	29.87	4
7	Metil tridekanoat; C13:0	32.47	2
8	Metil miristat; C14:0	34.97	4
9	Metil miristoleat; C14:1	37.01	2
10	Metil pentadekanoat; C15:0	37.37	2
11	Metil pentadesenoat; C15:1 (c10)	39.36	2
12	Metil palmitat; C16:0	39.68	6
13	Metil palmitoleat; C16:1 (c9)	41.30	2
14	Metil heptadekanoat; C17:0	41.86	2
15	Metil heptadesenoat; C17:1 (c10)	43.45	2
16	Metil stearat; C18:0	43.97	4
17	Metil octadesenoat; C18:1 (t9)	44.92	2
18	Metil oleat; C18:1 (c9)	45.34	4
19	Metil linolelaidat; C18:2 (t9, t12)	46.39	2
20	Metil linoleat; C18:2 (c9, c12)	47.32	2
21	Metil araşidat; C20:0	47.92	4

Çizelge 4.2. (devam) Supelco 37 comp. FAME mix, FAME37, C4-24 standart yağ asitleri metil esterlerinin GC-FID analizi referans alıkonma zamanları

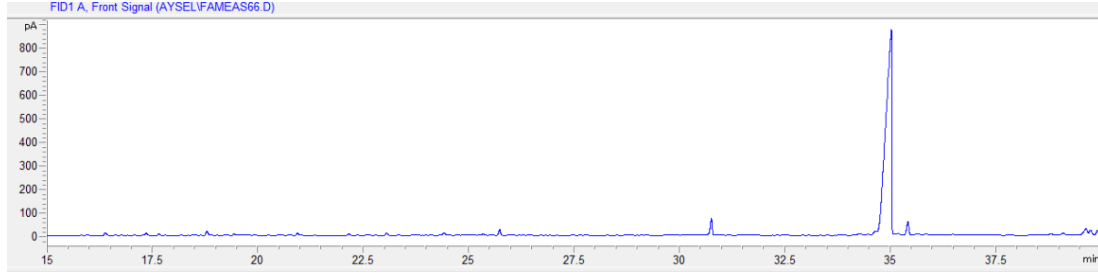
Pikler	FAME	t_R (dak)	% (a/a)
22	Metil linolenate; C18:3 (c6, c9, c12)	48.77	2
23	Metil eikosenoat; C20:1 (c11)	49.20	2
24	Metil linolenate; C18:3 (c9, c12, c15)	49.54	2
25	Metil heneikosanoat; C21:0	49.78	2
26	Metil eikosadienoat; C20:2 (c11, c14)	51.09	2
27	Metil behenat; C22:0	51.60	4
28	Metil eikosatrienoat; C20:3 (c8, c11, c14)	52.52	2
29	Metil erukat; C22:1 (c13)	52.88	2
30	Metil eikosatrienoat; C20:3 (c11, c14, c17)	53.28	2
31	Metil trikosanoat; C23:0	53.42	2
32	Metil araşidonat; C20:4 (c5, c8, c11, c14)	53.65	2
33	Metil dokosadienoat; C22:2 (c13, c16)	54.85	2
34	Metil lignoserat; C24:0	55.32	4
35	Metil eikosapentaenoat; C20:5 (c5, c8, c11, c14, c17)	56.09	2
36	Metil nervonat; C24:1 (C15)	56.74	2
37	Metil dokosaheksaenoat; C22:6 (c4, c7, c10, c13, c16, c19)	62.17	2

4.2. Linoleik Asit, Linolenik Asit, γ -Linolenik Asit Metil Ester Standartlarının Gaz Kromatografi-Alev İyonlaşma Dedektörü (GC-FID) ile Analizi

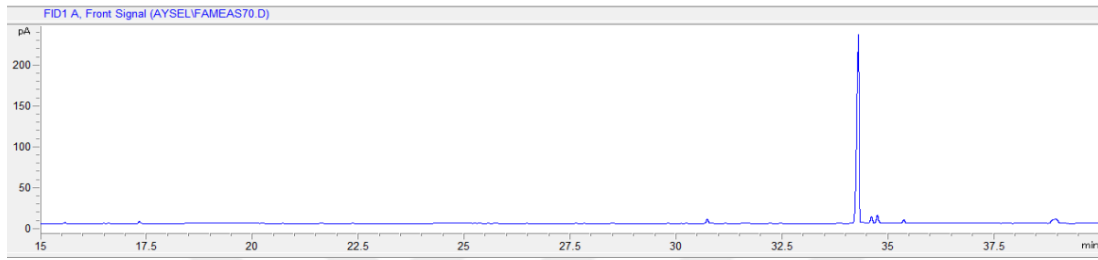
Linoleik asit, linolenik asit ve γ -Linolenik asit standartları metil esterlerinin Bölüm 3.3.2'e göre GC-FID ile yapılan analizi sonucu elde edilen kromatogramlar sırasıyla Şekil 4.3-5'te verilmiştir. Alıkonma zamanları t_R (linoleik asit metil ester)= 34,32 dak, t_R (linolenik asit metil ester)= 35,82 dak ve t_R (γ -linolenik asit metil ester)= 35,04 dak olarak bulunmuştur.



Şekil 4.4. Linolenik asit metil esterinin GC-FID kromatogramı (t_R linolenik asit metil ester= 35,82 dak)



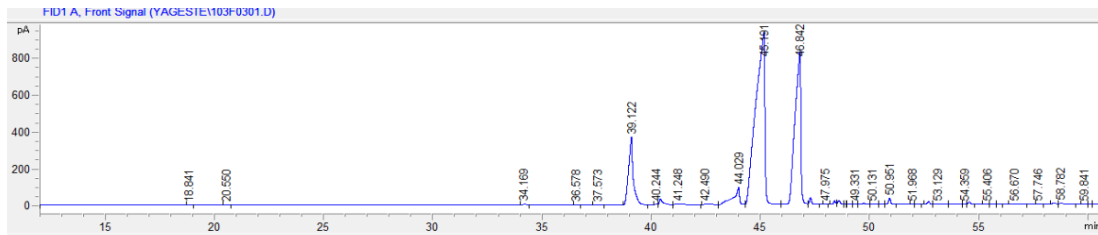
Şekil 4.5. γ -linolenik asit metil esterinin GC-FID Kromatogramı (t_R γ -linolenik asit metil ester= 35,04 dak)



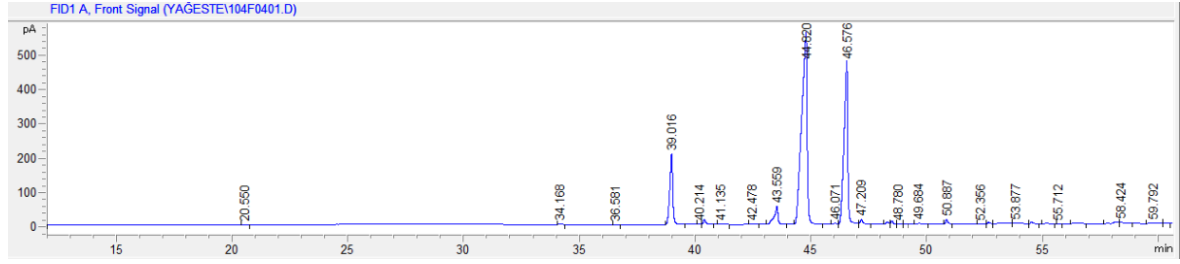
Şekil 4.6. Linoleik asit metil esterine ait GC-FID Kromatogramı (t_R linoleik asit metil ester= 34,32 dak)

4.3. Asit ve Baz Katalizli Türevlendirilen (Esterleştirilen) Zeytinyağı Numunesinin GC-FID ile Analizi

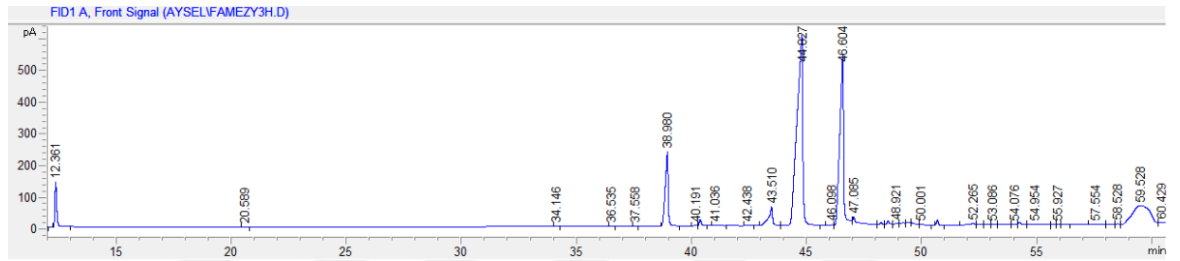
Zeytinyağı örnekleri IUPAC Yöntem 2,301 (Bölüm 3.3.3.a), Avrupa Farmakopesi 7,0 (Bölüm 3.3.3.b) ve H_2SO_4 katalizli (Bölüm 3.3.3.c) olmak üzere üç farklı yöntemle esterleştirilerek GC-FID ile analiz edildi. Zeytinyağı örneğinin üç farklı esterleştirme reaksiyonu sonrası GC-FID ile analizine ait kromatogramlar Şekil 4.6-8’de, içeriğindeki linoleik asit, linolenik asit ve γ -linolenik asit metil ester miktarları ise % a/a olarak Çizelge 4.4’te verilmiştir. Her üç esterleştirme yöntemi basitlik, zaman, kimyasal tüketimi ve kromatogram pik alanları açısından kıyaslandığında bundan sonraki çalışmalarda esterleştirme yöntemi olarak IUPAC Yöntem 2,301’in uygun olduğuna karar verilmiştir.



Şekil 4.7. IUPAC yöntem 2,301’e göre türevlendirilen zeytinyağının GC-FID kromatogramı



Şekil 4.8. Avrupa farmakopesi 7,0'a göre türevlendirilen zeytinyağının GC-FID kromatogramı



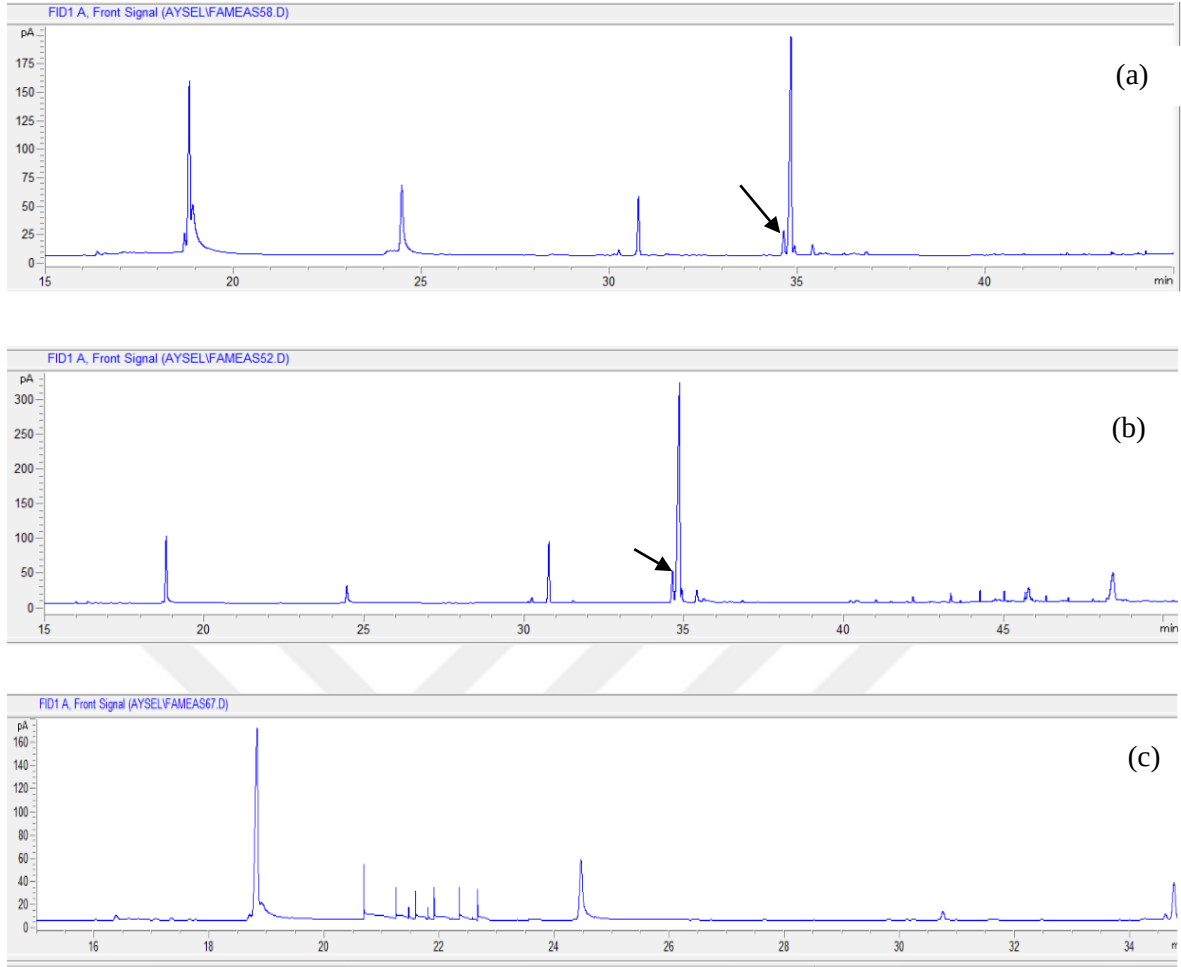
Şekil 4.9. Asit katalizli (H_2SO_4) türevlendirilen zeytinyağının GC-FID kromatogramı

4.4. Tepe Boşluk Mikroekstraksiyon (HSME) Yönteminin Optimizasyonu

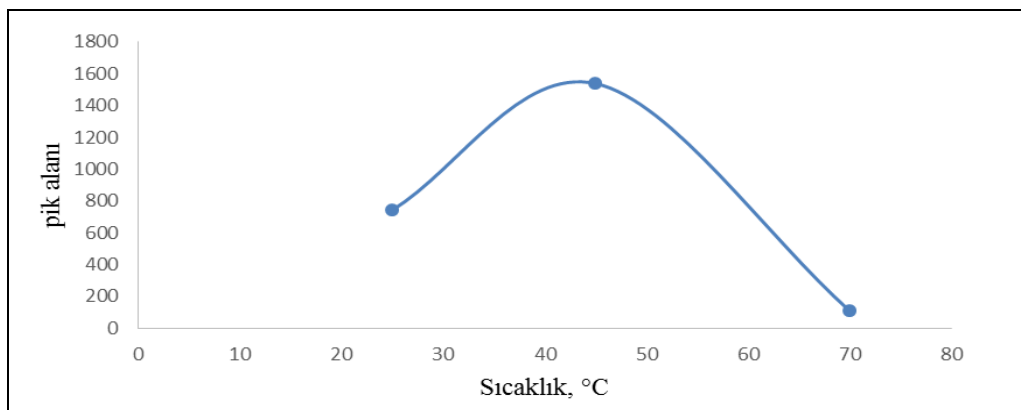
Optimizasyon çalışmalarında IUPAC yöntem 2,301'e göre türevlendirilen zeytin yağı kullanıldı. Zeytin yağındaki linoleik asit metil esteri ($t_R = 34.32$ dak) pik alanı dikkate alınarak tepe boşluk mikroekstraksiyon yöntemi için optimum koşullar belirlendi.

HSME Yönteminde Mikroekstraksiyon Sıcaklığının Optimizasyonu

Tepe boşluk mikroekstraksiyonun hızını ve verimliliğini etkileyen önemli parametrelerden biri sıcaklıktır. 360 μ l zeytinyağ FAMES 1,5 ml vial içerisine alınak 25, 45 ve 70 $^{\circ}C$ 'de HSME yapılarak GC-FID analiz edildi. Elde edilen kromatogramlar Şekil 4.9'da gösterilmiştir.



