



T.C.
GÜMÜŞHANE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**DOĞAL KAYNAKLARDAN ERUSİK ASİT METİL ESTERİNİN ANALİTİK
STANDART OLARAK ÜRETİMİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Yağmur KARABAŞ

MAYIS 2021
GÜMÜŞHANE

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

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**DOĞAL KAYNAKLARDAN ERUSİK ASİT METİL ESTERİNİN ANALİTİK
STANDART OLARAK ÜRETİMİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Yağmur KARABAŞ

**Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
“Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı”
Yüksek Lisans Programında Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 07.05.2021
Tezin Sözlü Savunma Tarihi: 18.05.2021**

MAYIS 2021

Bu alışma Gümüşhane Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi (GBAP) projeleri tarafından desteklenmiştir.

Proje no: 16.F5115.04.01 ve 16.F5115.04.02

TEZ BEYANNAMESİ

Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda tezin yazımına ait kurallara uygun olarak hazırladığım “**Doğal Kaynaklardan Erusik Asit Metil Esterinin Analitik Standart Olarak Üretilmesi**” isimli yüksek lisans tezi çalışmasında; söz konusu tüm bilgi ve belgeleri genel akademik kurallara göre elde ettiğimi, görsel ve yazılı bütün bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak hazırlayıp sunduğumu, başka kaynaklardan yararlandığım bilgileri metin ve kaynaklarda eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma süresince bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksi durumda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

15/05/2021

Yağmur KARABAŞ

ÖZET
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DOĞAL KAYNAKLARDAN ERUSİK ASİT METİL ESTERİNİN ANALİTİK
STANDART OLARAK ÜRETİMİ**

Yağmur KARABAŞ

Gümüşhane Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç.Dr. Cemalettin BALTACI

2021, 62 sayfa

Erusik asit 22 karbonlu, dallanmamış, omega 9 pozisyonunda tek bir çift bağ içeren tekli doymamış bir yağ asididir. Erusik asit kolza, hardal ve şebboy tohumlarının toplam yağ içeriğinin % 30-60' nı, latin çiçeği tohumunun toplam yağ içeriğinin % 80' e kadarını oluşturur. Erusik asit aynı zamanda somon ve ringa balığı gibi bazı deniz hayvanlarında da bulunmaktadır.

Erusik asit oranının gıdalarda yüksek olması bazı sağlık riskleri ortaya çıkardığı düşünülmektedir. Food and Drug Administration (FDA)' da gıdalarda bulunabilecek erusik asit miktarlarıyla ilgili bazı düzenlemeler yapılmış olup özellikle kanola ve kolza yağlarındaki erusik asit oranıyla ilgili bir takım kısıtlamalar getirilmiştir.

Ayrıca ülkemizde, Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği' nde Katı ve sıvı yağlar maksimum % 5, % 5 den fazla yağ ilave edilen gıda maddeleri % 5 ve diğer gıda maddeleri (bulunması muhtemel riskli gıdalar) % 10 olarak verilmiştir. Türk Gıda Kodeksi bebek formüllü gıdalarda en fazla % 1 olarak MRL (Maksimum Rezidü Limiti) verilmiştir. Ayrıca Türk Gıda Kodeksi Belirli Gıdalarda Erusik Asit Seviyesinin Resmi Kontrolü İçin Numune Alma Ve Analiz Metodu Kriterleri Tebliği (Tebliğ No: 2016/4) yayınlanmıştır.

Bu nedenle erusik asit varlığı denetim, ithalat ve ihracat gıda numunelerinde analizlerinin yapılması zorunlu hale gelmiştir. Erusik asidin GC-MS/ FID analizleri yapmak için erusik asidin metil esteri standardı gereklidir. Analitik standart kromatografik cihazların kalibrasyonu amacıyla kullanılır ve yüksek saflıktadır. Referans malzemeler, farklı laboratuvarlar arasında, zaman içerisinde analitik yöntemlerin doğrulanmasında ve sonuçların doğruluğunun ve karşılaştırılabilirliğinin değerlendirilmesinde önemli role sahiptir. Ülkemizde bu analitik standart bulunmamaktadır ve ithal edilmektedir. Bu nedenle yaptığımız çalışma da Erusik asit metil esteri standardının doğal kaynaklardan elde edilmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçla numunelerden alınan yağların esterleştirme çalışması yapılmıştır. İlk olarak erusik asit miktarını arttırmak amacıyla kristalizasyon işlemi yapılmıştır. Kristalizasyon işlemi en yüksek erusik asit miktarını elde edene kadar tekrarlanmıştır. Oluşan metil esterlerini ayırma hunisi ile likit-likit ekstraksiyon ve kromatografik yöntemler kullanılarak saf halde erusik asit metil esteri elde edilmiştir. Bu şekilde erusik asidin (C22:1); % 2.33, % 4.86, % 6.87, % 8.28, % 10.91, % 12.06, % 17.29, % 22.12, % 29.35, % 34.15, % 38.76, % 43.48, % 51.63 ve % 55.66 standardı üretilmiştir.

Sonuç olarak yapmış olduğumuz bu çalışma; ülkemizde faaliyet gösteren gıda kontrol laboratuvarlarının erusik asit ile ilgili yapacakları analizler için validasyon, yeterlilik çalışması, laboratuvarlar arası karşılaştırma, iç kalite kontrol çalışmalarında kullanılabilecek analitik malzeme 14 farklı konsantrasyonda üretilmiş ve üretim yolu ortaya konulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Analitik standart, Erusik asit, FAME, GC-MS/FID, Metil esteri, Standart üretimi

ABSTRACT
MS THESIS

**PRODUCTION OF ERUSIC ACID METHYL ESTER ANALYTICALLY
STANDARD FROM NATURAL SOURCES**

Yağmur KARABAŞ

Gümüşhane University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering

Supervisor: Doç.Dr. Cemalettin BALTACI

2021, 62 pages

Erucic acid is a 22-carbon unbranched mono unsaturated fatty acid containing a single double bond at the omega 9 position. Erucic acid constitutes 30-60% of the total oil content of rapeseed, mustard and goldflower seeds and upto 80% of the total oil content of Latin flower seeds. Erucic acid is also found in some marine animals, such as salmon and herring.