Şekil 4.10. Farklı mikroeekstraksiyon sıcaklıklarında HSME-GC-FID ile elde edilen zeytin yağı FAMEs kromatogramları a) 25 °C b) 45 °C c) 70 °C

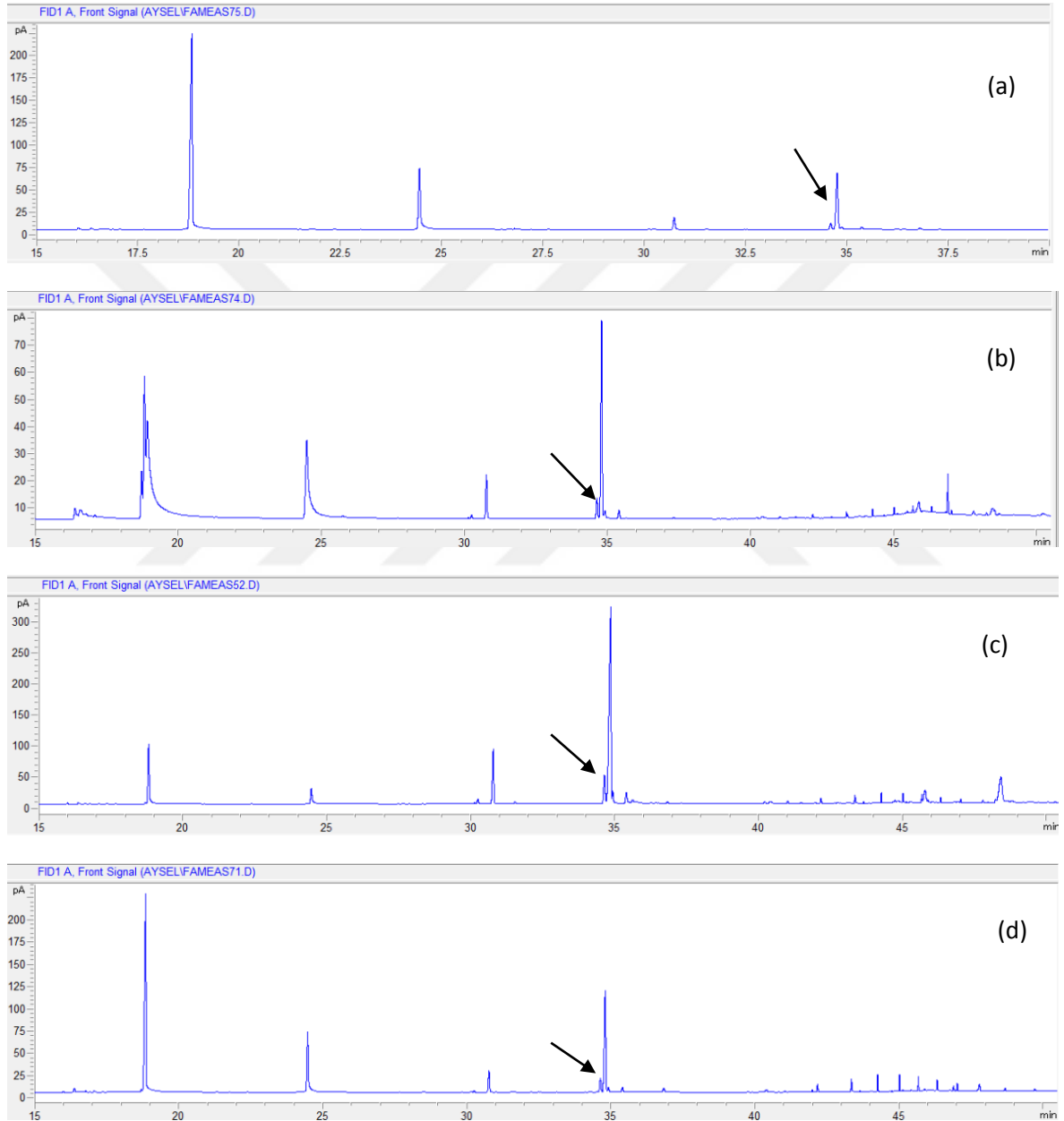


Şekil 4.11. HSME-GC-FID yönteminde linoleik asit metil ester pik alanlarına sıcaklığın etkisi

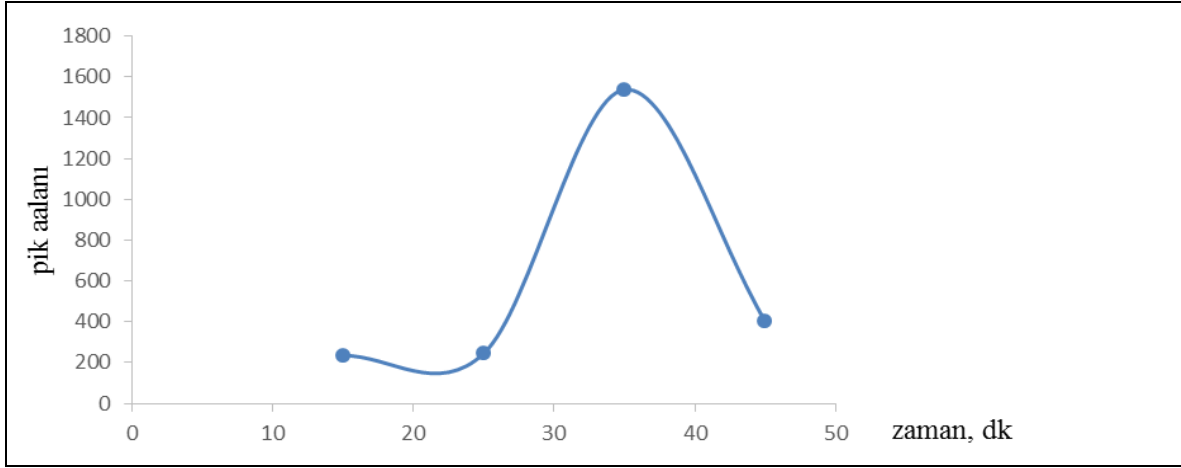
Sıcaklığa karşı linoleik asit metil esterinin pik alanları grafiğe geçirildiğinde (Şekil 4.10) en yüksek pik alanının elde edildiği 45 °C HSME için optimum sıcaklık olarak belirlenmiştir.

HSME Yönteminde Mikroekstraksiyon Süresinin Optimizasyonu

Ekstraksiyon süresini belirlemek için 45 °C’de 15, 25, 35 ve 45 dak yapılan mikroekstraksiyonlar sonrası GC-FID analiz sonucu elde edilen kromatogramlar Şekil 4.11’de görülmektedir.



Şekil 4.12. Farklı mikroekstraksiyon sürelerinde HSME-GC-FID ile elde edilen zeytinyağı FAMES kromatogramları a) 15 dak b) 25 dak c) 35 dak d) 45 dak (2,0 ml vial hacmi, 360 µl yağ asidi metil ester, mikroekstraksiyon sıcaklığı 45 °C)

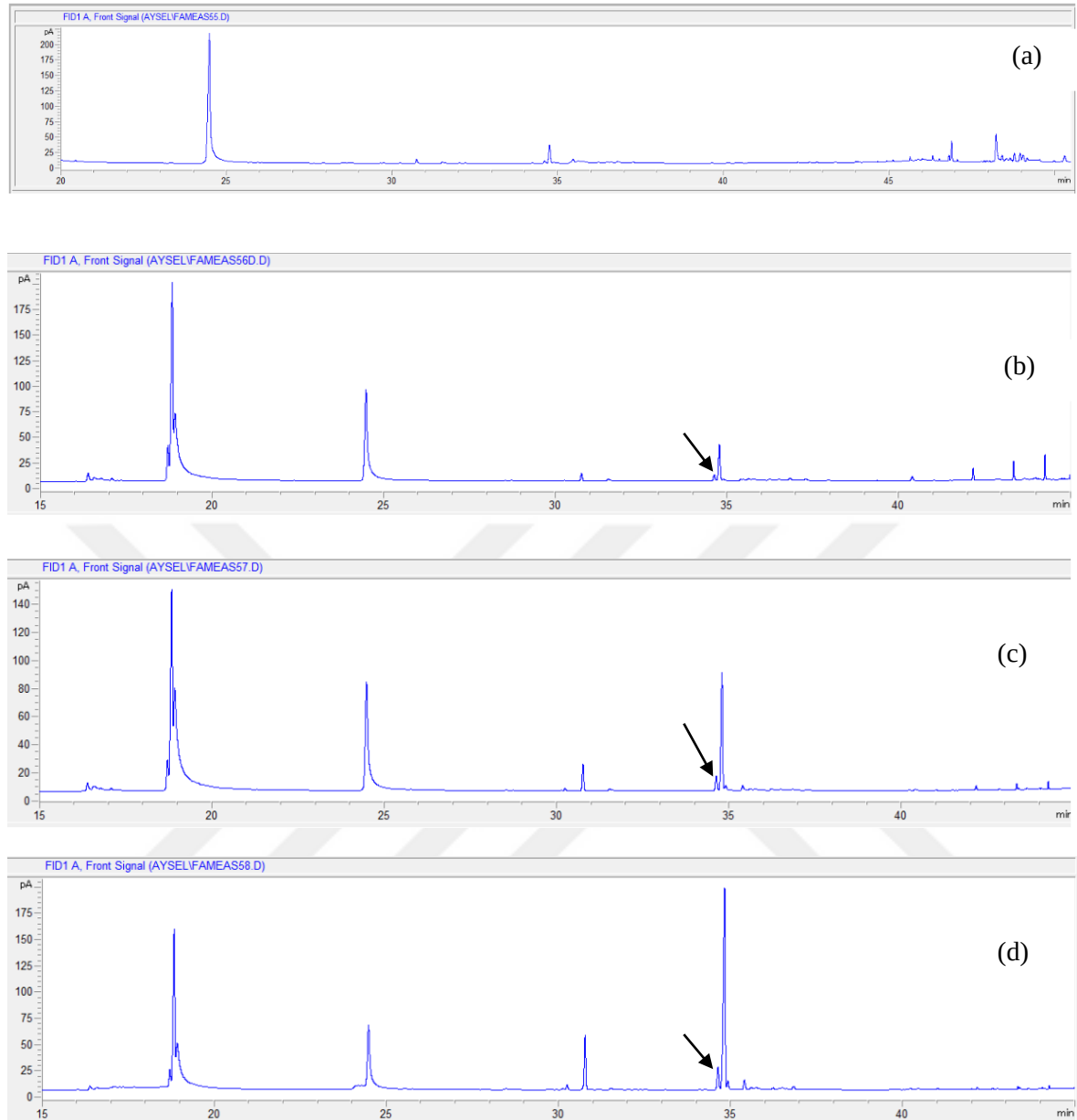


Şekil 4.13. Ekstraksiyon süresinin linoleik asit metil ester pik alanına etkisi (2,0 ml vial, 360 µl yağ asidi metil esteri, mikroekstraksiyon sıcaklığı 45 °C)

Ekstraksiyon süresine karşı linoleik asit metil esterinin pik alanları grafiğe geçirildiğinde HSME için optimum ekstraksiyon süresi olarak en yüksek pik alanının elde edildiği 35 dak seçilmiştir (Şekil 4.12).

HSME Yönteminde Mikroekstraksiyon çözücü oranının optimizasyonu

HSME yönteminde çözücü seçiminde çözücünün kaynama noktası ve vizkozitesi önemli parametrelerdir. Çözücünün kaynama noktasının gaz kromatografik analize uygun olacak kadar düşük, ekstraksiyon işlemi sırasında buharlaşmaması için de analitlerin kaynama noktasından yüksek olması istenir. Çözücünün şırınga iğnesinin ucunda tutunabilmesi için yeterince yüksek viskoziteye sahip olması, bunun yanı sıra ekstraksiyon süresini önemli derecede etkileyecek olan, analitin damlaya hızlı difüzyonuna imkân verecek viskozlukta olması gerekir. Çalışmamızda bu özelliklere uygun çözücü ve çözücü karışımları denendi. Ekstraksiyon çözücüsü olarak buhar basıncı düşük ve yağ asidi metil esterlerinin yüksek çözünürlükte olduğu sodyum dodesil sülfat, 1-bütanol karışımının mikroekstraksiyon işlemi için uygun olduğuna karar verildi. Sodyum dodesil sülfatın doymuş çözeltisi hazırlanarak bu çözeltinin %25 (a/h)'lik çözeltisi 1-bütanol ile 1:3 (h/h) oranında karıştırılarak mikroekstraksiyon için kullanıldı. Farklı oranlarda sodyum dodesil sülfat: 1-bütanol karışımının ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanılmasıyla elde edilen kromatogramlar Şekil 4.13'te ve pik alanlarına etkisi Çizelge 4.3'te gösterilmiştir.



Şekil 4.14. Farklı mikroekstraksiyon çözücü oranlarında (sodyum dodesil sülfat:1-bütanol, h/h) HSME-GC-FID ile elde edilen zeytin yağı kromatogramları a) 1:0 b) 1:1 c) 1:2 d) 1:3 (2,0 ml vial, 360 µl zeytinyağı yağ asidi metil ester, 45 °C mikroekstraksiyon sıcaklığı, 35 dak mikroekstraksiyon süresi)

Çizelge 4.3. Mikroekstraksiyon çözücü oranının (sodyum dodesil sülfat: 1-bütanol:, h/h) linoleik asit metil ester pik alanına etkisi (2,0 ml vial, 360 µl zeytinyağı yağ asidi metil ester, 20 dakika mikroekstraksiyon süresi, 45 °C mikroekstraksiyon sıcaklığı)

Çözücü Oranı, h/h (sodyum dodesil sülfat: 1-bütanol)	1:0	1:1	1:2	1:3
Linoleik asit metil ester pik alanı	95,86	112,37	290	403,33

Ekstraksiyon çözücü oranına karşı linoleik asit metil esterinin pik alanları dikkate alındığında en yüksek pik alanının elde edildiği sodyum dodesil sülfat: 1-bütanol (1:3, h:h) optimum tepe boşluk ekstraksiyon çözücü oranı olarak seçilmiştir (Çizelge 4.3).

HSME Yönteminde optimum koşullar

Zeytin yağındaki linolenik asit metil esteri pik alanı dikkate alınarak tepe boşluk mikroekstraksiyon yöntemi için optimum koşullar aşağıda listelenmiştir.

HSME çözücüsü: Sodyum dodesil sülfat: 1-bütanol (1:3, h:h)

HSME çözücü hacmi: 2 µl

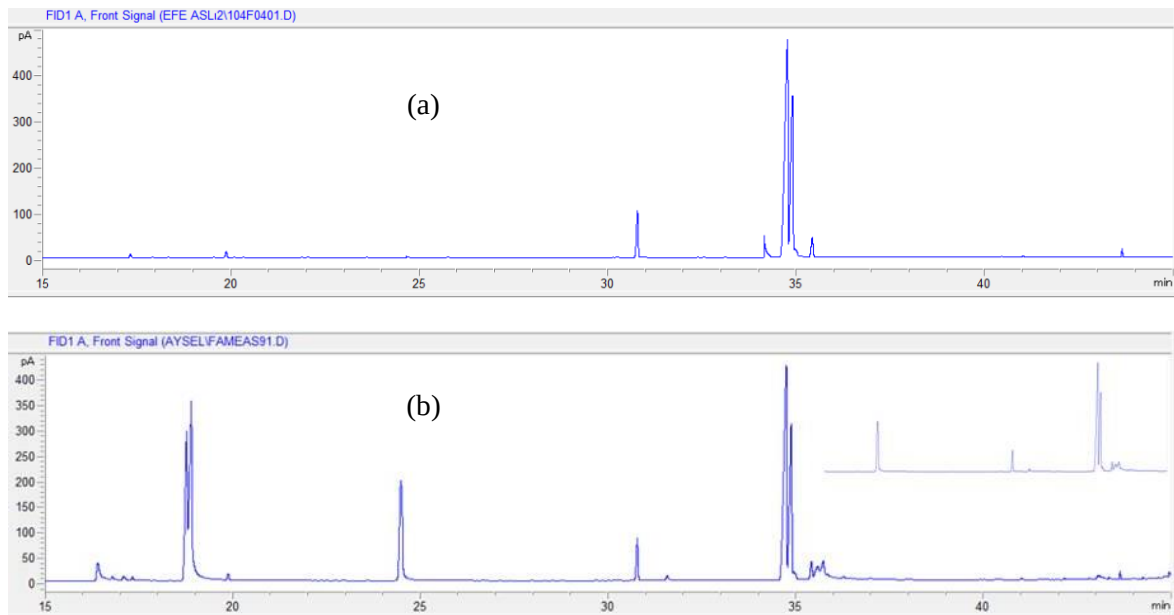
Mikroekstraksiyon süresi: 35 dak

NaCl miktarı: 0,07 gram

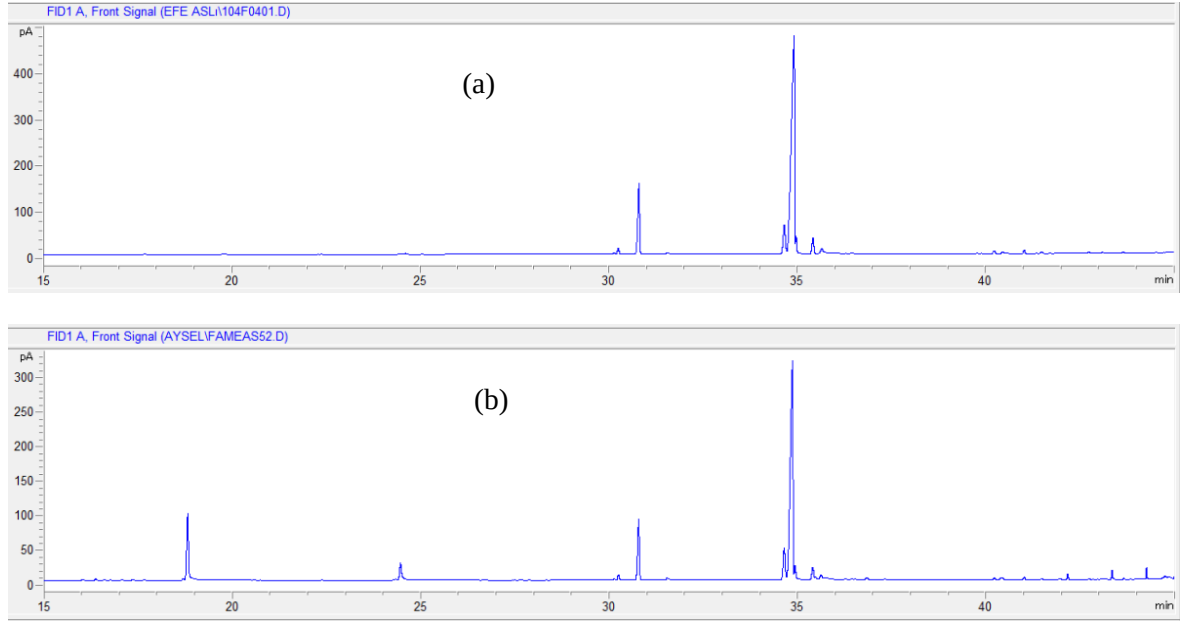
Numune miktarı: 360 µl

4.4.1. Çeşitli yağlardaki yağ asitlerinin GC-FID ve HSME-GS-FID ile analizi

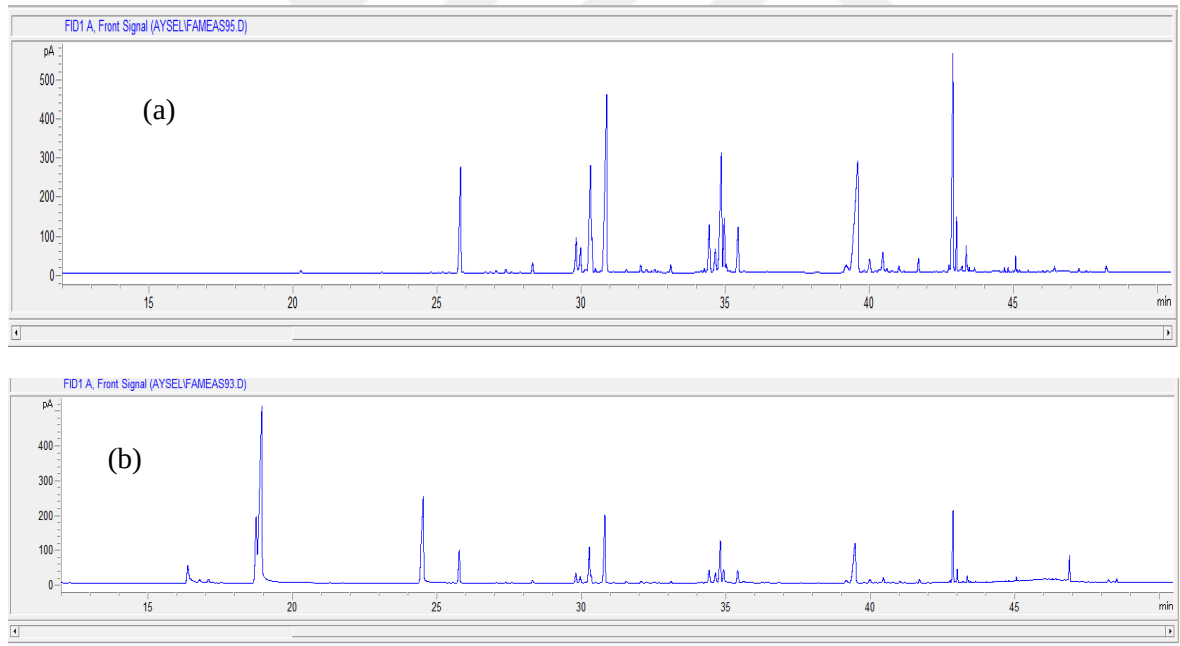
Kekik yağı, zeytin yağı ve balık yağı yağ asidi metil esterlerinin GC-FID ve optimum koşullarda HSME-GS-FID ile alınan kromatogramları sırasıyla Şekil 4.14-16'da verilmiştir.



Şekil 4.14. Kekik yağı metil esterlerinin a) GC-FID b) HSME-GC ile elde edilen kromatogramı



Şekil 4.15. Zeytin yağı metil esterlerinin a) GC-FID ile b) HSME-GC-FID ile elde edilen kromatogramı



Şekil 4.16. Balık yağı yağ asidi metil esterlerinin a) GC-FID b) HSME-GC-FID kromatogramı

Zeytinyağı, kekik yağı ve balık yağı yağ asidi metil esterlerinin alıkonma zamanları Şekil 4.3-5'teki standart linoleik asit metil esteri, linolenik asit metil esteri ve γ -linolenik metil esteri alıkonma zamanları ile karşılaştırılmış ve yağların içeriğindeki yağ asidi miktarları Çizelge 4.4'te verilmiştir.

Çizelge 4.4. GC-FID (n= 3) ve HS-SDME (n= 3) ile elde edilen FAMES miktarları, % (a/a),

Numune	Linoleik asit metil ester (% ortalama $\pm$ ss*)	γ -linolenik asit metil ester (% ortalama $\pm$ ss*)	Linolenik asit metil ester (% ortalama $\pm$ ss*)
Balık yağı (HSME-GC-FID)	1,0 $\pm$ 0,2	2,9 $\pm$ 0,4	1,2 $\pm$ 0,3
Balık yağı (GC-FID)	1,5 $\pm$ 0,1	2,8 $\pm$ 0,2	1,0 $\pm$ 0,2
$t_{\text{hesap}} < t_{\text{tablo}}$	1,78 < 2,78	0,61 < 2,78	1,1 < 2,78
Reference değer (balık yağı)[111]		0,5-3,0	0,5-3,0

*standart sapma
p= 0.05

Çizelge 4.4. (devam) GC-FID (n= 3) ve HS-SDME (n= 3) ile elde edilen FAMES miktarları, %(a/a),

Numune	Linoleik asit metil ester (% ortalama $\pm$ ss*)	γ -linolenik asit metil ester (% ortalama $\pm$ sd*)	Linolenik asit metil ester (% ortalama $\pm$ ss*)
Kekik yağı (HSME-GC-FID)	23,7 $\pm$ 1,3	1,0 $\pm$ 0,3	2,5 $\pm$ 0,1
Kekik yağı (GC-FID)	25,4 $\pm$ 1,5	1,4 $\pm$ 0,2	2,7 $\pm$ 0,2
$t_{\text{calculated}} < t_{\text{table}}$	2,55 < 2,78	1,00 < 2,78	2,08 < 2,78
Referans değer (kekik yağı) [112]		max 1,2	3,5-20,0

Zeytin yağı (HSME-GC-FID)	5,2 $\pm$ 0,5	1,7 $\pm$ 0,2	2,2 $\pm$ 0,1
Zeytin yağı (GC-FID)	5,9 $\pm$ 0,2	1,9 $\pm$ 0,1	2,1 $\pm$ 0,2
$t_{\text{hesap}} < t_{\text{tablo}}$	1,21 < 2,78	0,51 < 2,78	0,78 < 2,78
Referans değer (zeytin yağı)[113]		max 1,2	3,5-20

*standart sapma
p= 0.05

Zeytinyağı, kekik yağı ve balık yağı yağ asidi metil esterlerinin GC-FID ve HSME-GS-FID analiz sonuçları alan normalizasyon yöntemine göre toplam yağ asidi metil ester miktarları üzerinden hesaplanmıştır. Sonuçlar referans değerlerle uyumludur. Student t-testine göre GC-FID ve HSME-GC-FID analiz sonuçları kıyaslandığında fark anlamsız bulunmuştur.

4.4.2. HSME–GC-FID Analizine ait kromatografik veriler

HSME–GC-FID ve GC-FID ile yağ asitlerinin analizinde kolon performans değerleri balık yağı kromatogramı üzerinden hesaplanmış ve Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.6 da verilmiştir.

Çizelge 4.5. Balık yağı metil esterlerinin HSME–GC-FID analizine ait kromatografik veriler

Yağ asidi	t_R , dak	α	Teorik plaka sayısı (N)	R_s
Linoleik asit; 18:3	34,91	1,02	$7,4 \times 10^5$	8,90
Linolenik asit; C18:2	35,40	1,02	$6,3 \times 10^5$	8,90

Çizelge 4.6. Balık yağı metil esterlerinin GC-FID analizine ait kromatografik veriler

Yağ asidi	t_R , dak	α	Teorik plaka sayısı (N)	R_s
Linoleik asit; C18:3	34,96	1,02	$8,4 \times 10^5$	9,06
Linolenik asit; C18:2	35,44	1,02	$5,9 \times 10^5$	9,06

Bir kolonda, tabaka sayısının artması ve tabaka yüksekliğinin azalmasıyla kolon etkinliği artar. Türlerine ve içerdikleri hareketli ve durgun fazların çeşitliliğine bağlı olarak kolonun etkinliği büyük farklılıklar gösterebilir. Tabaka sayısı birkaç yüz ile birkaç bin arasında değişebilirken tabaka yüksekliği birkaç mm ile bir santimetrenin binde biri hatta daha az olabilir [114]. Kolon performans ölçütü olarak kullanılan N, pikin tutulma süresi t_R ve pikin zaman biriminden taban genişliğine bağlı olarak ölçülür. Kolonun ayırma gücü R_s değeri, kolonun iki analiti ayırma gücünün kantitatif ölçütüdür. Ayırma güçleri kolondan

çıkan iki türün alıkonma zamanları farkının iki ile çarpılması ve piklerin taban genişliğinin (zaman biriminden) toplamına bölünmesi ile bulunur. İki pik için R_s değeri 1,5 ve üzeri olduğunda iki türün ayrılması sağlanırken bu değer daha küçük olduğunda pikler arasında ayrılma olmaz. Buna göre teorik plaka sayısı yaklaşık 10^6 olup kolon verimi oldukça iyidir. Kolon ayırma gücünün 1,5'in üzerinde olması kolon ayırma gücünün uygun olduğunu göstermektedir.

4.5. Tek Damla Mikroekstraksiyon (SDME) Yönteminin Optimizasyonu

SDME yönteminde ekstraksiyon çözücüsü olarak hidrofobik ve yoğunluğu sudan farklı olan çözücülerden toluen, kloroform, karbon tetraklorür ve diklorometan mikroekstraksiyon çözücüsü olarak denendi. Mikroekstraksiyon çözücüsü olarak kullanılan bazı organik çözücülere ait fiziksel ve kimyasal özellikler Çizelge 4.7'de verilmiştir.

Çizelge 4.7. Organik çözücülerin fiziksel ve kimyasal özellikleri

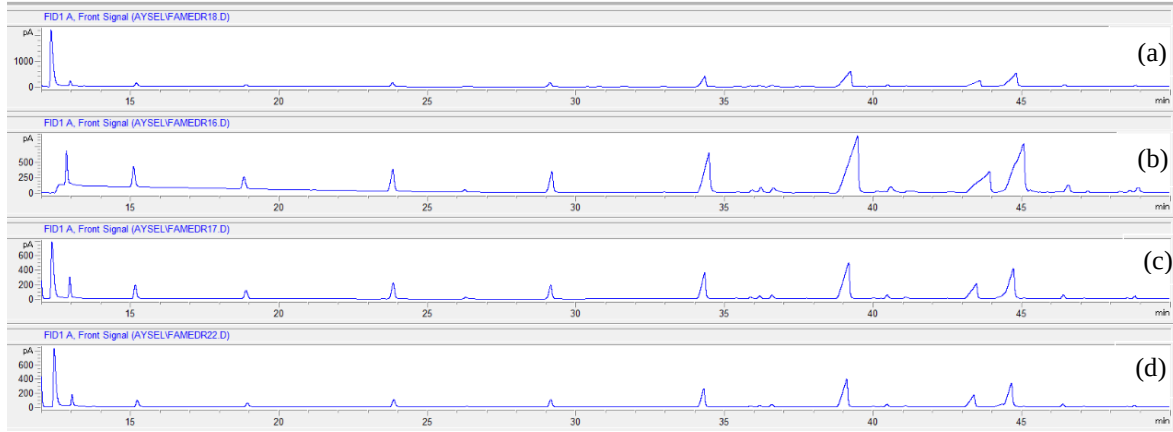
Çözücü	Yoğunluk, d (g/ml)	Sudaki çözünürlüğü
Toluen	0,867	0,52 g/l (20 °C'de)
Kloroform	1,49	0,809 g/100 ml (20 °C'de)
Karbon tetraklorür	1,59	0,081 g/100 ml (25 °C'de)
Diklorometan	1,33	13,2 g/l (25 °C'de)

Çalışmamızda sulu ortamda faz oluşturan ve karıştırma esnasında dağılmayan karbon tetraklorür mikroekstraksiyon çözücüsü olarak seçildi. Ekstraksiyon verimini etkileyen karıştırma hızı, sıcaklık, tuz etkisi için sodyum klorür derişimi, ekstraksiyon süresi ve ekstraksiyon çözücü miktarı parametrelerinin pik alanları üzerine etkisi incelenerek optimum koşullar belirlendi. Optimizasyon çalışmalarında her seferinde bir parametre değiştirilerek diğerinin sabit tutulduğu ardışık optimizasyon yaklaşımı kullanıldı. Optimizasyon çalışmasında veriler 3 tekrar sonucunda elde edildi. Farklı marka tereyağ, margarin, ayçiçeği yağı ve zeytin yağı numunelerinin içeriğindeki FAMES optimum koşullarda SDME-GC-FID ile analiz edildi. Optimizasyon çalışmalarında IUPAC yöntem 2,301'e

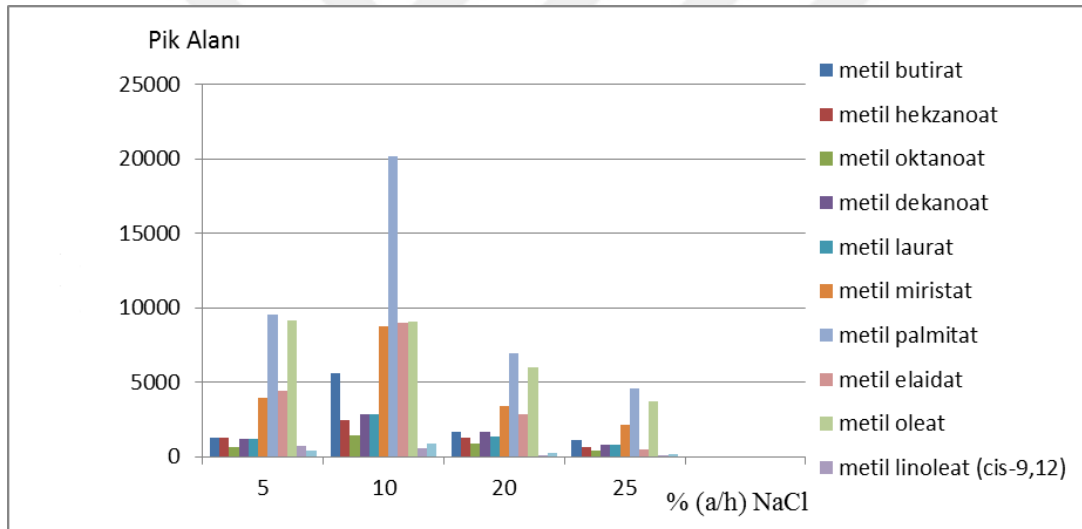
göre [9] türevlendirilen pastörize tereyağı yağ asiti metil esterlerinin 500 µl'si ve 20 µL CCl₄ ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanıldı.

SDME yönteminde NaCl derişiminin optimizasyonu

Geleneksel ekstraksiyon yöntemlerde ekstraksiyon etkinliğini artırmak ve organik faz içerisindeki polar analitlerin bozunmadan kalmasını sağlamak için sulu örnek çözeltisine tuz eklenmesi kabul edilen bir yaklaşımdır. Sulu ortamda hazırlanmış örneklere elektrolit ilavesiyle ortamın iyonik şiddeti arttığından polar analitlerin sudaki çözünürlüğü ve organik bileşiklerin sudaki çözünürlüğü azalır. Böylece organik faza geçen analit oranı ve buna bağlı olarak yöntemin ekstraksiyon etkinliği artar. Analitlerin sudaki çözünürlüğünün azalması, sulu ortamdaki iyonik tuz moleküllerinin (tuz etkisi) hidrasyon tabakasını sarmasıyla gerçekleşir. Ayrıca tuz molekülleri, polar moleküller ile elektrostatik etkileşime girerek analitlerin kütle transferinin azalmasına neden olabilir. Analitlerin çözünürlüğüne bağlı olarak, yüksek tuz derişimlerinde tuz etkisiyle ekstraksiyonun etkinliği artabilir veya çözeltide dağılmış olarak bulunan yüklü tanecikler (elektrolitler ve analitler) arasındaki çekim kuvvetleri nedeniyle analitlerin ekstraksiyonu azalabilir. Örnek çözeltisine tuz eklenmesi genellikle ekstraksiyon etkinliği arttırır. Ancak yüksek derişimlerde tuz varlığı ekstraksiyon filminin fiziksel özelliklerini değiştirebileceğinden organik faz içine analitin difüzlenme oranının azalmasına da neden olabilir. Bu nedenle SDME verimine tuz (NaCl) derişiminin etkisi, 500 µl tereyağı metil esterlerinin 50 µl CCl₄ ile 20 dak mikroekstraksiyon süresinde, 25 °C'de, 500 rpm karıştırma hızında incelenmiştir. Pik alanına tuz etkisi %0, %5, %10, %20 ve %25 (a/h) sodyum klorür çözeltileri ile denenmiştir. Mikroekstraksiyon işleminde ortama NaCl eklenmediğinde alt faz bulanık olup damla görülemediğinden analiz gerçekleştirilememiştir. %0-25 (a/h) NaCl derişimlerinde elde edilen kromatogramlar Şekil 4.18'de, NaCl derişiminin pik alanına etkisi ise Şekil 4.19'da verilmiştir.



Şekil 4.17. Farklı NaCl derişimlerinde (a/h) tereyağı metil esterlerinin SDME-GC-FID kromatogramları (500 µl tereyağı metil esterleri, 50 µl CCl₄, 20 dak, 25 °C ve 500 rpm karıştırma hızı) a) %5 (a/h) NaCl b) %10 (a/h) NaCl c) %20 (a/h) NaCl d) %25 (a/h) NaCl



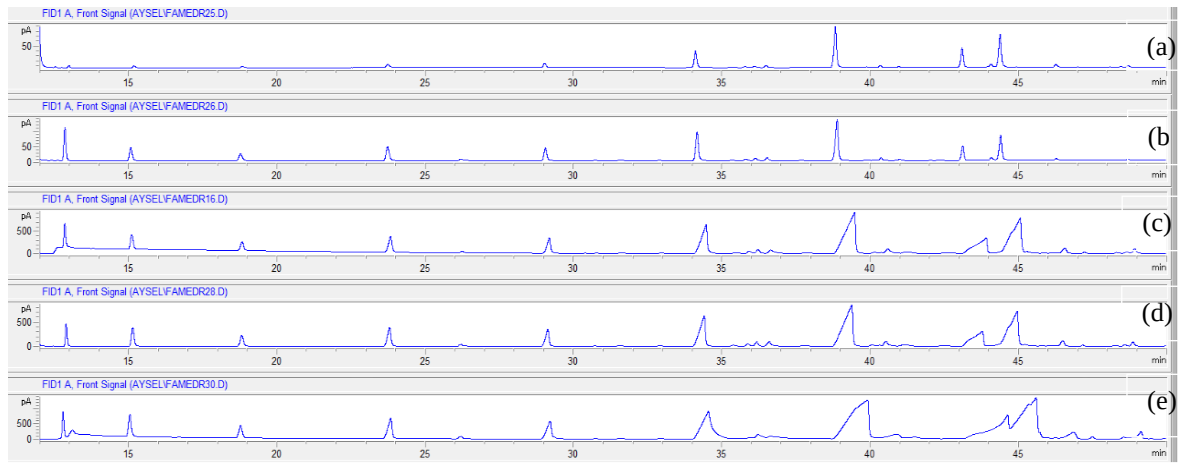
Şekil 4.18. Tereyağı metil esterlerinin SDME-GC-FID ile analizinde NaCl derişiminin pik alanlarına etkisi

En yüksek pik alanının elde edildiğı %10 NaCl (a/h) derişimi optimum NaCl derişimi olarak seçilmiştir.