It is thought that the high rate of erucic acid in foods poses some health risks. In the FDA (U.S. Food and Drug Administration), some arrangements have been made regarding the amount of erucic acid that can be found in foods, and some restrictions have been introduced especially on the ratio of erucic acid in canola and rapeseed oils.

Also in our country, In the Turkish Food Codex Contaminants Regulation, fats and oils are added maximum 5% and more than 5% oil food items were given as 5% and other food items (potentially risky foods) as 10%. Turkish food Codex infant formula foods notification maximum MRL (Maximum Residue Limit) is given as 1%.

In addition, the Turkish Food Codex Communiqué on the Sampling and Analysis Method Criteria for Official Control of Erucic Acid Level in Certain Foods (Communiqué No: 2016/4) has been published.

For this reason, it has become mandatory to analyze the presence of erucic acid in inspection, import and export food samples. To perform GC-MS / FID analysis of erucic acid, the standard of methyl ester of erucic acid is required. It is used for the calibration of analytical standard chromatographic instruments and is of high purity. Reference materials play an important role in the validation of analytical methods and in evaluating the accuracy and comparability of results across different laboratories over time. Our country does not have this standard and is imported. Therefore, the study to be carried out is aimed to obtain the standard of Erucic acid methyl ester from Natural sources.

For this purpose, the oils taken from the samples were esterified. Firstly, crystallization was done in order to increase the amount of erucic acid. The crystallization process was repeated until the highest amount of erucic acid was obtained. Erucic acid methyl ester was obtained in pure form by using liquid-liquid extraction and chromatographic methods by separating the formed methyl esters. In this way, erucic acid (C22:1); 2.33%, 4.86%, 6.87%, 8.28%, 10.91%, 12.06%, 17.29%, 22.12%, 29.35%, 34.15%, 38.76%, 43.48%, 51.63% and produced 55.66% standard.

As a result, operating in the country, they're going to do with erucic acid food control laboratories for analysis of validation, qualification study, inter-laboratory comparison Studies Internal Quality Control in analytical material 14 that can be used in different concentrations produced and the way of production was being introduced.

Keywords: Analytical standard, Erucic acid, FAME, GC-MS / FID, Methyl ester, production of standard

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak hazırlanmıştır.

Çalışmalarım sırasında bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyip, karşılaştığım zorluklarda bana yardımcı olan sayın hocam Doç. Dr. Cemalettin BALTACI' ya tezime ve gelecekteki hayatıma sunduğu katkılarından dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yine çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan hocam Arş. Gör. Arda AKDOĞAN ve Laboratuvar arkadaşlarım Merve OLGUN, Ayşe MUSLU ve Selahattin KOCABAŞ' a tezime bulundukları yardımlarından ve psikolojik olarak sundukları destekten dolayı teşekkür ederim.

Tüm yaşamım boyunca bir an olsun desteğini benden esirgemeyip, arkamda duran, bana inanan, girdiğim hiçbir yolda beni yalnız bırakmayan ve her türlü zorluğa göğüs germeme yardımcı olan Annem Canan KARABAŞ, Babam Olgun KARABAŞ, kardeşlerim Kaan ve Metin KARABAŞ' a bana sundukları tüm maddi ve manevi imkânlardan dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Yağmur KARABAŞ

Gümüşhane, 2021

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖZET	IV
ABSTRACT	VI
TEŞEKKÜR	VIII
İÇİNDEKİLER.....	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XII
TABLolar DİZİNİ.....	XIII
SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	XIV
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş	1
1.1.1. Yağlar	2
1.1.2. Yağ Asitleri.....	2
1.1.3. Yağ asitlerinin Sınıflandırılması.....	3
1.1.3.1. Doymuş Yağ Asitleri	4
1.1.3.2. Doymamış Yağ Asitleri	6
1.1.3.2.1. Tekli Doymamış Yağ Asitleri.....	7
1.1.3.2.1.1. Omega 9 Yağ Asitleri	8
1.1.3.2.2. Çoklu Doymamış Yağ Asitleri	8
1.1.3.2.2.1. Omega 3 ve Omega 6 Yağ Asitleri.....	9
1.1.3.3. Trans Yağlar	10
1.2. Erusik Asit	11
1.2.1. Türk Gıda Kodeksi Tebliğinde Erusik Asit	13
1.3. İçinde Erusik Asit Bulunan Bitkiler	13
1.3.1. Latin çiçeği	13
1.3.2. Aspir Tohumu	14

1.3.3.	Hardal Tohumu ve Yağı	15
1.3.4.	Kanola yağı.....	15
1.3.5.	Transesterifikasyon Reaksiyonu	16
1.4.	Sertifikalı Referans Madde (SRM).....	17
1.6.	Kromatografi.....	19
1.6.1.	Gaz Kromatografisi -Kütle Spektroskopisi (GC-MS)	20
1.6.2.	Gaz Kromatografisi	21
1.6.2.1.	Taşıyıcı Gaz	21
1.6.2.2.	Enjeksiyon Sistemi	22
1.6.2.3.	Kolon ve Fırın.....	22
1.6.2.4.	Dedektör	23
1.6.2.5.	Kromatogramlar.....	23
1.6.3.	Kütle Spektrometresi (MS).....	24
1.7.	Kristallendirme ve Metil Esterlerin Ayırımı.....	24
1.8.	Önceki Çalışmalar	25
1.9.	Çalışmanın amacı.....	26
1.10.	Çalışmanın Kapsamı.....	27
2.	MATERYAL VE METOT	28
2.1.	Yağ Ekstraksiyonu.....	28
2.2.	Numunelerde Erusik Asit ve Diğer Yağ Asitleri Miktarlarının Bulunması, erusik asit tayini	29
2.2.3.	GC-MS/FID Cihazının Kromatografik Çalışma Şartları.....	29
2.2.3.2.	İnlet şartları.....	29
2.2.3.3.	Kolon Şartları.....	29
2.2.3.4.	Kolon Fırın Programı.....	29
2.2.3.5.	Detektör Şartları.....	30
2.2.3.6.	MS Detektör Şartları.....	30

2.2.3.7.	Yağ Asitleri Miktarlarının Hesaplanması	30
2.3.	Esterleştirme Çalışması	31
2.4.	Ester Verimi(%).....	32
2.5.	Yağ Asitleri Metil Esterlerinin Tayini	32
2.6.	Kristallendirme	32
3.	BULGULAR VE TARTIŞMA.....	36
3.1.	Numunelere Ait Yağ Asidi Kompozisyonları	36
3.2.	YAME Çalışmalarına Ait Bulgular	38
3.3.	Yüksek Erusik Asitli Numune İçin YAME Kristallendirme Çalışmalarına Ait Bulgular	39
3.4.	Düşük Erusik Asitli YAME Kristallendirme Çalışmalarına Ait Bulgular	45
4.	SONUÇ ve ÖNERİLER	53
5.	KAYNAKLAR	57
6.	EKLER	63
	ÖZGEÇMİŞ	

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.1. Yağ asidi genel formülü	3
Şekil 1.2. Doymuş yağ asidi zincirindeki karbon atomları.....	4
Şekil 1.3. Doymamış yağ asidi zincirinde C atomları	6
Şekil 1.4. Oleik asit (18: 1, omega 9) gösterimi	8
Şekil 1.5. Linoleik asit gösterimi (18: 2, n -6).....	9
Şekil 1.6. Alfa linolenik asit (ALA 18: 3, n - 3).....	9
Şekil 1.7. Geometrik izomer kesitleri (Cis ve Trans)	10
Şekil 1.8. Erusik asit (22: 1 n-9).....	11
Şekil 1.9. (a) Latin çiçeği tohumu, (b) Latin çiçeği türü	14
Şekil 1.10. (a) Aspir tohumu, (b) aspir çiçeği.....	14
Şekil 1.11. Transesterifikasyon reaksiyonu	16
Şekil 1.12. TÜBİTAK UME tarafından üretilen RM ve SRM örnekleri	18
Şekil 1.13. Kullanılan GC- MS cihazı.....	20
Şekil 1.14. Bir GC cihazı şeması.....	21
Şekil 1.15. Gaz kromatografisi enjeksiyon bloğu	22
Şekil 2.1. Tohum yağlarından yağ eldesi için Soxhlet ekstraksiyon düzeneği.....	28
Şekil 2.2. Esterleştirme çalışması	32
Şekil 2.3. YAME için +4 °C kristallendirme ortamında oluşan fazlar	34
Şekil 3.1. Farklı konsantrasyonlarda elde edilen YAME' lerin PCA analizi	49
Şekil 3.2. Farklı konsantrasyonlarda elde edilen YAME' lerin AHC analizi	50

TABLolar DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1.1. Bazı doymuş yağ asitleri	5
Tablo 1.2. Bazı doymamış yağ asitleri	7
Tablo 1.3. Erusik asitin fiziksel ve kimyasal özellikleri.....	12
Tablo 1.4. Türk Gıda Kodeksi Tebliğinde erusik asit maksimum limiti.....	13
Tablo 1.5. Kromatografi türleri	19
Tablo 2.1. Kristallendirme de kullanılan sıcaklık ve çözücü parametreleri	33
Tablo 3.1. Çalışılan numunelere ait yağ asidi kompozisyonları (%).....	37
Tablo 3.2. Düşük ve yüksek erusik asitli numunelerden elde edilen YAME kompozisyonları(%)	38
Tablo 3.3. -18, 0 ve +4 °C' de yapılan kristallendirme çalışmalarına ait YAME verileri.	39
Tablo 3.4. Birinci zenginleştirme sonucunda elde edilen yağ asitleri metil esterleri.. miktarları (Yüksek).....	40
Tablo 3.5. İkinci zenginleştirme sonucunda elde edilen yağ asitleri metil esterleri miktarları (Yüksek)	41
Tablo 3.6. Üçüncü zenginleştirme sonucunda elde edilen yağ asitleri metil esterleri miktarları (Yüksek).....	42
Tablo 3.7. Dördüncü zenginleştirme sonucunda elde edilen yağ asitleri metil esterleri miktarları (Yüksek).....	43
Tablo 3.8. Beşinci zenginleştirme sonucunda elde edilen yağ asitleri metil esterleri miktarları (Yüksek).....	44
Tablo 3.9. Üst kısmın birinci zenginleştirmesi sonucunda elde edilen yağ asitleri metil esteri miktarları (Düşük).....	46
Tablo 3.10. Üst kısmın ikinci zenginleştirmesi sonucunda elde edilen yağ asitleri metil esteri miktarları (Düşük).....	47
Tablo 3.11. Farklı bileşimlerde erusik asit ve diğer yağ asidi metil esterleri (%).....	48
Tablo 3.12. Farklı konsantrasyonlardaki erusik asit metil esterlerinin korelasyon matrix (Pearson (n))	52

SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AFB ₁	: Aflatoksin B ₁
AFB ₂	: Aflatoksin B ₂
AFG ₁	: Aflatoksin G ₁
AFG ₂	: Aflatoksin B ₂
ALA	: Alfa linolenik asit
C	: Karbon
Cm	: Santimetre
-COOH	: Karboksil grubu
CRM (SRM)	: Sertifikalı referans materyal
DHA	: Dokosa heksaenoik asit
EFSA	: Avrupa gıda güvenliği otoritesi
EPA	: Eikosa pentaenoik asit
FDA	: Amerikan gıda ve ilaç dairesi
FID	: Flame iyonizasyon dedektör
G	: gram
GC	: Gaz kromatografisi
GC-MS/FID	: Gaz kromatografisi-kütle dedektörü/ Flame iyonizasyon dedektörü
GLC	: Gaz sıvı kromatografisi
GSC	: Gaz katı kromatografisi
H ₂ SO ₄	: Sülfirik asit
HCl	: Hidroklorik asit
HDL	: Yüksek yoğunluklu lipoprotein
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
KOH	: Potasyum hidroksit
LAK	: Laboratuvarlar arası karşılaştırma testi
LDL	: Düşük yoğunluklu lipoprotein
LLC	: Sıvı sıvı kromatografisi
MeOH	: Metanol
MRL	: Maksimum rezidü limiti
MSD	: Kütle dedektörü
MUFA	: Tekli doymamış yağ asidi
NaOH	: Sodyum hidroksit
NIST	: Amerikan teknoloji ve standartlar ulusal enstitüsü (National institute of standards and technology)
OC	: Santigrat derece
PUFA	: Çoklu doymamış yağ asidi
-R	: Alkil grubu
RM	: Referans materyal
Rpm	: Devir sayısı
ω	: omega
dk	: dakika
mm	: milimetre
mg	: miligram

kg	: kilogram
M	: Molarite
Rs	: Kolon ayırma gücü
LSC	: Sıvı katı kromatografisi
SI	: Uluslar arası birim sistemi
TDI	: Tolere edilebilir günlük alım miktarı
TGK	: Türk gıda kodeksi
TLC	: İnce tabaka kromatografisi
tR	: Alıkonma zamanı
TS	: Türk standartları
WHO	: Dünya sağlık örgütü
YAME	: Yağ asitleri metil esterleri
YT	: Yeterlilik testi

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Beslenme her canlının ihtiyacı olduğu gibi insanların da yaşamını sürdürebilmesi için temel ihtiyacıdır (Sayan, 1999). Sağlıklı beslenme büyüme ve gelişmenin tamamlanması, sağlığın korunması veya kötü ise iyileştirilmesi, hayatın devamı, ayrıca yaşam kalitemizin artırılması için besin maddelerinin hem yeteri kadar hem de dengeli bir şekilde alınmasıdır (Ünsal, 2019).

Yetersiz ve dengesiz beslenmenin sağlığa etkisi kadar, az ve aşırı beslenmesinde etkisi vardır. Yeterli ve dengeli beslenme yapılmadığı takdirde diyabet, kanser ve hipertansiyon gibi hastalıklara yakalanma şansı artmaktadır (Sayan, 1999). Yetersiz beslenme kardiyovasküler hastalıklar için de bir risk faktörü olup çocukluktan itibaren gözlenmekte, yetişkinlikte de devam edebilmektedir (Ascherio ve Willett, 1997).

Vücuda alınan besin öğelerinin büyüme ve gelişmeye yardımcı olmak, enerji ihtiyacını karşılamak ve metabolizmayı düzenlemek gibi temel görevleri vardır (Ünsal, 2019).

Temel besin öğeleri:

- Protein
- Karbohidrat
- Yağ gibi makro ve organik olanlar,
- Mineral
- Vitamin
- Su gibi mikro ve inorganik öğeler olarak sınıflandırılır (Ünsal, 2019).

Yapılan araştırmalar sonucunda hastalıklar ve beslenme alışkanlığı arasında bir bağlantı bulunmuştur ve bu araştırmalarda en çok sorgulanan besin öğesi yağdır (Taşan ve Geçgel, 2007). Yağlar diğer besin öğelerinin yanında alınması gereken önemli yapıtaşları ve enerji kaynaklarıdır (Yaprakçı 2009).

1.1.1. Yağlar

Lipitler, sıradan katı ve sıvı yağları, mumları ve yiyecekler ile insan vücudunda bulunan ilgili bileşikleri içerir (Gonzalez, 2002). Yağlar; karbon, oksijen ve hidrojen atomlarından oluşur. Gliserol ve yağ asitlerinin yaptığı kimyasal bileşiklerdir (Ünsal, 2019). Yağlar suda çözünmezler genellikle eter, benzen, kloroform ve aseton gibi çözücülerle çözünürler (Karaca ve Aytaç, 2007).

Aynı zamanda vücudun enerji deposudurlar. Proteinler ve karbonhidratların 1 gramı 4 kalori verirken, yağlar 9 kalori verir (Sayan, 1999). Yağlardan alınan kaloringin % 30-35 den fazla, doymuş yağlardan alınanın ise % 10 dan fazla olmaması gerekir. Yağda çözünen vitaminlerin alımında da rol oynarlar (Çakmakçı ve Kahyaoğlu, 2012).

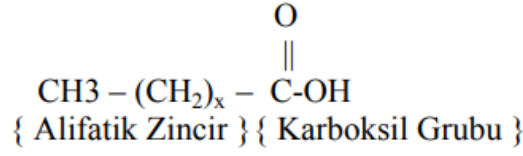
Yağlar proteinlerle birleşerek lipoproteinleri oluştururlar ve hücrenin yapı maddelerini meydana getirirler. Yağlar deri altında birikerek soğuğa karşı direnç sağlar ve vücudun genel görüntüsünün oluşumun da etkilidir. Midede uzun süre kalabildiklerinden tokluk hissi verirler. Organların etrafını sararlar ve onları sarsılmalara karşı korurlar (Mol, 2008) .

1.1.2. Yağ Asitleri

En sık analiz edilen yağ asitleri C4- C24 ' dan oluşur. Bir ucunda bir karboksil grubu (-COOH) olan hidrokarbon zincirleridir. Yağ asitlerinin türleri:

- Doymuş = karbon atomları arasındaki tüm tek bağlar.
- Doymamış = en az bir çift bağ.
- Çoklu doymamış = en az iki çift bağ.
- Cis = çift bağın her iki tarafındaki bağlar aynı taraftadır.
- Trans = çift bağın her iki tarafındaki bağlar karşı taraftadır.
- Omega 3 = yağ asidi metil ucundan başlanıp sayıldığında ilk 3. de çift bağ.
- Omega 6 = yağ asidi metil ucundan başlanıp sayıldığında ilk 6. da çift bağ.