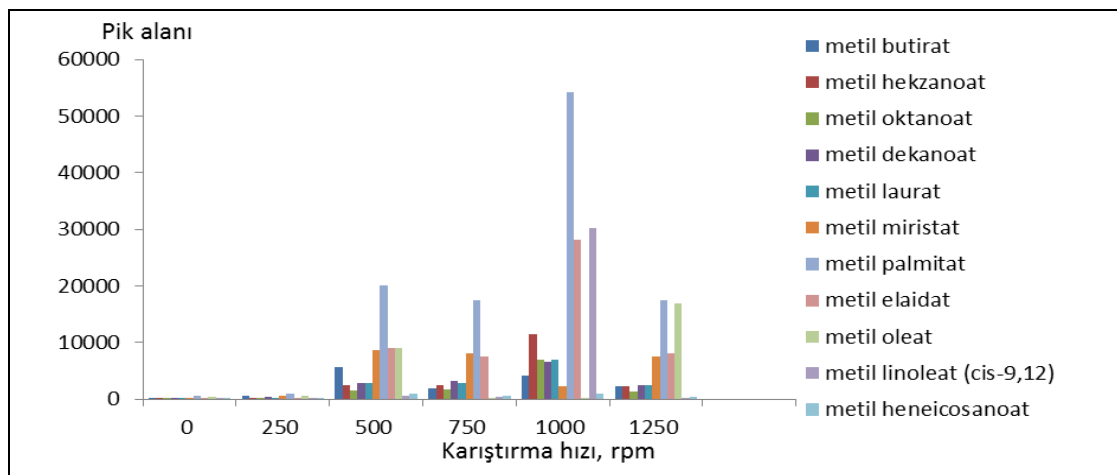
SDME yönteminde karıştırma hızının optimizasyonu

Sıvı faz mikroekstraksiyon tekniklerinde karıştırma, sulu faz ile ekstraksiyon çözücüsü arasındaki transferi arttırmada etkili bir yoldur. Örneğı karıştırma, analitin organik faza olan dağılımını arttırarak örnek çözeltisi ile damla arasındaki denge için gerekli zamanın azalmasını sağlar. Diğer yandan çok yüksek karıştırma hızı organik damlanın dağılmasına

ve bozulmasına sebep olacağı için ekstraksiyon veriminde azalmaya neden olabilir. Bu amaçla uygun bir karıştırma hızı seçimi önemlidir. Karıştırma hızının optimizasyonunda %10 (a/h) NaCl, 500 µl tereyağı metil esterleri, 50 µl CCl₄, 25 °C ve 20 dak mikroekstraksiyon ortamında 0, 250, 500, 750, 1000 ve 1250 rpm karıştırma hızları denenmiş ve karıştırma hızının pik alanına etkisi incelenmiştir. Farklı karıştırma hızlarında elde edilen kromatogramlar Şekil 4.20'de ve karıştırma hızının pik alanına etkisi Şekil 4.21'de verilmiştir.



Şekil 4.19. Farklı karıştırma hızlarında tereyağı metil esterlerinin SDME-GC-FID kromatogramları (%10 NaCl (a/h), 500 µl tereyağı metil esterleri, 50 µl CCl₄, 25 °C ve 20 dak mikroekstraksiyon ortamı) a) 0 rpm b) 250 rpm c) 500 rpm d) 750 rpm e) 1000 rpm f) 1250 rpm

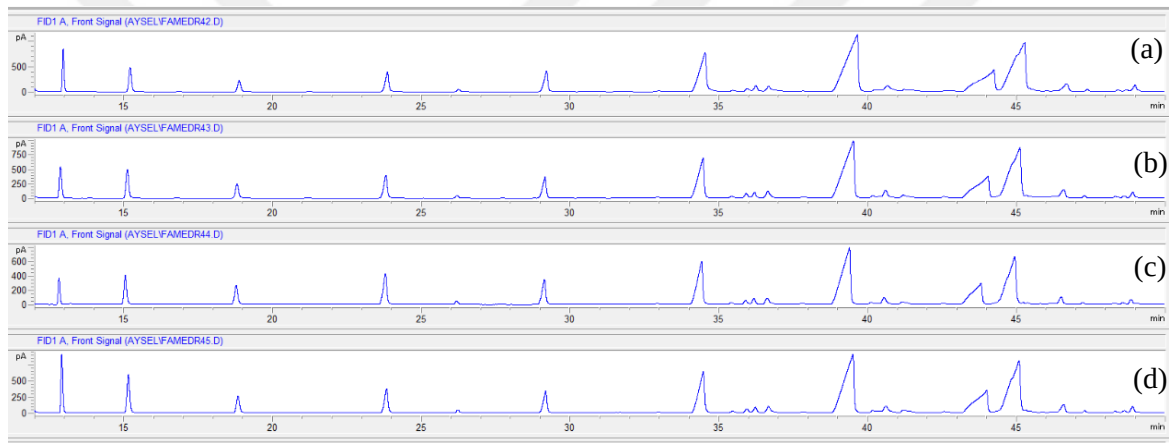


Şekil 4.20. Tereyağı metil esterlerinin SDME-GC-FID ile analizinde karıştırma hızının pik alanlarına etkisi (%10 NaCl (a/h), 500 µl tereyağı metil esterleri, 50 µl CCl₄, 25 °C ve 20 dak mikroekstraksiyon ortamı)

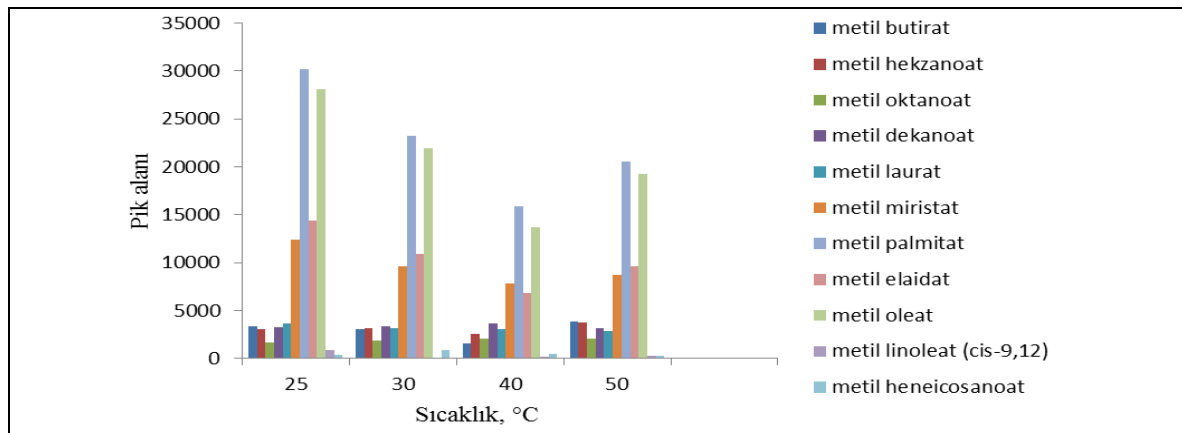
Optimum karıştırma hızı olarak en yüksek pik alanlarının elde edildiği 1000 rpm karıştırma hızı olarak belirlenmiştir. 1250 rpm karıştırma hızında damlacık kararlılığı bozulduğundan daha yüksek hızlarda karıştırma hızı denenmemiştir.

SDME yönteminde sıcaklık optimizasyonu

Mikroekstraksiyonun yapıldığı sıcaklık ekstraksiyon verimini etkileyen önemli parametrelerden biridir. Pik alanlarının sıcaklık ile değişimini gözlemlemek için 25 °C, 30 °C, 40 °C ve 50 °C sıcaklıklarda ekstraksiyon yapılarak elde edilen kromatogramlar Şekil 4.22’te, sıcaklığın pik alanına etkisi ise Şekil 4.23’te verilmiştir.



Şekil 4.21. Tereyağı metil esterlerinin farklı mikroekstraksiyon sıcaklıklarında SDME-GC-FID kromatogramları (%10 (a/h) NaCl, 500 µl tereyağı metil esterleri, 50 µl CCl₄, 20 dak ve 1000 rpm mikroekstraksiyon ortamı) a) 25 °C b) 30 °C c) 40 °C d) 50 °C

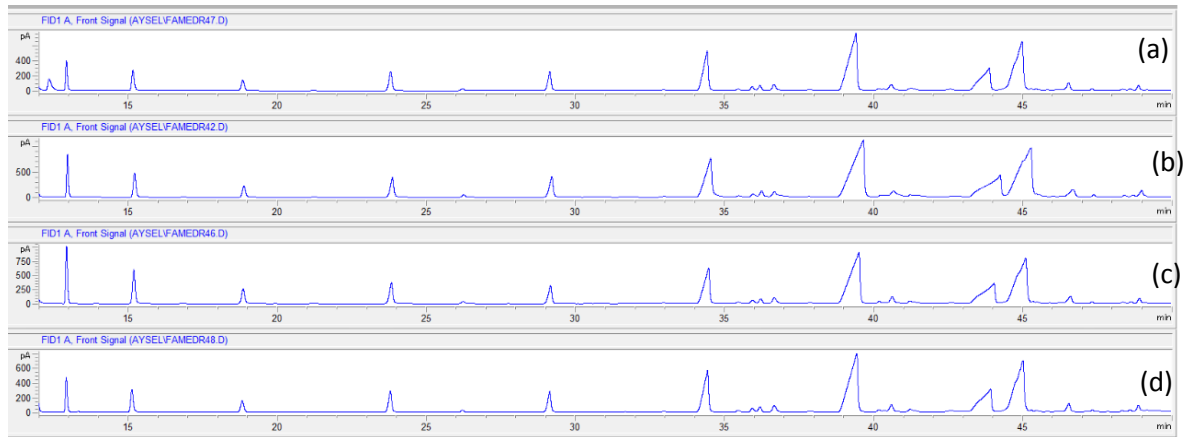


Şekil 4.22. Tereyağı metil esterlerinin SDME-GC-FID ile analizinde mikroekstraksiyon sıcaklığının pik alanlarına etkisi (%10 (a/h) NaCl, 500 µl tereyağı metil esterleri, 50 µl CCl₄, 20 dak, 1000 rpm mikroekstraksiyon ortamı)

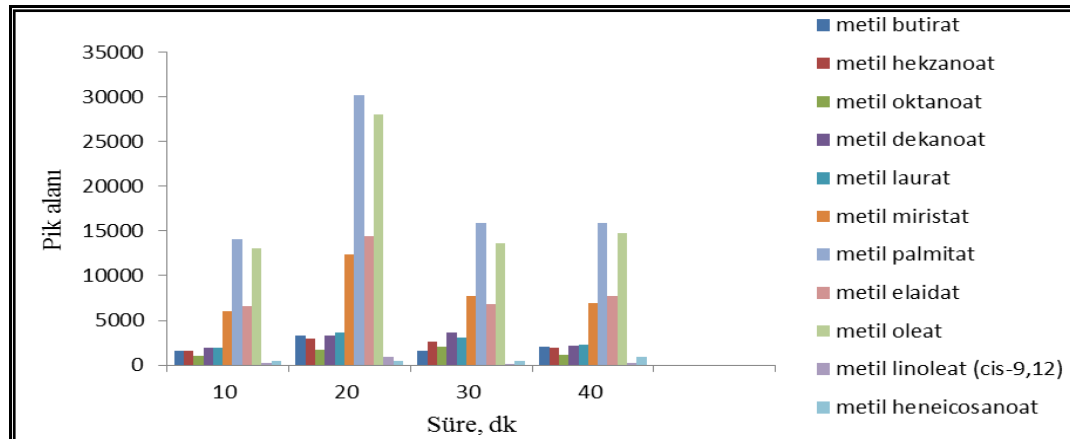
En yüksek pik alanının elde edildiği 25 °C optimum koşul olarak belirlenmiştir.

SDME yönteminde mikroekstraksiyon süresinin optimizasyonu

Mikroekstraksiyon süresinin pik alanlarına etkisi 10, 20, 30 ve 40 dak ekstraksiyon sürelerinde yapılmış ve SDME-GC-FID ile analizinde elde edilen kromatogramlar Şekil 4.24'te ekstraksiyon sürelerin pik alanına etkisi ise Şekil 4.25'te gösterilmiştir.



Şekil 4.23. Tereyağı metil esterlerinin farklı mikroekstraksiyon sürelerinde SDME-GC-FID kromatogramları (%10 NaCl (a/h), 500 µl tereyağı metil esterleri, 50 µl CCl₄, 25 °C, 1000 rpm mikroekstraksiyon ortamı) a) 10 dak b) 20 dak c) 30 dak d) 40 dak

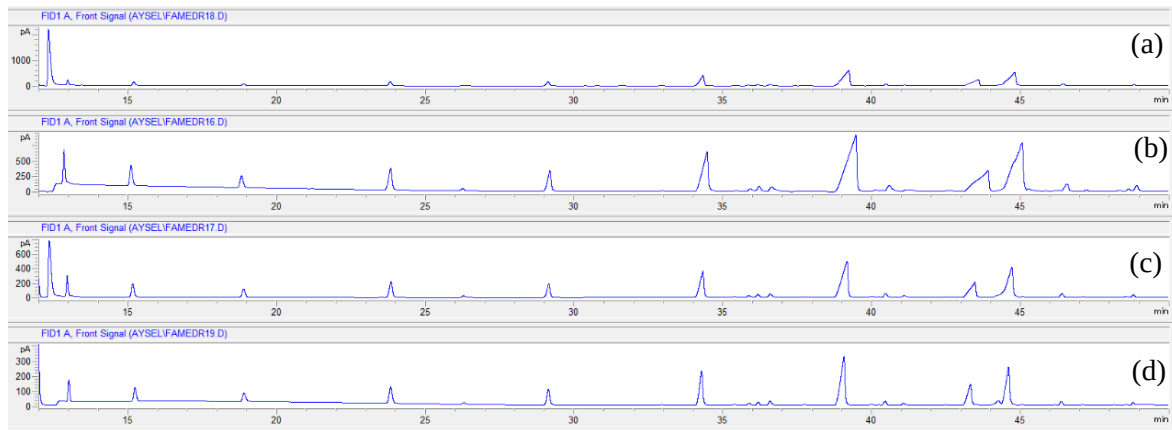


Şekil 4.24. Tereyağı metil esterlerinin SDME-GC-FID ile analizinde mikroekstraksiyon karıştırma süresinin optimizasyonu (%10 NaCl, 500 µl tereyağı metil esterleri, 50 µl CCl₄, 25 °C, 1000 rpm mikroekstraksiyon ortamı)

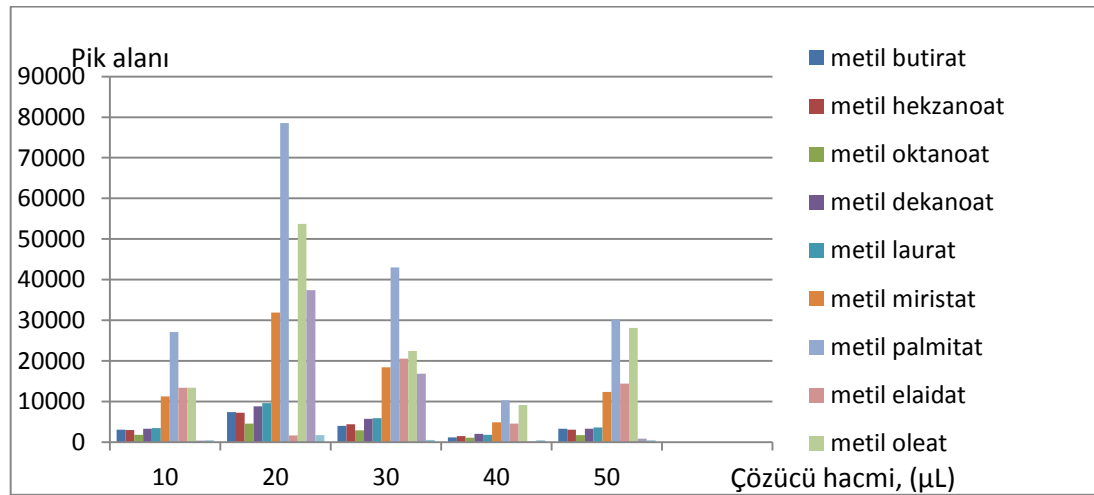
Pik alanının en yüksek olduğu 20 dak CCl₄ optimum ekstraksiyon süresi olarak belirlenmiştir.

SDME yönteminde çözücü miktarının optimizasyonu

Ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanılan karbon tetraklorür (CCl_4)'ün hacmi ekstraksiyon verimini etkileyen diğer bir parametredir. Ekstraksiyon çözücü hacminin pik alanlarına etkisi 10, 20, 30, 40 ve 50 μL CCl_4 kullanılarak denenmiş ve SDME-GC-FID ile analizinden elde edilen kromatogramlar Şekil 4.26'da ekstraksiyon çözücü hacminin pik alanına etkisi ise Şekil 4.27'de gösterilmiştir.



Şekil 4.25. Tereyağı metil esterlerinin farklı CCl_4 miktarlarında SDME-GC-FID kromatogramları (%10 NaCl (a/h), 500 μL tereyağı metil esterleri, 25 $^{\circ}\text{C}$, 20 dak ve 1000 rpm mikroekstraksiyon ortamı) a) 10 μL b) 20 μL c) 30 μL d) 40 μL



Şekil 4.26. Tereyağı metil esterlerinin SDME-GC-FID ile analizinde mikroekstraksiyon çözücü (CCl_4) hacminin pik alanlarına etkisi (%10 NaCl, 500 μL tereyağı metil esterleri, 25 $^{\circ}\text{C}$, 20 dak ve 1000 rpm mikroekstraksiyon ortamı)

Pik alanının en yüksek olduğu 20 μL CCl_4 optimum ekstraksiyon hacmi olarak belirlenmiştir.