Yağ molekülünü oluşturan bileşenler; yağ asitleri, gliserol, gliserid, fosfolipit, sterol, lipokrom, hidrokarbon, mumdur. Yağ asitleri gliseritlerin temel bileşenidir ve yağın büyük çoğunluğunu oluşturur (Yaprakçı, 2009).



Şekil 1. 1. Yağ asidi genel formülü

Bir yağ asidi molekülü 1 tane alkil (-R) ve bir tane karboksil (-COOH) grubundan oluşur. Molekülün asidik karakterini karboksil grup belirler (Yaprakçı, 2009). Kimyasal bir bakış açısından, yağ asitleri, bir uçta bir karboksil grubu ve diğer uçta bir metil grubu ile sonlanan düz hidrokarbon zincirleridir (Gonzalez, 2002).

Yağı oluşturan gliserol molekülü her yağ bitkisinde aynı fakat yağ asidi kompozisyonu farklılık gösterir. Yağ asitlerinin kompozisyonunu yağların kimyasal ve fiziksel özellikleri belirler. Bu farklılıklar yağların yemeklik yağ olarak, sabun olarak yada farklı endüstri kollarında kullanılmasını yani kullanım alanını belirler (Karaca ve Aytaç, 2007). Çoğunlukla, bir gliserol molekülü ve üç yağ asidi içeren trigliseridlerden oluşurlar (Gonzalez, 2002). Yağ asitleri karbon sayısı, karbonlar arası çift bağ olup olmaması, çift bağ yeri ve miktarı gibi durumlarla birbirinden ayrılırlar (Karaca ve Aytaç, 2007).

Günümüzde 200 den fazla yağ asidinin olduğu bilinmektedir. Ancak yağların çoğunluğunu temel yağ asitleri oluşturur (Yaprakçı, 2009).

1.1.3. Yağ asitlerinin Sınıflandırılması

Yağ asitleri genellikle karbon atom sayılarına, karbon atomları arasındaki çift bağ sayısına ve vücutta sentezlenmelerine göre sınıflandırılırlar (Karaca ve Aytaç, 2007).

- Yağ asitleri karbon sayılarına göre kısa(2,4 C), orta(6,10 C) ve uzun(12 ve üzeri C) zincirli olarak adlandırılırlar (Gonzalez, 2002).

Kısa zincirli yağ asitlerine örnek olarak; (Gökmen ve Köksal, 2001)

- Asetik asit (2:0) = $\text{CH}_3 \text{ COOH}$
- Bütirik asit (4:0) = $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_2 - \text{COOH}$

Orta zincirli yağ asitlerine örnek olarak;

- Kaproik asit (6:0) = $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_4 - \text{COOH}$
- Kaprilik asit (8:0) = $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_6 - \text{COOH}$

Uzun zincirli yağ asitlerine örnek olarak;

- Behenik asit (22:0) = $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_{20} - \text{COOH}$
- Lignoserik asit (24:0) = $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_{22} - \text{COOH}$

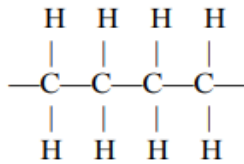
Zincir yapılarına göre yağ asitleri: düz zincirli, halka yapılı, süstitüe olmuş, dallanmış zincirli olarak ayrılırlar (Erkmen, 2019).

Yağ asitleri en yaygın doymuş ve doymamış yağ asitleri olarak sınıflandırılırlar. Doymamış yağ asitleri tekli doymamış ve çoklu doymamış olarak ayrılır (Gonzalez, 2002). Doymuş ve doymamış yağ asitleri aynı sayıda karbon sayısı içerse bile; kaynama ve erime noktaları, optik özellikleri ve verdikleri tepkimeler olarak farklılıklar gösterebilirler (Yaprakçı, 2009).

1.1.3.1. Doymuş Yağ Asitleri

Doymuş yağ asitleri tek kovalent bağlarla bağlanmış düz karbon ve hidrojen bağlarında oluşurlar (Ballesteros-Vasquez, 2012).

Yüksek erime noktasına sahip olduklarında doymuş yağ asidi içeren yağlar genellikle oda sıcaklığında katıdır fakat yapısında doymamış yağ asidi de barındırıyorsa sıvı olurlar (Çakmakçı ve Kahyaoğlu, 2012).



Şekil 1. 2. Doymuş yağ asidi zincirindeki karbon atomları

Doymuş asiti içeren besinler; tereyağı, kuyrukyağı, kırmızı et, kümes hayvanlarının derisi, tam yağlı süt ve süt ürünleridir (Şahingöz, 2007). Bazı tropikal meyveler, hindistan

cevizi ve hurmada da bulunur (Turan vd., 2013). Balık yağında % 20 doymuş yağ % 80 doymamış yağ asidi vardır (Mol, 2008).

Doymuş yağ asitleri içeren besinlerde bulunan yağ ve hayvanların depoladığı yağlar genellikle trigliserit halindedir (Ünsal, 2019). İnsan vücudu doymuş yağ asitleri ve tekli doymamış yağ asidi olan omega 9 yağ asitlerini sentezleyebilmektedir (Mol, 2008).

Tablo 1. 1. Bazı doymuş yağ asitleri

Yağ asidinin adı	Karbon iskeleti	Kapalı formüller	Açık formüller
Asetik asit	2: 0	C ₂ H ₄ O ₂	CH ₃ COOH
Propiyonik asit	3: 0	C ₃ H ₆ O ₂	CH ₃ CH ₂ COOH
Bütirik asit	4: 0	C ₄ H ₈ O ₂	CH ₃ (CH ₂) ₂ COOH
Kaproik asit	6: 0	C ₆ H ₁₂ O ₂	CH ₃ (CH ₂) ₄ COOH
Kaprilik asit	8: 0	C ₈ H ₁₆ O ₂	CH ₃ (CH ₂) ₆ COOH
Kaprik asit	10: 0	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	CH ₃ (CH ₂) ₈ COOH
Laurik asit	12: 0	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	CH ₃ (CH ₂) ₁₀ COOH
Miristik asit	14: 0	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	CH ₃ (CH ₂) ₁₂ COOH
Palmitik asit	16: 0	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	CH ₃ (CH ₂) ₁₄ COOH
Stearik asit	18: 0	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	CH ₃ (CH ₂) ₁₆ COOH
Araşidik asit	20: 0	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	CH ₃ (CH ₂) ₁₈ COOH
Behinik asit	22: 0	C ₂₂ H ₄₄ O ₂	CH ₃ (CH ₂) ₂₀ COOH
Lignoserik asit	24: 0	C ₂₄ H ₄₈ O ₂	CH ₃ (CH ₂) ₂₂ COOH

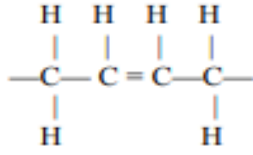
Palmitik ve stearik asit bitkisel yağlarda bulunan en yaygın yağ asidi çeşitleridir (Karaca ve Aytaç, 2007).

- Süt yağında: Bütirik asit, kaproik asit kaprilik asit, kaprik asit, miristik asit, laurik asit, palmitik asit
- Hindistan cevizi yağında: Kaproik asit, kaprilik asit, kaprik asit, laurik asit, miristik asit
- Kakao yağında: Kaproik asit, kaprilik asit, kaprik asit, laurik asit bulunur (Gökmen ve Köksal, 2001).

Diyetle doymuş yağ alımının düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) kolesterolü attırdığı gösterilmiş ve bu nedenle kardiyovasküler hastalıkların artması riski ile ilişkilendirilmiştir (Siri- Tarino, 2010). Doymuş yağ alımının azalması insülin duyarlılığını arttırdığı gözlenmiştir (Keller, 2008). Doymuş yağ tüketiminin; toplam kalori alımının % 8 i ya da günlük 18 gram olarak sınırlandırılması tavsiye edilmektedir (Turan vd., 2013).

1.1.3.2. Doymamış Yağ Asitleri

Karbon zincirleri arasında en az bir tane kovalent çift bağ bulunan yağ asitlerine doymamış yağ asitleri, bu asitlerce zengin olan yağlara da doymamış yağ denir. Çift bağların konumu farklılık gösterebilir (Karaca ve Aytaç, 2007).



Şekil 1. 3. Doymamış yağ asidi zincirinde C atomları

Karbon zinciri üzerinde sadece bir çift bağ bulunan yağ asitlerine tekli doymamış, iki veya daha fazla bulunan yağ asitlerine çoklu doymamış yağ asitleri denir (Çakmakçı ve Kahyaoğlu, 2012). Gıdalarda yaygın olarak bulunan tekli doymamış yağ asidi oleik asit iken en yaygın bulunan çoklu doymamış yağ asidi ise linoleik asittir (Semma, 2002).

Doymamış yağ asitlerini; zeytinyağı, ayçiçeği, fındık, mısır, kanola, soya gibi bitkisel yağlar ile özellikle soğuk sularda yaşayan uskumru, ton, somon gibi balıklar da bol miktarda içermektedir (Çakmakçı ve Kahyaoğlu, 2012). Doymuş yağ asitleri genellikle oda sıcaklığında sıvıdır ve çoğunlukla bitkisel yağlar da bulunmaktadır. Doymuş yağ asitlerine göre doymamış yağ asitleri içerdikleri çift bağlar nedeni ile daha reaktiftirler (Karaca ve Aytaç, 2007).

Doymamış yağ asitleri çift bağlarının sayısı ve bulunduğu yere göre adlandırılır. Yağ asidi molekülünün metil ucundan başlayarak ilk çift bağa göre omega veya 'n' olarak gösterilmekte ve doymamış yağ asitleri n-3, n-6, n-9 olmak üzere 3 grupta toplanmaktadır (Mol, 2008). İlk çift bağ üçüncü karbondan ise n-3, altıncı karbondan ise n-6 olarak adlandırılır (Yeltekin, 2012).

Tekli doymamış yağ asitleri n-9, çoklu doymamış yağ asitleri ise n-3 ve n-6 olarak sınıflandırılmaktadır (Mol, 2008).

Bazı yağ asitleri insan vücudunda sentezlenemez dışarıdan almak gerekir. Bu yağ asitlerine esansiyel yağ asitleri denir ve yaygın olarak bunlar n-3 ve n-6 yağ asitleridir.

Doymuş yağ asitleri ile n-9 yani tekli doymamış yağ asitleri esansiyel değildir (Gonzalez, 2002).

Tablo 1. 2. Bazı doymamış yağ asitleri

Yağ asidinin adı	Zincir uzunluğu	Yapı formülleri
Miristoleik asit, n-9	C - 14: 1	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Palmitoleik asit, n-9	C - 16: 1	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Oleik asit, n-9	C - 18: 1	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Erusik asit	C - 22: 1	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{11}\text{COOH}$
Linoleik asit, n-6	C - 18: 2	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Eikosatrienoik asit	C - 20: 3	$\text{CH}(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$
Araşidonik asit, n-6	C - 20: 4	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$
α - Linolenik asit, n-3(ALA)	C - 18: 3	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Eikosapentaenoik asit (EPA) , n-3	C - 20: 5	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$
Dokosaheksaenoik asit (DHA), n-3	C - 22: 6	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}=\text{CH-CH}_2\text{-CH}=\text{CH-CH}_2\text{-CH}=\text{CH-CH}_2\text{-CH}=\text{CH-CH}_2\text{-CH}=\text{CH-CH}_2\text{-CH}=\text{CH-CH}_2\text{-CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_2\text{-COOH}$

1.1.3.2.1. Tekli Doymamış Yağ Asitleri

Bu yağ asitleri bir çift bağ içerirler ve monoenoik yağ asitleri olarak adlandırılırlar. En yaygın tekli doymamış yağ asidi oleik asittir (Semma, 2002). Tekli doymamış yağ asitlerini zeytin ve kolza yağı, kabuklu yemişler ve yağları, avokado yüksek oranda içerir (Karaca ve Aytaç, 2007).