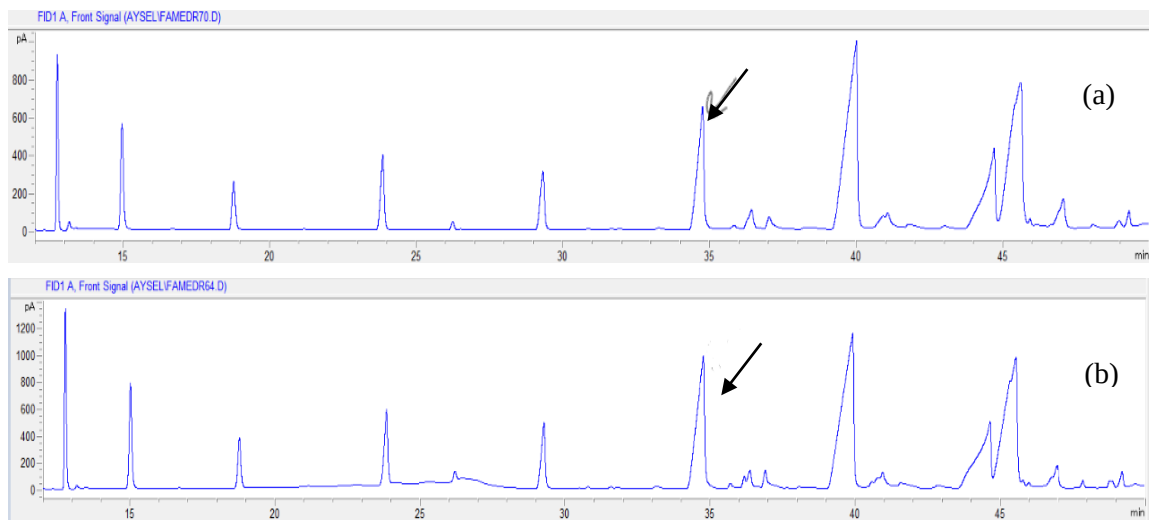
4.5.1. Optimum Koşullarda Tek Damla Mikroekstraksiyon (SDME) Yönteminin yağ numunelerinde uygulanması

Tek Damla Mikroekstraksiyon (SDME) Yönteminin optimum koşulları Çizelge 4.8’de verilmiştir.

Çizelge 4.8. SDME yönteminde optimum koşullar

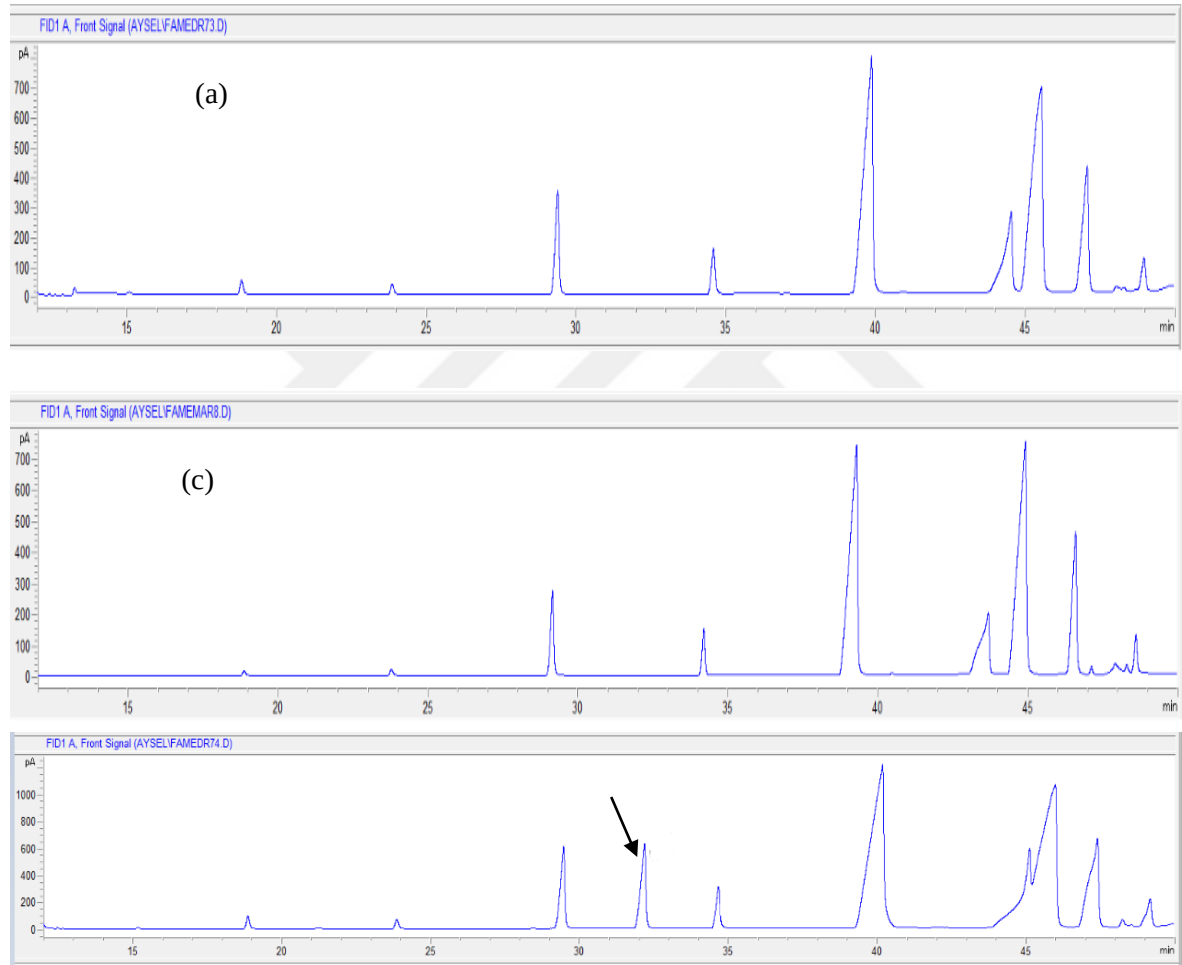
SDME çözücüsü	CCl ₄
SDME çözücü hacmi	20 µl
Karıştırma hızı	1000 rpm
Karıştırma süresi	20 dak
NaCl miktarı	%10 (a/h)
Numune miktarı	500 µl
SDME sıcaklığı	25 °C

Tereyağı, margarin, ayçiçek yağı ve zeytin yağı türevlendirildikten sonra optimum koşullarda (Çizelge 4.8) önzenginleştirilerek GC-FID ile analiz edilmiştir. Elde edilen kromatogramlardaki alıkonma zamanları, Supelco 37 comp. FAME mix, FAME 37, C4-24 standartlarının alıkonma zamanları ile karşılaştırılarak yağlarda bulunan yağ asitleri tayin edilmiştir. Türevlendirilmiş tereyağ numunesi üzerine miristik asit metil ester standardı ilavesinden sonra aynı şartlarda yapılan analiz sonucu alıkonma zamanları ve pik alanları karşılaştırılmış ve miristik asit metil esterine ait 34.78 dak’daki pik alanındaki artışa göre geri kazanım %95-105 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.28).



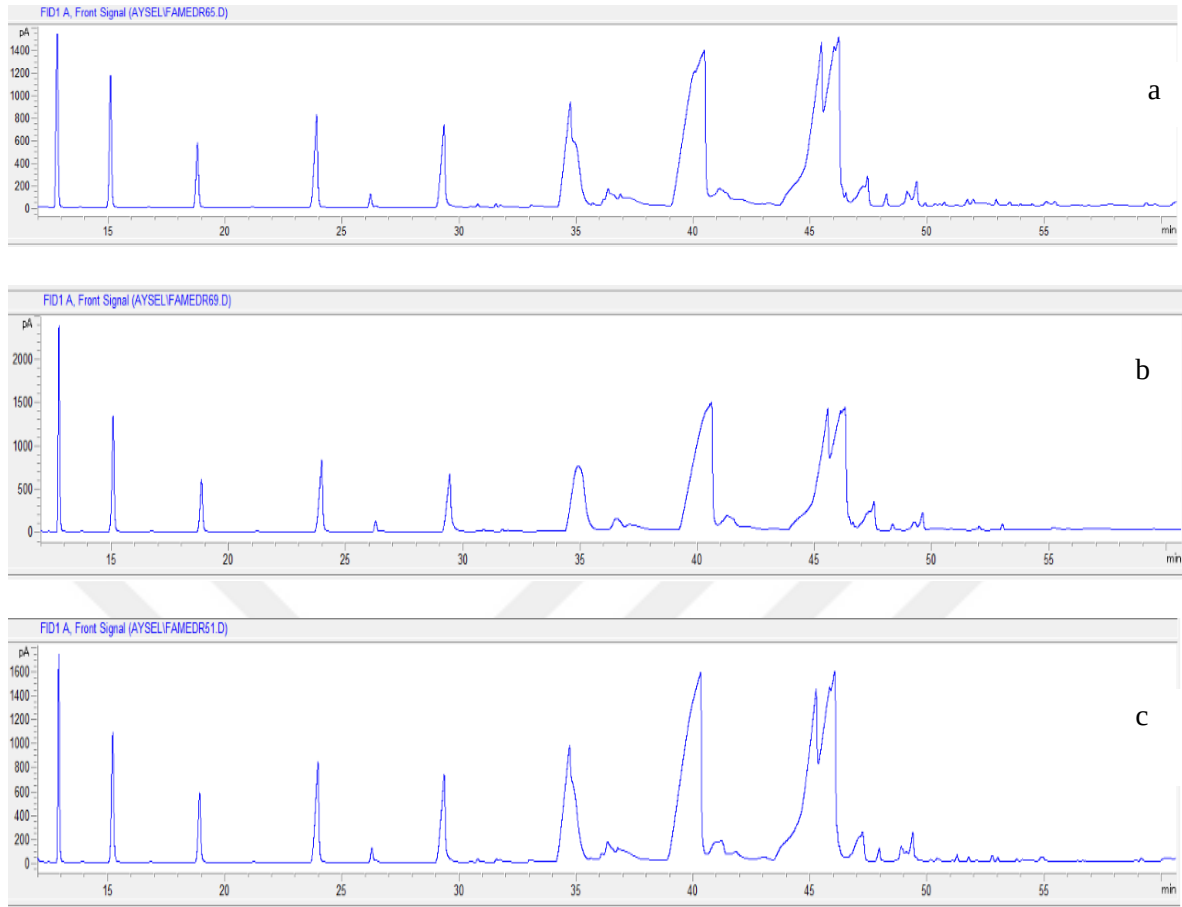
Şekil 4.27. Tereyağı metil esterlerinin a) SDME-GC-FID b) Miristik asit ilavesinden sonra SDME-GC-FID kromatogramları

Esterleştirilmiş margarin numunesinin optimum şartlarda SDME-GC-FID ve GC-FID ile analizinden elde edilen kromatogramlar Şekil 4.29’da görülmektedir. Kromatogramlarda yağ asitleri pik alanları karşılaştırıldığında SDME yöntemi sonrası GC-FID ile elde edilen kromatogramda pik alanlarındaki artış özenginleştirmenin başarıyla yapıldığını göstermektedir. Esterleştirilmiş margarin numunesi üzerine 10 µl tridekanoik asit metil ester standartı eklenip SDME-GC-FID ile analiz edilmiş ve 32,40 dak alıkonma zamanında tridekanoik asit metil ester piki gözlenmiştir (Şekil 4.29).



Şekil 4.28. Margarin yağ asiti metil esterlerinin a) SDME-GC-FID b) GC-FID c) Tridekanoik asit metil ester standartının eklenmesinden sonra SDME-GC-FID kromatogramları

Esterleştirilen yağ asitleri metil esterlerinin en fazla kaç saat kullanılacağını belirlemek için 0. saat, 12 saat -20 °C ve 24. saat -20 °C’de bekletildikten sonra SDME-GC-FID kromatogramları alınmıştır [9]. Esterleştirilen tereyağ numunesinin analizlerden elde edilen kromatogramlar Şekil 4.30’da, % (a/a) yağ asiti miktarları ise Çizelge 4.8’de verilmiştir.



Şekil 4.29. Tereyağı yağ asitleri metil esterlerinin SDME-GC-FID ile a) 0. Saat b) 12 saat -20 °C’de c) 24 saat-20 °C’de bekletilmesinden sonraki kromatogramları

Çizelge 4.9. Gün içi kararlılık

Yağ asiti	0. Saat	12 saat (-20 °C)	24 saat (-20 °C)	%RSD
C4:0	% 3,1	% 3,4	% 2,4	18,3
C6:0	% 2,5	% 2,9	% 2,3	11,5
C10:0	% 2,7	% 2,8	% 2,8	2,1
C12:0	% 3,0	% 2,8	% 3,1	4,5
C14:0	% 9,9	% 9,5	% 10,3	3,9
C16:0	% 24,6	% 25,5	% 25,4	2,1

Çizelge 4.9’a göre metil esterlerin gün içi kararlılığı kısa zincirli yağ asitleri için %RSD 11,5–18,3 arasında iken uzun zincirli yağ asitleri için %RSD 2,1-4,5 arasında değişmektedir. Farmakopeye belirtilen yağ asitleri aralıklarına bakıldığında kesinlik kabul edilebilir değerler arasında olmakla birlikte çalışmalarımızın devamında hazırlanan yağ asiti metil esterleri -20 °C’de en fazla 12 saat boyunca kullanılmıştır.

4.5.2. SDME-GC-FID Yöntemi için Kromatografik Veriler

Çizelge 4.10’da SDME-GC-FID ile Rt-2560 kolon kullanılarak alınan kromatogramlara ait ard arda gelen piklerden hesaplanan veriler yer almaktadır. Buna göre teorik plaka sayısı yaklaşık 10^6 olup kolon verimi oldukça iyidir. Kolon ayırma gücünün (R_s) 1,5’in üzerinde olması kolon ayırma gücünün uygun olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.10. SDME-GC-FID ile tereyağı yağ asiti metil esterleri için kromatografik veriler

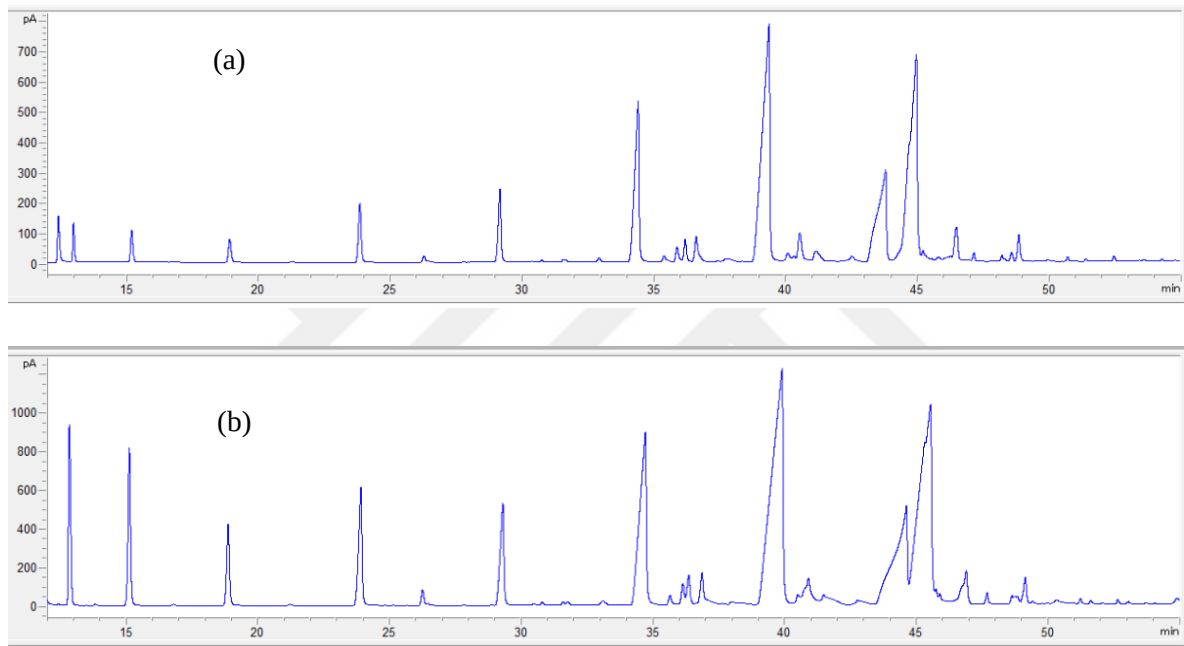
Yağ asidi	$t_{R,dak}$	α	Teorik plaka sayısı (N)	R_s
C4:0	13,01	1,17	$5,5 \times 10^5$	27,6
C6:0	15,22	1,56	$4,5 \times 10^5$	27,6
C10:0	23,84	1,22	$9,0 \times 10^5$	24,3
C12:0	29,16	1,08	$1,3 \times 10^6$	12,1
C14:0	31,55	1,43	$2,4 \times 10^6$	13,0
C18:1	45,30	1,02	$4,0 \times 10^6$	3,72
C18:2	46,27	1,02	$3,4 \times 10^6$	1,60

Çizelge 4.11. Tereyağı yağ asiti metil esterlerinin GC-FID analizinde kromatografik veriler.