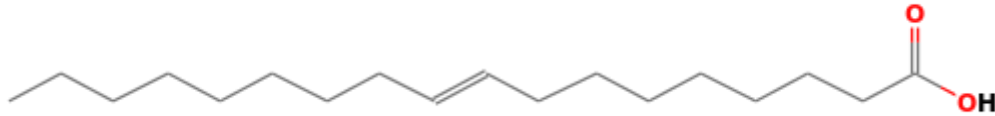
Tekli doymamış yağ asitlerinin LDL karşısında nötral, HDL karşısında arttırıcı bir etkisi vardır. Kalp ve damar hastalıkları risk faktörlerinin iyileştirilmesinde rol oynarlar.

Buna rağmen alınan toplam enerjinin % 20 yi geçmemesi gerekir (Çakmakçı ve Kahyaoğlu, 2012).

1.1.3.2.1.1. Omega 9 Yağ Asitleri

Tekli doymamış yağ asitleridir. Örnek olarak oleik asit, erusik asit gösterilebilir. n – 9 veya ω - 9 olarak gösterilirler (Gökmen ve Köksal, 2001). Buradaki n -9 yağ asidi molekülünde çift bağın olduğu yeri ifade eder."Omega" veya "n eksi" terimleri, molekülün metil ucuna en yakın yağ asidinin çift bağının konumunu belirtir. Omega 9 yağ asitleri esansiyel değildir yani vücutta sentezlenebilmektedir (Gonzalez, 2002).

- Oleik asit (18: 1, n - 9) zeytinyağında % 72,5 oranında, fındık yağında,
- Palmitoleik asit süt yağında, balık yağında,
- Miristoleik asit süt yağında ve balık yağında bulunurlar (Gökmen ve Köksal, 2001).



Şekil 1. 4. Oleik asit (18: 1, omega 9) gösterimi

1.1.3.2.2. Çoklu Doymamış Yağ Asitleri

İki veya daha fazla çift bağ içerirler ve polyenoik yağ asitleri olarak adlandırılırlar. En yaygınları linoleik, α – linolenik, araşidonik, EPA ve DHA' dır. Çoklu doymamış yağ asitleri F vitamin olarak da adlandırılmaktadırlar ve aynı zamanda vücutta sentezlenemezler (Karaca ve Aytaç, 2007).

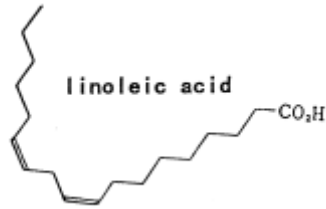
Bu yağ asitleri yaygın olarak bazı balık türlerinde fazla miktarda ve mısır, soya, ayçiçeği yağlarında bulunurlar. Deniz ürünlerindeki yağların çoğunluğu bu yağ asitleridir. Tüketimiyle LDL kolesterolünde düşüş sağlayabilmektedir (Samur, 2006).

1.1.3.2.2.1. Omega 3 ve Omega 6 Yağ Asitleri

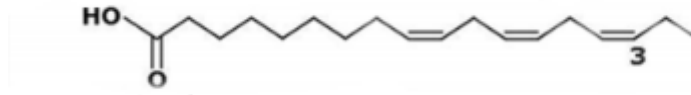
Omega 3 ve omega 6 yağ asitleri çoklu doymamış yağ asitleridir. Buradaki n -3 veya n - 6 yağ asidi molekülünde çift bağın olduğu yeri ifade eder. "Omega" veya "n eksi" terimleri, molekülün metil ucuna en yakın yağ asidinin çift bağının konumunu belirtir (Asıf, 2011). Omega 3 ve 6 ailesi esansiyel yağ asitleridirler. Vücutta sentezlenemediği için dışarıdan alınmalıdır (Gonzalez, 2002).

n-6 ve n-3 kaynakları yabani bitkiler ve balıklardır (Gonzalez, 2002). n-3; keten tohumu, ceviz, özellikle planktonlar ve yağlı balıklarda fazlaca bulunur. Keten tohumu ve cevizde ALA, balık yağlarında ise EPA ve DHA bulunur. n-6 ise mısır ve soya fasülyesi yağında bulunur. En önemli n-6 yağ asidi ise linoleik asittir (Çakmakçı ve Kahyaoğlu, 2012).

Yapılan farklı araştırmalar sonucu; omega 3 yağ asitlerinin kalp damar hastalıklarının önlenmesinde, alzheimer gibi hastalıklara karşı korumada, kronik hastalıkların önlenmesinde, hamilelik ve bebeklik döneminde gelişimin desteklenmesinde rol oynadığı tespit edilmiştir (Yeltekin, 2012).



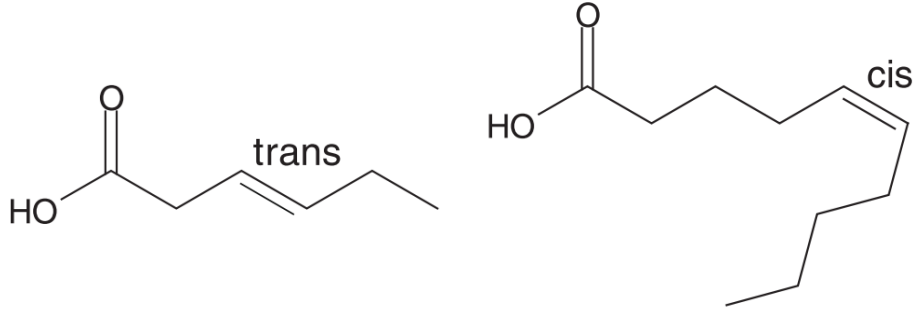
Şekil 1. 5. Linoleik asit gösterimi (18: 2, n -6)



Şekil 1. 6. Alfa linolenik asit (ALA 18: 3, n - 3)

1.1.3.3. Trans Yağlar

Doymamış bir yağ asidi molekülü içinde, bir çift bağ etrafında iki konfigürasyon formu oluşabilir. Bunlar cis ve trans konfigürasyonlardır. Hidrojen atomları karbon zinciri üzerinde aynı yönde ise cis, birbiri ile çapraz yönde ise trans formdadır (Semma, 2002).