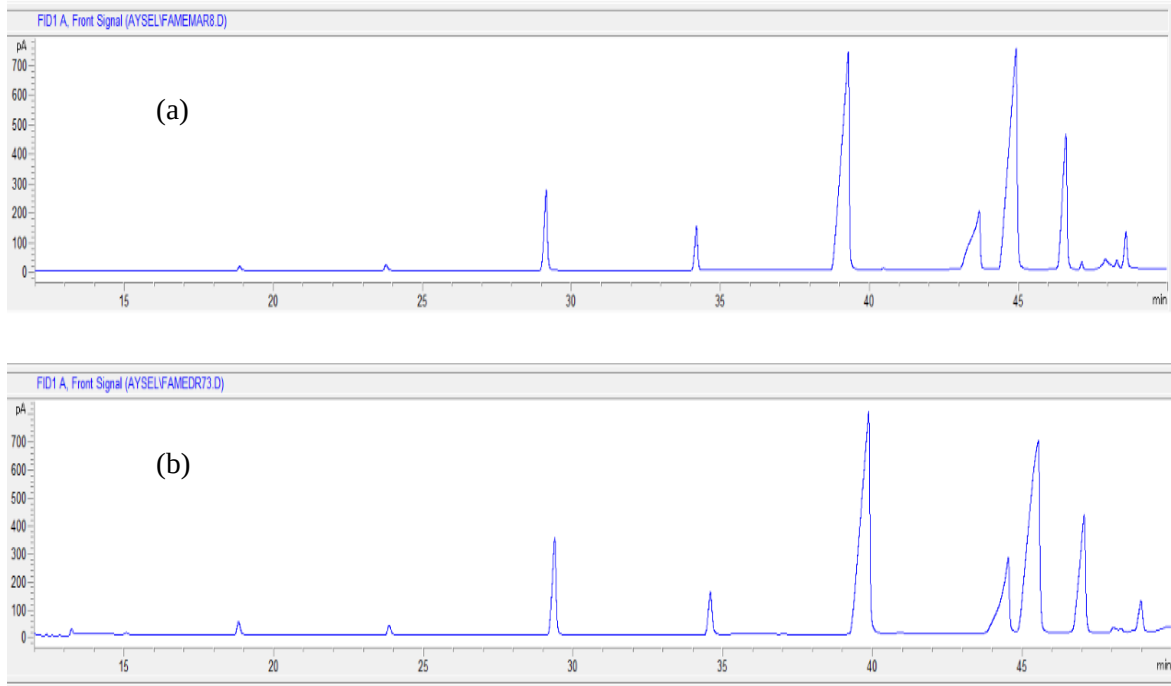
Yağ asidi	$t_{R,dak}$	α	Teorik plaka sayısı (N)	R_s
C4:0	12,97	1,17	$5,4 \times 10^5$	13,87
C6:0	15,20	1,57	$4,5 \times 10^5$	13,87
C10:0	23,81	1,22	$9,0 \times 10^5$	26,40
C12:0	29,09	1,09	$1,3 \times 10^6$	27,05
C14:0	31,66	1,43	$1,9 \times 10^6$	27,05
C18:1	45,43	1,02	$4,0 \times 10^6$	10,59
C18:2	46,33	1,02	$5,3 \times 10^6$	10,59

4.6. SDME-GC-FID Yöntemi ile Yağ Asitlerinin Miktar Tayini

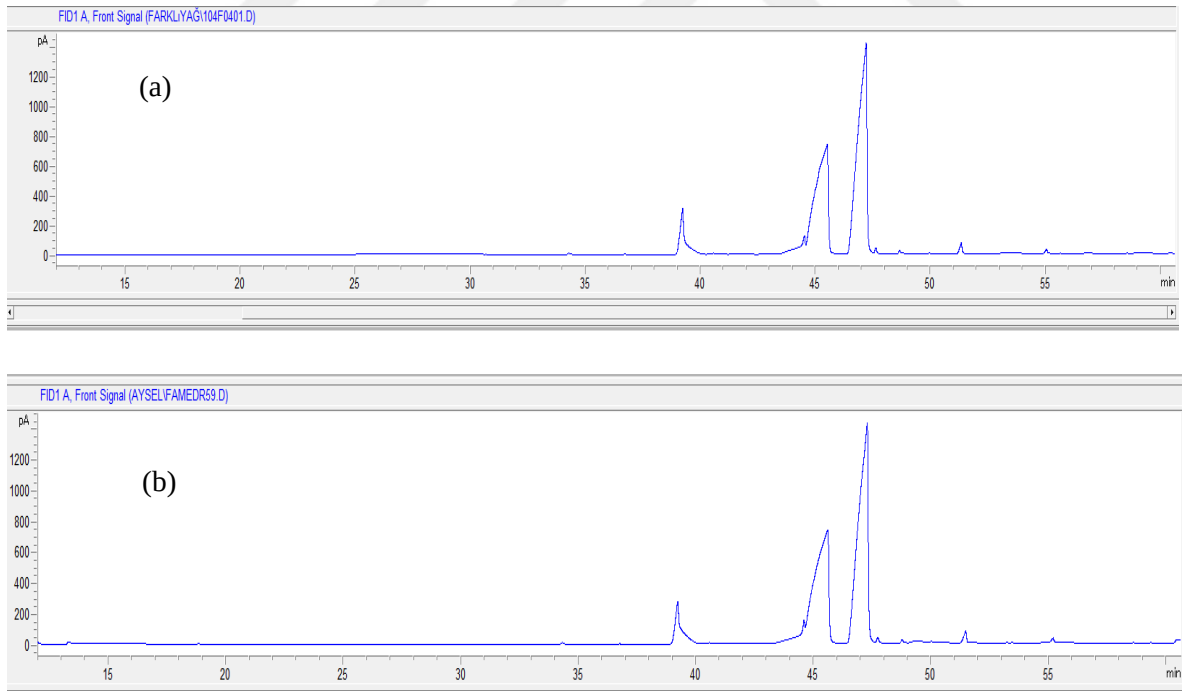
Tereyağının içeriğindeki yağ asitlerinin GC-FID ve SDME-GC-FID ile kantitatif analizinde FAME37 standart yağ asitlerinin alıkonma zamanlarına göre yağ asitleri belirlenmiş ve pik alanlarından alan normalizasyon yöntemi kullanılarak miktar tayinleri yapılmıştır. GC-FID ve SDME-GC-FID kromatogramları Şekil 4.31’de verilmiştir. Tereyağ, margarin, ayçiçek yağı ve zeytinyağı yağ asiti içerikleri sırasıyla Çizelge 4.12-16’de verilmiştir.



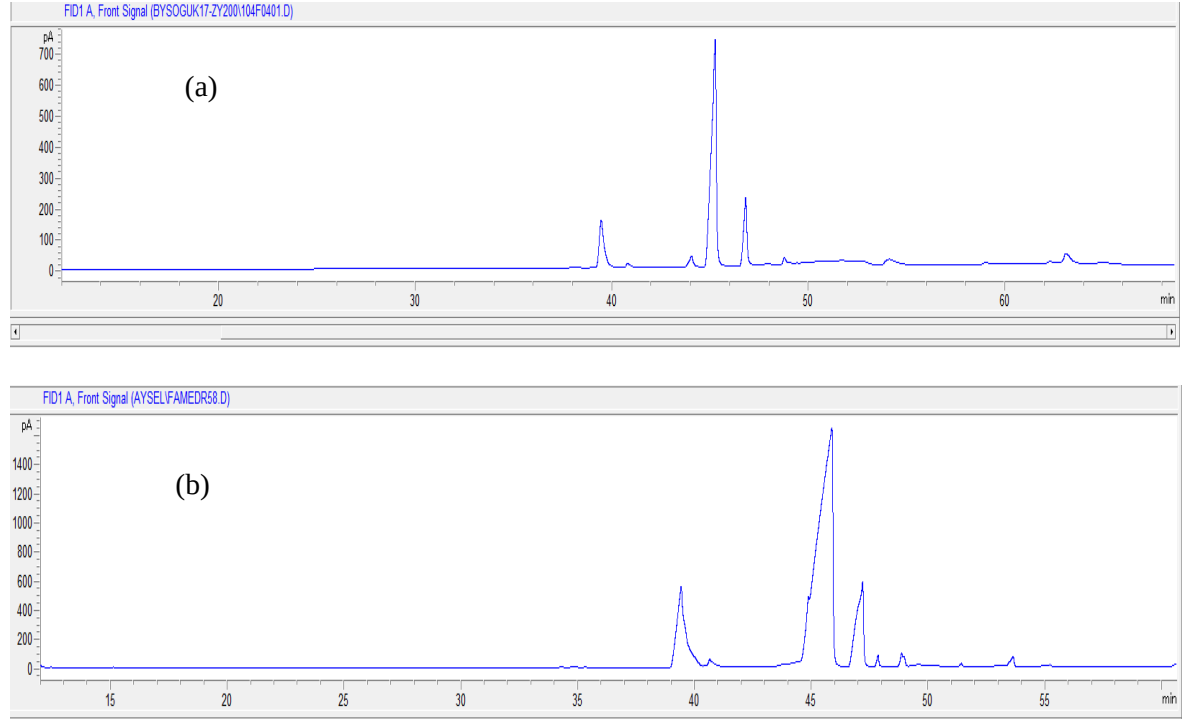
Şekil 4.30. Tereyağı yağ asiti metil esterlerinin a) GC-FID b) SDME- GC-FID kromatogramları



Şekil 4.31. Margarin yağ asiti metil esterlerinin a) GC-FID b) SDME- GC-FID kromatogramları



Şekil 4.32. Ayçiçek yağ asiti metil esterlerinin a) GC-FID b) SDME- GC-FID kromatogramları



Şekil 4.33. Zeytin yağ asiti metil esterlerinin a) GC-FID b) SDME- GC-FID kromatogramları

Çizelge 4.12. Tereyağı yağ asit miktarları

Yağ asitler (%, a/a)	C4:0	C6:0	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C18:1	C18:2
Numune								
Tereyağ1 SDME-GC-FID	2,75	2,50	1,41	3,01	10,26	25,03	11,93	1,81
Tereyağ2 SDME-GC-FID	3,92	3,30	1,73	2,75	8,80	23,76	10,57	0,46
Tereyağ3 SDME	2,28	2,22	1,28	2,55	9,12	27,34	16,49	7,00
Tereyağ4 SDME-GC-FID	3,19	2,55	1,35	2,75	9,70	26,92		6,70
Referans ^a	~1,84	~1,32	~ 0,86	~2,67	~8,87	~25,35	~18,17	~1,87

^a Tarım ve Orman Bakanlığı Gıda Kompozisyonu [115]

Çizelge 4.13. Margarin yağ asit miktarları

Yağ asitleri (%, a/a) Numune	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C22:0
Margarin SDME-GC-FID	5,5	2,5	28,9	9,5	30,4	10,9	0,5	1,0
Referans ^b	0,9-15,7	0,3-5,5	14,2-38,0	4,0-12,8	15,0-49,8	14,0-44,9	0,2-3,6	0,1-1,2

^bInternational Journal of Food Sciences and Nutrition[116]

Çizelge 4.14. Ayçiçek yağı yağ asit miktarları

Yağ asitleri (%, a/a) Numune	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2
Ayçiçek yağı1 SDME-GC-FID	6,0	4,0	36,0	49,0
Ayçiçek yağı2 SDME-GC-FID	1,0	-	16,0	19,0
Ayçiçek yağı3 SDME-GC-FID	6,0	-	11,0	21,0
Referans ^c	4,0-9,0	1,0-7,0	14,0-40,0	48,0-74,0

^c Sunflower oil, refined European Pharmacopoeia 7.0[117]

Çizelge 4.15. Zeytinyağı yağ asit miktarları

Yağ asitleri (%, a/a) Numune	C18:1	C18:2	C16:0	C18:3	C16:1	C18:0
Zeytin yağı1 SDME-GC-FID	13,0	1,0	2,0	69,0	12,0	1,0
Zeytin yağı2 SDME-GC-FID	12,0	1,0	2,0	69,0	12,0	1,0
Referans ^d	7,5-20,0	3,5	0,5-5,0	56,0-85,0	3,5-20,0	1,2

^d Olive oil, refined European Pharmacopoeia 7.0 [113]

SDME-GC-FID yönteminin tekrarlanabilirlik çalışmasında tereyağ numunesi kullanılmıştır. Tereyağ içeriğindeki yağ asitleri metil esterlerine dönüştürüldükten sonra, esterleştirilmiş bu numuneden dört farklı tek damla mikro ekstraksiyon yapılarak GC-FID ile yağ asitleri analiz edilmiştir. Analiz sonuçları Çizelge 4.16’da verilmiştir. SDME-GC-FID yöntemi ile tereyağ numunesinde yapılan analizlerde (n= 4) tekrarlanabilirliğin %32,1- 2,1 arasında değiştiği görülmüştür. Tekrarlanabilirliğin (%BSS) kısa zincirli yağ asitlerinde daha yüksek olması, kısa zincirli yağ asitlerinin uçuculuklarının uzun zincirli yağ asitlerine göre daha yüksek olması nedeniyle numune hazırlama aşamasında rastgele hataların daha fazla olduğu tahmin edilmektedir.

Çizelge 4.16. SDME-GC-FID yönteminin tekrarlanabilirlik çalışmaları

Yağ asitleri	% (a/a)	% (a/a)	% (a/a)	% (a/a)	%RSD
C4:0	2,7	3,3	3,9	3,6	15,2
C6:0	2,5	2,9	3,3	3,5	14,5
C10:0	2,7	3,0	3,0	3,6	12,3
C12:0	3,0	3,1	2,7	3,4	9,5
C14:0	10,3	10,0	9,0	10,0	5,8
C16:0	25,0	24,0	24,0	24,0	2,1
C18:1	12,0	15,0	11,0	11,0	15,4
C18:2	1,8	1,2	2,7	2,0	32,1

Yöntemin doğruluğu için standart GC-FID analiz sonuçları ile SDME-GC-FID sonuçları student-t testine göre karşılaştırılmış ve %95 güven aralığında ($p= 0,05$) fark anlamsız bulunmuştur (Çizelge 4.17).

Çizelge 4.17. SDME-GC-FID yönteminin doğruluk çalışması

Yağ asitleri	GC-FID % (a/a) $\pm$ ss* (n=3)	SDME-GC-FID % (a/a) $\pm$ ss* (n=3)	$t_{\text{hesap}} < t_{\text{tablo}}$
C4:0	1,65 $\pm$ 0,07	2,58 $\pm$ 0,60	2,30 < 2,78
C6:0	1,95 $\pm$ 0,21	2,24 $\pm$ 0,34	1,62 < 2,78
C10:0	1,45 $\pm$ 0,07	1,78 $\pm$ 0,28	1,57 < 2,78
C12:0	2,95 $\pm$ 0,21	2,99 $\pm$ 0,07	0,46 < 2,78
C14:0	10,20 $\pm$ 0,28	9,87 $\pm$ 0,45	0,11 < 2,78
C16:0	25,90 $\pm$ 0,14	24,23 $\pm$ 1,38	1,61 < 2,78
C18:1	12,05 $\pm$ 0,07	12,02 $\pm$ 0,04	0,70 < 2,78
C18:2	2,15 $\pm$ 0,35	1,80 $\pm$ 0,10	2,24 < 2,78

*ss: standart sapma



5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Besinlerde özellikle hayvansal yağlardaki doymuş yağ asitleri kandaki kolesterol miktarını artırıp kalp hastalıklarının oluşmasında etkiliyken zeytinyağı gibi bazı bitkisel yağların içeriklerindeki yağ asitlerinin türünün ve oranının kolesterolü düzenleyici yönde olumlu etkileri vardır.

Doymamış yağ asitleri, özellikle de C18:2, C18:3 ve türevleri esansiyel yağ asitleri olup vücut tarafından sentezlenemediği için dışardan ek besinlerle alınmaları ve kalp damar sağlığı açısından tüketilmesi gereken, çocuklarda zeka ve bedensel gelişimde oldukça etkili olan yağ asitleridir. Yüksek linoleik asit içeriğine sahip gıdalar kistik fibroz, diyabet ve dermatit gibi bazı hastalıklarda profilaktik ve tedavi edici etkiye sahip olup doğru miktarda ve doğru yağ tüketilmesi beslenme ve sağlık açısından önemlidir.

Bütirik asit gibi kısa zincirli yağ asitleri bağırsakta bakteriyel fermantasyonla üretilen organik asitlerdir. Bütirik asit sütte doğal olarak bulunurken, gıda maddeleri ve içecek endüstrisinde bütirik asitin birçok kullanım alanı bulunmaktadır. Bütirik asit, kolonik savunma bariyerinin çeşitli bileşenlerini takviye ederek ve oksidatif stresi azaltarak inflamasyon ve karsinogenez inhibisyonu gibi çeşitli kolonik mukozal fonksiyonlar üzerinde güçlü etki gösterir. Ayrıca ülseratif kolitin ve sindirim sisteminde görülen Crohn hastalığının tedavisinde de etkilidir.

Yağların yüksek sıcaklıklara maruz bırakılmaları trans yağ asidi oluşma olasılığını artırır. Yüksek sıcaklık, nem ve bakteriyel kontaminasyon sonucu yağlar lipaz enzimiyle kısmen hidroliz olurlar. Ayrıca bazı mantarlar varlığında da yağda bozulma gerçekleşip ketonlar, aldehitler, kısa zincirli yağ asitleri ile yağ alkollerini oluşur. Işık, sıcaklık, oksijen, nem ve bazı katalitik maddelerle doymamış yağ asitlerini içeren yağlar otooksidasyona uğrayıp içeriklerindeki yağ asitleri parçalanarak serbest radikaller oluşabilir. Yağın oksijenle temas ettiği yüzeyin genişliği ve metaller (Cu ve Fe) oksidasyon hızını artırır. Lipitlerin peroksidasyonu yani otooksidasyonu sırasında oluşan serbest radikaller sadece gıdaların bozunmasına yol açmaz aynı zamanda lezzet kalitesinde de kayıplara ve dokulara zarar vererek kanser, ateroskleroz, enflamatuar olaylar ve yaşlılığa neden olur. Bu bakımdan yağların oksidasyona uğrayıp uğramadığının belirlenmesi için içerdikleri yağ asitlerinin miktarının ve türünün gerek üretim aşamasındaki işlemler sonrasında gerekse depolama

koşullarında rutin olarak kontrol edilmesi önemlidir. Bu amaçla kullanılan analiz yöntemlerinin kolay, güvenilir ve duyarlı olması gerekir. Analiz sonuçlarına göre oksidasyona neden olan etmenlerin ortamdaki uzaklaştırılması, işleme ve saklama sürecinde olabildiğince oksijen ile temasın kesilmesi, yağların depolama koşullarının iyileştirilmesi ve antioksidan madde kullanılması gibi basit önlemlerle lipid oksidasyonu önlenabilir.

Yağ asitlerinin yapılarının kalitatif ve kantitatif olarak aydınlatılması, yağların özellikleri hakkında bilgi edinmemize de yardımcı olur. Bitkisel yağların yağ asidi alkil esterlerinin içeriği, bitki tohumunun durumuyla bağlantılıdır. Fermente edilmiş meyvelerden çıkarılan yağlar düşük kaliteli yağlardır. Bu yağların hoş olmayan kokuları nedeniyle ticari değeri düşüktür ve 100 °C'nin altındaki sıcaklıklarda kokudan arındırma sürecinden geçmeden tüketilmezler. Bu tür yağlar karıştırılarak piyasada satışa sunulabilmektedir. Yağların rafinerizasyonu sırasında özellikle de deodorizasyon, buhar distilasyonu aşaması sonrasında trans yağ asiti miktarlarında artış olup olmadığının belirlenmesi, kokudan arındırılmış yağ karışımı olarak markette bulundurulmalarının artışının engellenmesi için güvenilir analitik yöntemlerin geliştirilmesi önemlidir.

Tez çalışmamızda farklı bitkisel yağlar (zeytinyağı, ayçiçek yağı ve kekik yağı), tereyağ ve margarin yağ asitleri analiz edildi. Gaz kromatografi yağ asitlerinin belirlenmesinde çok yaygın kullanılan bir yöntem olup katı ve sıvı yağlarda polar yapıdaki yağ asitlerinin gaz kromatografi ile analizinde ilk olarak yağ asitleri uygun alkol ve katalizör varlığında uçucu yağ asiti esterlerine dönüştürüldü. Yağ asitlerinin metil esterlerini oluşturmak için birçok esterleştirme işleminin basitliği, uygulanabilirliği, esterleştirme etkinliğinin iyi olması ve kullanılan kimyasalların ulaşılabilir olmasından dolayı IUPAC yöntem 2,301'e göre KOH katalizörü ortamında metanolün kullanıldığı türevlendirilme yöntemi tercih edildi. Esterleştirilerek uçucu hale getirilen yağ asitlerinin saklama koşullarının ve süresinin belirlenmesi için esterleştirme sonrası, -20 °C'de 12 saat ve -20 °C'de 24 saat sonra GC-FID ile yapılan analiz sonuçları %BSS açısından karşılaştırıldı. Yağ asitleri metil esterlerin gün içi kararlılığı kısa zincirli yağ asitleri için %BSS 11,5–18,3 arasında iken uzun zincirli yağ asitleri için %RSD 2,1-4,5 arasında değişmektedir. Ulusal Gıda Kompozisyonu Veri Tabanına göre butirik asit ~1,84 kaproik asit ~1,32 dekanoik asit ~ 0,86 laurik asit ~2,67 miristik asit ~8,87 palmitik asit ~25,35 oleik asit ~18,17 linoleik asit ~1,87 belirtilen yağ asitleri aralıklarına bakıldığında gün içi kararlılık kabul edilebilir değerler arasında

olmakla birlikte çalışmalarınızın devamında hazırlanan yağ asiti metil esterleri -20 °C’de en fazla 12 saat boyunca kullanıldı.

Matriks ortamında yapılan analizlerde genellikle analitleri alma, zenginleştirme gibi ön işlem uygulanması gerekmektedir. Zaman alıcı, karmaşık ekstraksiyon adımları içeren, fazla miktarda örnek ve çözücü kullanımını gerektiren klasik ekstraksiyon yöntemlerin yerini organik çözücü tüketimini en aza indiren (μ l), çevre dostu, otomasyona imkân sağlayan, ekstraksiyon basamaklarını basitleştiren ve daha iyi zenginleştirme sağlayan mikroekstraksiyon yöntemleri almıştır.

Tez çalışmamızda bitkisel ve hayvansal yağlardaki yağ asitleri esterleştirildikten sonra sıvı faz mikroekstraksiyon tekniklerinden üst katman mikroekstraksiyon (HSME) ve tek damla mikroekstraksiyon (SDME) yöntemi ile önzenginleştirildi. Küçük örnek hacminin gaz kromatografi analizlerine uygun olması ve uzun karbon zincirli yağ asitlerinin alev iyonlaşma dedektörü ile yüksek hassasiyetle tayin edilmesi mikroekstraksiyon yöntemi sonrası yağ asitlerinin analizinde avantaj sağlamaktadır. Yağ asidi metil ester standartlarının yüksek maliyetli olması, toplam yağ asidi miktarı üzerinden tayin yapma zorunluluğu doğurmaktadır. Kromatogramdaki tüm piklerin alanları hesaplanıp, analit yüzdesi analit pikine ait alanın toplam pik alanlarına bölünmesiyle hesaplandığından numunedeki tüm analitlere ait piklerin tespit edilmesi gerekir. HSME ve SDME yöntemleri ile yapılan önzenginleştirme yöntemi düşük derişimdeki yağ asitlerinin tayinine imkân verdiğiinden toplam yağ asit miktarlarının duyarlı, güvenilir ve kolay uygulanabilir bir yöntem olarak belirlenmesinde doğrudan GC-FID analizine göre avantaj sağlamaktadır.

HSME-GC-FID yönteminde, gaz veya sıvı örnek içerisinde karışmayan ekstraksiyon çözücü damlası (1–10 μ l) enjektör ucunda asılı durur. Bu yöntemde organik çözücü, mikro enjektörün ucunda örnek çözeltisinden bağımsız tepe boşluğuna yerleştirilir. Örnek ısıtılarak analiz edilecek maddelerin buharlaşıp damlaya geçmesi sağlanır. Belirli bir zaman yapılan ekstraksiyon işlemi sonrasında maddeler sulu örnekten pasif difüzyon ile asılı damla içersine alınır ve analiz edilir. Bu yöntemle yağ asiti tayininde pik alanlarını etkileyen organik çözücü seçimi, sıcaklık, ekstraksiyon süresi, tuz etkisi etkisi gibi parameteler çalışılarak en uygun mikroekstraksiyon şartları belirlendi. Ekstraksiyon çözücüsü olarak sodyum dodesil sülfat: 1-bütanol (1:3, h/h), çözücü hacmi 2 μ l,

mikroekstraksiyon süresi 35 dak, NaCl miktarı 0,07 gram, numune miktarı 360 µl olarak belirlendi.

HSME-GC-FID yöntemi ile zeytinyağ numunesinde yapılan analizlerde linoleik asit miktarı üzerinden hesaplanan tekrarlanabilirlik (n=3) %BSS olarak 12,1 bulunmuştur.

HSME-GC-FID ile zeytinyağında yapılan yağ asiti analizleri sonuçları referans değerlerle karşılaştırıldığında yağ asiti miktarlarının referans değerler aralığında olduğu görülmüştür.

HP-5 Agilent Technologies (30 m x 0,25 µm ID x 0,20 µm) kolon kullanılarak hesaplanan kromatografik verilere göre ardarda iki pik için R_s değeri 1,5 ve üzeri olduğunda iki türün ayrılması sağlanırken bu değer daha küçük olduğunda pikler birbirinden ayrılmaz. Kolon ayırma gücünün 1,5'in üzerinde olması kolon ayırma gücünün uygun olduğunu göstermektedir. Ayrıca teorik plaka sayısı yaklaşık 10^6 olup kolon verimi oldukça iyidir

Çalışmamızda katı ve sıvı üzere iki farklı yapıdaki yağlarda SDME-GC-FID yöntemi ile de yağ asitleri miktar tayini yapılmıştır. Optimizasyon çalışmalarında IUPAC yöntem 2,301'e göre [9] türevlendirilen pastörize tereyağı yağ asiti metil esterleri kullanıldı ve optimum koşullarda SDME-GC-FID ile analiz edilmiştir.

SDME yönteminde ilk olarak uygun ekstraksiyon çözücüsü seçildi. Ekstraksiyon çözücüsü olarak yağ asiti metil esterlerinin bulunduğu heptan ortamında faz oluşturan ve su ile karışmayan çözücüler (CCl_4 , kloroform ve diklorometan) denenerek CCl_4 en uygun tek damla mikroekstraksiyon çözücüsü olarak seçildi. Ekstraksiyon etkinliğini etkileyen karıştırma hızı, sıcaklık, tuz etkisi için sodyum klorür derişimi, ekstraksiyon süresi ve ekstraksiyon çözücü miktarı parametrelerinin pik alanları üzerine etkisi incelenerek optimum koşullar belirlendi. Optimizasyon çalışmalarında her seferinde bir parametre değiştirilerek diğerinin sabit tutulduğu ardışık optimizasyon yaklaşımı kullanıldı. Kısa zincirli yağ asitlerinin uzun zincirli yağ asitlerine göre daha uçucu olması numune hazırlama aşamasında kayıpların olabileceği ve yağ asitlerinin % (a/a) derişimini etkileyeceği düşünülerek numune hazırlama işlemleri ağzı kapalı 10 ml'lik vial içerisinde yapıldı.

Geleneksel ekstraksiyon metodlarında ekstraksiyon verimini artırmak ve organik faz içerisindeki polar analitlerin bozunmadan kalmasını sağlamak için sulu örnek çözeltisine tuz eklenmesi kabul edilen bir yaklaşımdır. Sulu ortamda hazırlanmış örneklerle elektrolit ilavesiyle ortamın iyonik şiddeti arttığından polar analitlerin sudaki çözünürlüğü ve organik bileşiklerin sudaki çözünürlüğü azalır. Böylece organik faza geçen analit oranı ve buna bağlı olarak yöntemin ekstraksiyon verimliliği artar. Analitlerin sudaki çözünürlüğünün azalması, sulu ortamdaki iyonik tuz moleküllerinin tuz etkisi hidrasyon tabakasını sarmasıyla gerçekleşir. Ayrıca tuz molekülleri, polar moleküller ile elektrostatik etkileşime girerek analitlerin kütle transferinin azalmasına neden olabilir. Analitlerin çözünürlüğüne bağlı olarak, yüksek tuz derişimlerinde tuz etkisi etkisiyle ekstraksiyonun miktarı artabilir veya çözeltide dağılmış olarak bulunan yüklü tanecikler (elektrolitler ve analitler) arasındaki çekim kuvvetleri nedeniyle analitlerin ekstraksiyonu azalabilir. Örnek çözeltisine tuz eklenmesi genellikle ekstraksiyon verimliliğini artırır. Ancak yüksek derişimlerde tuz varlığı ekstraksiyon filminin fiziksel özelliklerini değiştirebileceğinden organik faz içine analitin difüzlenme oranının azalmasına da neden olabilir. Bu nedenle SDME verimine tuz (NaCl) derişiminin etkisi %0-25 (a/h) aralığında sodyum klorür çözeltileri ile denenmiştir. Mikroekstraksiyon işleminde ortama NaCl eklenmediğinde alt faz bulanık olup damla görülemediğinden analiz gerçekleştirilememiştir. En yüksek pik alanının elde edildiği %10 NaCl (a/h) derişimi optimum NaCl derişimi olarak seçilmiştir (Şekil 4.18). Sıvı faz mikroekstraksiyon tekniklerinde karıştırma, sulu faz ile ekstraksiyon çözücüsü arasındaki transferi arttırmada etkili bir yoldur. Örneği karıştırma, analitin organik faza olan dağılımını artırarak örnek çözeltisi ile damla arasındaki denge için gerekli zamanın azalmasını sağlar. Diğer yandan çok yüksek karıştırma hızı organik damlanın dağılmasına ve bozulmasına sebep olacağı için ekstraksiyon veriminde azalmaya neden olabilir. Bu amaçla uygun bir karıştırma hızı seçimi önemlidir. Karıştırma hızının optimizasyonunda 0-1250 rpm aralığında karıştırma hızları denenmiş ve optimum karıştırma hızı olarak en yüksek pik alanlarının elde edildiği 1000 rpm karıştırma hızı olarak belirlenmiştir (Şekil 4.20). Mikroekstraksiyonun yapıldığı sıcaklık ekstraksiyon verimini etkileyen önemli parametrelerden biridir. Mikroekstraksiyon verimine sıcaklığın etkisi 25-50 °C aralığında denenmiş ve sıcaklık arttıkça ekstraksiyon veriminde azalma gözlemlendiğinden en yüksek pik alanının elde edildiği oda sıcaklığı (25 °C) optimum koşul olarak belirlenmiştir (Şekil 4.20). Mikroekstraksiyon süresinin ekstraksiyon verimine etkisi 10-40 dak aralığında ekstraksiyon sürelerinde yapılmış ve 20 dak optimum ekstraksiyon süresi olarak seçilmiştir (Şekil 4.24). Ekstraksiyon çözücü hacminin pik alanlarına etkisi

10-50 µl aralığında CCl₄ kullanılarak denenmiş ve 20 µl CCl₄ optimum ekstraksiyon hacmi olarak belirlenmiştir (Şekil 2.26).

SDME-GC-FID yöntemi ile tereyağ numunesinde yapılan analizlerde (n= 4) tekrarlanabilirlik %RSD cinsinden %2,1-32,1 aralığında bulunmuştur. SDME yönteminin doğruluk çalışmasında türevlendirilmiş numune üzerine miristik asit metil ester standardı ilavesinden sonra optimum şartlarda mikroekstraksiyon sonrası yapılan analiz sonucu alıkonma zamanları ve pik alanları karşılaştırılmış ve geri kazanım %95-105 olarak hesaplanmıştır. Esterleştirilmiş margarin numunesi üzerine margarin içeriğinde bulunmayan tridekanoik asit metil ester standardı eklenip SDME-GC-FID ile optimum koşullarda analiz edildiğinde tridekanoik asit metil ester ($t_R = 32,40$ min) piki gözlenmiş ve böylece tridekanoik asit metil esterinin mikro damlaya ekstre edildiği görülmüştür.

Numunelerin SDME-GC-FID analizi sonrası yağ asitleri miktarları, yağ asitlerinin tayininde standart yöntem olarak kullanılan GC-FID analiz sonuçları student t-testine göre karşılaştırılmış ve %95 güven aralığında ($p = 0.05$) fark anlamsız bulunmuştur (Çizelge 4.17). Ayrıca SDME-GC-FID ile optimum koşullarda 4 farklı tereyağının ve iki farklı zeytin yağının analiz sonuçlarının Türk Gıda Kodeksi ile uyumlu olduğu görülmüştür.

GC-FID duyarlılığı karbon sayısına bağlı olduğundan kısa zincirli yağ asitleri metil esterlerinde duyarlık uzun zincirli yağ asitleri metil esterlerinden daha düşüktür. SDME yöntemiyle yapılan önzenginleştirme ile pik alanlarında artış gözlenmiş, bu artış GC-FID aynı numuneden aynı kromatografik şartlarda yapılan kromatogram pik alanları ile karşılaştırıldığında zenginleştirme faktörü yaklaşık 4 kat olarak hesaplanmıştır.

SDME-GC-FID ile Rt-2560 kolon kullanılarak alınan kromatogramlara ait piklerden hesaplanan verilere göre teorik plaka sayısı yaklaşık 10^6 olup kolon verimi oldukça iyidir. Kolon ayırma gücünün 1,5'in üzerinde olması kolon ayırma gücünün uygun olduğunu göstermektedir.

SDME-GC-FID yöntemi, katı ve sıvı yağlardaki yağ asitlerinin analizinde kolay numune hazırlama, düşük kimyasal tüketimi, çevre dostu, güvenilir ve tekrarlanabilir bir yöntem olarak kullanılabilir.

Sonuç olarak, yağ asitlerinin karboksilik asit grupları esterleşme reaksiyonu ile kolaylıkla uçucu hale getirilerek gaz kromatografi ile analiz edilebilirken, alifatik karbon zincirli yapıları FID dedektör ile duyarlı analiz imkânı sağlar. SDME ve HSME yöntemleri ise katı ve sıvı yağlardaki yağ asitlerinin tayininde hızlı, duyarlı, tekrarlanabilir ve az çözücü kullanımı nedeniyle çevre dostu bir analiz yöntemidir. Önerilen yöntem kolay numune hazırlamaya imkân verdiği ve tekrarlanabilir sonuçlar elde edildiği için farklı tip yağların rutin analizinde başarıyla kullanılabilir.





KAYNAKLAR

1. Bloukas, J.G., E.D. Paneras, and G.C. Fournitzis. (1997) Effect of replacing pork backfat with olive oil on processing and quality characteristics of fermented sausages. *Meat Science*. 45(2): 133.
2. Giese, J. (1996) Fats, oils, and fat replacers. *Food Technology*. 50(4): 78.
3. M.H., J., 1993 *Animal Feding and Nutrition*. Vol. Seventh Ed. Hunt Publishing Company. 17.
4. Haupt, W.F. and W. Stoffel. (2004) Nerve conduction velocity measurements reveal the functional deficit in ceramide galactosyl transferase-deficient (cgt-/-) mice. *Journal of the Neurological Sciences*. 217(1): 83.
5. Ruiz-Rodriguez, A., G. Reglero, and E. Ibanez. (2010) Recent trends in the advanced analysis of bioactive fatty acids. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 51(2): 305.
6. Christie, W.W. (1989) *Gas Chromatography and Lipids*, Oil Press, Alloway, Scotland, . 64.
7. Shantha, N.C. and G.E. Napolitano. (1992) Gas-Chromatography of Fatty-Acids. *Journal of Chromatography*. 624(1-2): 37.
8. W.W.Christie, i.W.W.C.E. (1989) *Gas Chromatography and Lipids*, Oil Press,. Alloway Scotland: 64.
9. IUPAC, 1991 *International Union of Pure and Applied Chemistry, Commission on Oils, Fats and Derivatives*. . Pure and Appl. Chem. Vol. 63:1173
10. Abdulkarim, S.M., et al. (2005) Some physico-chemical properties of Moringa oleifera seed oil extracted using solvent and aqueous enzymatic methods. *Food Chemistry*. 93(2): 253.
11. İnternet: *Doymuş Yağ Asitleri*. [cited; Available from: web: https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/66527/mod_resource/content/0/3.Hafta.pdf. 12.05.2020 tarihinde alınmıştır.
12. MEB, 2011 *Gıda Teknolojisi Lipitler*. Ankara. 42-47.
13. İnternet: Kayahan, M. *Yağ Tüketimi ve Sağlık*. [cited; Available from: web: http://www.gidamo.org.tr/resimler/ekler/3967a0e938dc2a6_ek.pdf?dergi=12. 12.05.2020 tarihinde alınmıştır.
14. Sözbilir, N.B. and N. Bayşu, 2008 *Biyokimya*. Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri. 136.
15. Pathania, P., et al. (2020) A novel approach to detect highly manipulated fat adulterant as Reichert-Meissl value-adjuster in ghee (clarified butter) through signature peaks by gas chromatography of triglycerides. *Journal of Food Science and Technology-Mysore*. 57(1): 191.

16. Şenel, E., 2014 *Tereyağı Teknolojisi*. Ankara: Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Süt Teknolojisi Bölümü 1-10.
17. M.H., J., (1993) *Animal Feding and Nutrition*. Kendall/Hunt Publishing Company. .
18. Türkoğlu, H. (2014) Nizip ve Çevresinde Satışa Sunulan Zeytinyağı Örneklerinin Bazı Özellikleri. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, (16): 1.
19. İnternet: Kıvrak, M. *Zeytincilik ve Zeytin İşleme Teknolojisi Programı* Balıkesir Üniversitesi Edremit Meslek Yüksekokulu [cited; Available from: web: http://mucahitkivrak.baun.edu.tr/index_dosyalar/zeytinyagi%20uretim%20teknolojisi%201%20temel.pdf.12.05.2020 tarihinde alınmıştır.
20. Campbell KA, V.-M.G., Glatz CE, Pontalier P-Y. (2016) Parameters affecting enzyme-assisted aqueous extraction of extruded sunflower meal. *Food Chemistry*. 208-245.
21. Rombaut N, S.R., Thomasset B, Bélliard T, Castello J, Van Hecke É, Lanoisellé J-L. (2014) Grape seed oil extraction: Interest of supercritical fluid extraction and gas-assisted mechanical extraction for enhancing polyphenol co-extraction in oil. *Comptes Rendus Chimie*: 17: 284.
22. Da Porto C, P.E., Decorti D. (2013) Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. *Ultrason Sonochem*: 20: 1076.
23. Azmir J, Z.I., Rahman MM, Sharif KM, Mohamed A, Sahena F, Jahurul MHA, Ghafoor K, Norulaini NAN, Omar AKM. (2013) Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials. *Journal of Food Engineering*. 117: 426-436.
24. Bai X, N.F., Ye L, Lant P, Pratt S. . (2014) Enhanced lipid extraction from Algae using free nitrous acid pretreatment. *Bioresource Technology*.
25. Sevindik, O. and S. Selli. (2017) Üzüm Çekirdek Yağı Eldesinde Kullanılan Ekstraksiyon Yöntemleri *Gıda*. 42(1): 95-103.
26. Soxhlet, F., *Die gewichtsanalytische Bestimmung des Milchfettes*. Dingler's Polytechnisches Journal 461-465.
27. *T.C.Resmi Gazete 9 Mart 2004 25397*.
28. Rosental, I. (1991) Milk and dairy products. VCH.
29. Mahugo-Santana, C., et al. (2011) Application of new approaches to liquid-phase microextraction for the determination of emerging pollutants. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*. 30(5): 731.
30. Vidal L, C.A., Canals A, Salvador A. (2010) Ionic Liquid-based Singledrop Microextraction Followed by Liquid Chromatography-ultraviolet Spectrophotometry Detection to Determine Typical UV Filters in Surface Water Samples. *Talanta*: 81: 549.

31. Saldamlı. (1998) Kimyası Hacettepe Üniversitesi Yayınları. Ankara.
32. Temiz, H. Süt lipidlerinin bazı özellikleri *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Samsun*.
33. İntenet: Fidancı. *Yağ Asitleri*. [cited; Available from: web: <http://veterinary.ankara.edu.tr/~fidanci>. 12.05.2020 tarihinde alınmıştır.
34. M., D. ((2006)) Gıda Kimyası. *Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü*.
35. M., K. (2005) Yağ kimyası. *TMMOB Gıda Mühendisleri Odası kitaplar serisi: 18*.
36. Oysun, G. and (1987) Süt Kimyası ve Biyokimyası. *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Yayınları*, (No: 18).
37. Nas, S., H.s.Y. Gökalp, and M. Ünsal, 2001 *Bitkisel Yağ Teknolojisi*. Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Ders Kitapları Denizli : Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Fakültesi. 101-500.
38. Taşan M., D.O. (2005) Trans yağ asitlerinin yapısı, oluşumu ve gıdalarla alınması. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi 2. 2(1)*.
39. Metin, M., 1996 *Süt Teknolojisi sütün bileşimi ve İşlenmesi*. E.Ü. Mühendislik Fakültesi Yayınları No:33.
40. T., N.K.v.Y. (2005) Conjugated Fatty Acids in Food and Their Health Benefits. *Bioscience and Bioengineering no:2. 100*.
41. Y.S. Huang, i.C.T.H., J.F. Shaw. (2007) Biocatalysis and Biotechnology for Functional Foods and Industrial Products. *CH Press, Boca Raton, FL, USA*, (pp.11-21).
42. Nas S., G.H., Ünsal M. (2001) Bitkisel Yağ Teknolojisi. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Ders Kitapları Yayın No: 005*.
43. Wahle, K.W., S.D. Heys, and D. Rotondo. (2004) Conjugated linoleic acids: are they beneficial or detrimental to health? *Progress in Lipid Research*. 43(6): 553.
44. Sampath, H. and J.M. Ntambi. (2005) Polyunsaturated fatty acid regulation of genes of lipid metabolism. *Annual Review of Nutrition*. 25: 317.
45. Bingöl, G. (2014) Lipidler. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları*. 41:16.
46. Holub, B.J. (2002) Clinical nutrition: 4. Omega-3 fatty acids in cardiovascular care. *Canadian Medical Association Journal*. 166(5): 608.
47. Zatsick NM, M.P. (2007) Fish Oil: Getting to the Heart of It. . *The Journal for Nurse Practitioners*., 3 (2): 104-109.
48. Simopoulos, A.P. (1999) Essential fatty acids in health and chronic disease. *American Journal of Clinical Nutrition*. 70(3): 560.

49. T, Z., F. N., and H. R. (2001) Food Australia. *Food Australia*. 53(9): 379.
50. Gropper S. , S.L., Groff L. . (2005) Advanced Nutrition and Human Metabolism.
51. İşleroğlu H, Y.Z.Y.M. (2005) Fonksiyonel bir gıda olarak keten tohumu. *GOÜ Ziraat Fakültesi Dergisi* 22: 2.
52. Kara, O.O., *Konjuge Linoleik Asit Metabolizması ve Sağlık Üzerine Etkileri*, Yüksek Lisans Tezi. 2009, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ
53. Gıda Kodeksi Yemeklik Zeytinyağı ve Yemeklik Prina Yağı Tebliğinde Değişiklik Yapılması Hakkında Tebliğ. Tebliğ No: 98 / 7. Resmi Gazete 1 Aralık 2000 - Sayı: 24247.
54. C. Beerman, J.J., T.Reinecker, A. Hauenschild, G. Boehm, H.U. Klör, short term effect of dietary medium-chain fatty acids and n-3 long chain polyunsaturated fatty acids on the fat metabolism of healthy volunteers (2003). *Lipids in Health and Disease*. 2(1):10
55. Lorenzo JM, P.M., Fontán MCG, Carballo J. . (2014) Effect of fat content on physical, microbial, lipid and protein changes during chill storage of foal liver pâté. *Food Chemistry*. 155: 57-63.
56. K.Lobb, C.K.C., in: C.K. Chow(Ed), . (2000) Fatty and their Health implications,. *Marcel Dekker, New York*: 241.
57. S.F. O'Keefe, i.C.C.A., D.B. Min(Eds). (1998) Food Lipids: Chemisty, Nutrition, and Biotechnology. *Marcel Dekker, New York*,. 1.
58. Larque, E., S. Zamora, and A. Gil. (2001) Dietary trans fatty acids in early life: a review. *Early Human Development*. 65: 31-41.
59. Braithwaite, A., and Smith, J.F. (1999) Chromarographic methods. *Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherland*
60. Skoog, A.D., Holler, J. F., and Nieman, A. T. (1998) Principles of Instrumental Analysis. *Harcourt Brace & Company, USA*.
61. T.C. Resmi Gazete 9 Mart (2004) 25397.
62. Skoog, A.D., West, M. D., Holler, J. F., and Crouch, R. S., 1999 *Fundamentals of Analytical Chemistry II*. Thomson Brooks Cole, USA. Smith, M. R., 2004: Understanding
63. Orbey, M.T., et al., 2012 *Analitik Kimya Praktikerleri* ed. G.Ü.E.F.A.K.A. Dalı. Ankara: Eczacılık Fakültesi Yayınları 10-167.
64. İnternet: Beşergil, B. *Gaz Sıvı Kromatografisi*. [cited; Available from: web: http://bilsenbesergil.blogspot.com/p/blog-page_558.html. 12.05.2020 tarihinde alınmıştır.

65. Kitson, A. and L. Currie. (1996) Clinical practice development and research activities in four district health authorities. *Journal of Clinical Nursing*. 5(1): 41.
66. D.A.Skoog, D.M.W. (1981) *Principles of Instrumental Analysis*. United States of America. 7: 696-768
67. Taniya Roy chowdhury, R.P.D. (2012) Standardizing methylation method during phospholipid fatty acid analysis to profile soil microbial communities. 88(2): 285.
68. W.W. Christie, i.A.i.L.M.T., pp. 69-111 [1993] [Ed. W.W. Christie, Oily Press, Dundee]. (1993) in *Advances in Lipid Methodology*. [Ed. W.W. Christie, Oily Press, Dundee] Two.
69. Zanjani, M.R.K., et al. (2007) A new liquid-phase microextraction method based on solidification of floating organic drop. *Analytica Chimica Acta*. 585(2): 286.
70. Li Xu, C.B., Hian Kee Lee. (2007) Developments in single-drop microextraction. *Chromatography A* 1152(1-2): 184.
71. Rezaee, M., et al. (2006) Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal of Chromatography A*. 1116(1-2): 1.
72. Jain, A. and K.K. Verma. (2011) Recent advances in applications of single-drop microextraction: a review. *Analytica Chimica Acta*. 706(1): 37.
73. Us, M.F. (2012). *Sıvı Faz Mikroekstraksiyon Tekniği İle Bazı Beta-2 Agonistlerin Sığır İdrarında Kapiler Elektroforez ve Gaz Kromatografi Kütle Spektrometrisi Yöntemleri ile Tayini*, Doktora tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Ankara.
74. He, Y., A. Vargas, and Y.J. Kang. (2007) Headspace liquid-phase microextraction of methamphetamine and amphetamine in urine by an aqueous drop. *Analytica Chimica Acta*. 589(2): 225.
75. Yazdi, A.S., F. Mofazzeli, and Z. Es'haghi. (2009) Determination of 3-nitroaniline in water samples by directly suspended droplet three-phase liquid-phase microextraction using 18-crown-6 ether and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1216(26): 5086-5091.
76. Liu, W. and H.K. Lee. (2000) Continuous-flow microextraction exceeding 1000-fold concentration of dilute analytes. *Analytical Chemistry*. 72(18): 4462.
77. Vidal, L., et al. (2010) Ionic liquid-based single-drop microextraction followed by liquid chromatography-ultraviolet spectrophotometry detection to determine typical UV filters in surface water samples. *Talanta*. 81(1-2): 549.
78. Dadfarnia, S. and A.M. Haji Shabani. (2010) Recent development in liquid phase microextraction for determination of trace level concentration of metals--a review. *Analytica Chimica Acta*. 658(2): 107.

79. Leong, M.I. and S.D. Huang. (2009) Dispersive liquid-liquid microextraction method based on solidification of floating organic drop for extraction of organochlorine pesticides in water samples. *Journal of Chromatography A*. 1216(45): 7645.
80. Rezaee, M., Y. Yamini, and M. Faraji. (2010) Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method. *Journal of Chromatography A*. 1217(16): 2342.
81. Chen, H., et al. (2009) Dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography as an efficient and sensitive technique for simultaneous determination of chloramphenicol and thiamphenicol in honey. *Analytica Chimica Acta*. 632(1): 80.
82. Alver E, D.A., Özcimder M. (2012) Microextraction Methods. *Engineering and Natural*.
83. Dadfarnia, S. and A.M.H. Shabani. (2010) Recent development in liquid phase microextraction for determination of trace level concentration of metals-A review. *Analytica Chimica Acta*. 658(2): 107.
84. Barahona, F., et al. (2010) Hollow fiber-liquid-phase microextraction of fungicides from orange juices. *Journal of Chromatography A*. 1217(13): 1989.
85. Asensio-Ramos, M., et al. (2011) Liquid phase microextraction applications in food analysis. *Journal of Chromatography A*. 1218(42): 7415.
86. He, Y. and H.K. Lee. (1997) Liquid phase microextraction in a single drop of organic solvent by using a conventional microsyringe. *Analytical Chemistry*. 69(22): 4634.
87. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen. (2008) Liquid-phase microextraction with porous hollow fibers, a miniaturized and highly flexible format for liquid-liquid extraction. *Journal of Chromatography A*. 1184(1-2): 132.
88. Lu, Y.C., et al. (2006) Directly suspended droplet microextraction. *Analytica Chimica Acta*. 566(2): 259.
89. Poole, C.F. (2008) Editorial on "Liquid-phase microextraction with porous hollow fibers, a miniaturized and highly flexible format for liquid-liquid extraction" by S. Pedersen-Bjergaard and K.E. Rasmussen. *Journal of Chromatography A*. 1184(1-2): 131.
90. Selvakumar, D. and S. Vijaya. (2015) Solid phase extraction of Ayurvedic lipid based formulation, ghrithas and analysis of its contents by high performance thin layer chromatography and gas chromatography - mass spectrometry. *Indian Journal of Traditional Knowledge*. 14(3): 365.
91. Ecker, J., et al. (2012) A rapid GC-MS method for quantification of positional and geometric isomers of fatty acid methyl esters. *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies Biomedical Life Sciences*. 897: 98.

92. Kim, H., et al. (2019) Method development for the quantitative determination of short chain fatty acids in microbial samples by solid phase extraction and gas chromatography with flame ionization detection. *Journal of Analytical Science and Technology*. 10(1).
93. Bicalho, B., et al. (2008) Creating a fatty acid methyl ester database for lipid profiling in a single drop of human blood using high resolution capillary gas chromatography and mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1211(1-2): 120.
94. Taniya Roy Chowdhury, R.P.D. (2012) Standardizing methylation method during phospholipid fatty acid analysis to profile soil microbial communities. *Microbiological Methods* 88(2): 285.
95. Bai, Y.N., S.P. Wang, and X.H. Bai. (2017) Determination of Fatty Acids in Zanthoxyl Semen Based on Solidification of Floating Organic Drop Liquid Phase Microextraction with Gas Chromatography. *Chromatographia*. 80(12): 1813.
96. Wejnerowska, G. (2017) Development of a Single-Drop Microextraction with Derivatization Procedure for Analysis of Volatile Fatty Acids in Water Samples. *Chromatographia*. 80(7): 1115.
97. Chen Y, L.Y., Xiong Y, Fang C, Wang X. (2014) An effective pre-treatment method for the determination of short-chain fatty acids in a complex matrix by derivatization coupled with headspace single-drop microextraction. *Journal of Chromatographia A*. 1325(17): 4955.
98. John A.G. Roacha, M.M.M., M. Peter Yurawecza, John K.G. Kramer. (2002) Chromatographic separation and identification of conjugated linoleic acid isomers. *Analytica Chimica Acta*, 465: 207-226.
99. Brondz, I. (2002) Development of fatty acid analysis by high-performance liquid chromatography, gas chromatography, and related techniques. *Analytica Chimica Acta*. 465(1-2): 1.
100. Eras, J., et al. (1999) Propanolysis of esters using chlorotrimethylsilane. *Synthetic Communications*. 29(7): 1129.
101. Challinor, J.M. (1989) A Pyrolysis Derivatization Gas-Chromatography Technique for the Structural Elucidation of Some Synthetic-Polymers. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*. 16(4): 323.
102. Soria, A.C., M.J. Garcia-Sarrio, and M.L. Sanz. (2015) Volatile sampling by headspace techniques. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*. 71: 85.
103. Ostermann, A.I., et al. (2014) Determining the fatty acid composition in plasma and tissues as fatty acid methyl esters using gas chromatography - a comparison of different derivatization and extraction procedures. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 91(6): 235.

104. Kandar, R., et al. (2016) Determination of selected fatty acids in dried sweat spot using gas chromatography with flame ionization detection. *Journal of Separation Science*. 39(22): 4377.
105. Micalizzi, G., et al. (2020) Rapid and miniaturized qualitative and quantitative gas chromatography profiling of human blood total fatty acids. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*.
106. Plutowska, B. and W. Wardencki. (2008) Determination of volatile fatty acid ethyl esters in raw spirits using solid phase microextraction and gas chromatography. *Analytica Chimica Acta*. 613(1): 64.
107. Siang, G.H., et al. (2010) Hollow fiber liquid-phase microextraction coupled with gas chromatography-flame ionization detection for the profiling of fatty acids in vegetable oils. *Journal of Chromatography A*. 1217(52): 8073.
108. Kurumu, T.İ.T.C. (2017) *Türk Farmakopesi-II*, (1098).
109. E.M. Antolín, D.M.D., V.G. Canavaciolo, (2008) A validated stability-indicating HPLC method for the determination of dexamethasone coated drug-eluting stents. 4 *Pharmaceutical and biomedical Analysis*. 46:194-199
110. W. Stoffel, F.C., E.H. Ahrens. (1959) *Analytical Chemistry* 31: 307.
111. European Pharmacopoeia Commission. (2014). *European Pharmacopoeia 7.0*. Strasbourg: Council of Europe, . 1748-1756.
112. Ozen, H.C. and M. Bashan. (2003) The composition of fatty acids in *Hypericum scabrum*, *H-scabroides* and *H-amblysepalum*. *Turkish Journal of Chemistry*. 27(6): 723.
113. European Pharmacopoeia Commission. (2009) *European Pharmacopoeia 7.0*. Strasbourg: Council of Europe. 2612-2613.
114. Holler, S.W., (1999) *Fundamentals of Analytical Chemistry*, Saunders College Publishing USA. 450-510
115. İnternet: *Ulusal Gıda Kompozisyonu Veri Tabanı*. [cited; Available from: web: <http://www.turkomp.gov.tr/foodanalysisresult-tereyagi-kahvaltilik-pastorize-sut-2.05.2020> tarihinde alınmıştır.
116. Triantafillou, D., V. Zografos, and H. Katsikas. (2003) Fatty acid content of margarines in the Greek market (including trans-fatty acids): a contribution to improving consumers' information. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 54(2): 135.
117. European Pharmacopoeia 7.0. (2009)

ÖZGEÇMİŞ**Kişisel Bilgiler**

Soyadı, adı : EKİCİ, Aslıhan
Uyruğu : T.C.

Eğitim

	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Derecesi	Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Ana Bilim Dalı	2005- devam ediyor
	Erciyes Üniversitesi Organik Kimya Ana Bilim Dalı	2004
Yüksek Lisans	Erciyes Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi	2000
	Yıldızeli Lisesi	1996

Lisans

Lise

İş Deneyimi

2002-devam ediyor

Yer

Kayseri Fatma Yükselbaşbuğ A.İ.L.

Görev

Öğretmen

Yıl**Yabancı Dil**

İngilizce



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..