Şekil 1. 7. Geometrik izomer kesitleri (Cis ve Trans)

Cis formdaki yağ asitlerinin erime noktaları düşük, trans formdaki yağ asitlerinin ise erime noktaları oldukça yüksektir. Cis formun erime noktası örneğin 13, 14 °C iken trans formun 44, 45 °C olabilir. Genellikle bitkisel yağlardaki doymamış yağ asitleri ve balık yağındaki çoklu doymamış yağ asitleri cis formdadır (Çakmakçı ve Kahyaoglu, 2012).

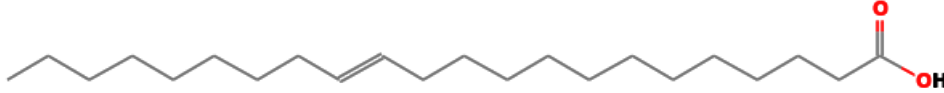
Trans yağ asitlerinin, oksidatif acılaşmaya karşı stabil olması, erime noktasının yüksek olması uzun raf ömrüne sahip olmasına izin olur. Bu nedenle gıda endüstrisi tarafından yaygın olarak kullanılmaktadır. Fakat çok sayıda epidemiyolojik ve klinik kanıtlar sonucu trans yağların kardiyovasküler hastalıklar, iltihaplanma, diyabet ve kanser gibi hastalıklara yol açtığı belirlenmiştir (Ballesteros-Vasquez, 2012).

Trans yağlar doğal ve endüstriyel olmak üzere iki şekilde üretilir. Birincisi inek, koyun, keçi gibi poligastrik hayvanların iştikembesinde doymamış yağ asitlerinin kısmi biyohidrojenizasyonu ile oluşur. Bu işlemi iştikemdede ki mide izomeraz bakterileri gerçekleştirir (Ascherio ve Willett, 1997). Aynı zamanda pişirme sırasında kızartma yağlarının da trans forma geçebileceği bilinmektedir (Smith vd., 1978). İkincisi ise bitkisel yağların endüstriyel hidrojenasyonudur. Belirli basınç ve sıcaklık koşullarında, bir katalizör metal varlığında yağa hidrojen gazı eklenir. Bu koşullar altında çift bağlar birkaç yapısal değişikliğe uğrar. Bunlar çift bağın tek bağa doyurulması veya zincir

konfigürasyonunun değiştirilerek trans forma dönüşmesi olabilir. Böylelikle sıvı yağlar katı yağa dönüştürülür. Margarinler de bu yöntemle üretilir (Ballesteros-Vasquez, 2012).

1.2. Erusik Asit

Erusik asidin kimyasal formülü; $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{11}\text{COOH}$ tır. Erusik asit 22 karbonlu, dallanmamış zincirli ve omega - 9 pozisyonunda yapısında bir tane çift bağ bulunan tekli doymamış bir yağ asididir (EFSA,2016). Erusik asit kolza, hardal ve şebboy tohumlarında % 30 ila 60 kadar, Latin çiçeği tohumunda ise % 80 kadar toplam yağ içeriğinde bulunur.



Şekil 1. 8. Erusik asit (22: 1 n-9)

Erusik asiti aynı zamanda somon ve ringa balığı gibi bazı deniz hayvanları da içermektedir (Erkmen, 2019). Hardal yağının % 42, kolza tohumunun ise % 54 oranında erusik asit içerdiği bilinmektedir (Sahasrabudhe, 1977). Plastidlerde sentezlenen oleik asit elongasyon yoluyla da sitozolde erusik aside dönüşebilmektedir (Erkmen, 2019).

Halk sağlığı ile ilgili endişeler iki nedenle artmaktadır. Birincisi; yapılan çalışmalar tüketilen erusik asit ile miyokardiyal yağlanma arasında ilişki olduğunu göstermektedir. Miyokardiyal yağlanmanın kalp kasılma gücünü azaltmakta olduğu bilinmektedir. İkincisi ise; deney farelerindeki kalp hasarı ile erusik asit arasındaki ilişkidir (Klassen vd., 1987).

Erusik asitin toksik etkisi ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Omega-9 grubunda olan oleik asit ve erusik asit oranının fazla miktarda olması bazı sağlık sorunlarını ortaya çıkarmaktadır.

Tablo 1. 3. Erusik asitin fiziksel ve kimyasal özellikleri

Özellikler	Değer
Moleküler formülü	C ₂₂ H ₄₂ O ₂
Molekül ağırlığı	338.56768 g/mol
Kaynama noktası	265 °C
Erime noktası	33.8 °C
Yoğunluk	0.860 g/cm ³
Kırılma indisi	45 °C de 1.4534

1960' larda erusik asitin zararlı olduğu anlaşılmış bu nedenle Kanada' da erusik asit miktarı eser miktarda olan kanola yağı üretimine başlanmıştır (Deuel vd., 1949; Vaisey vd., 1973).

Ülkemizde de kolza yağının erusik asit içerdiği bilinmektedir. Bundan dolayı ülkemizde ekimi ve yemeklik yağ olarak kullanımı yasaklanmıştır. Dünya Sağlık Teşkilatı (WHO) tarafından, erusik asit miktarı için standartlar oluşturulmuştur. FDA' da da gıdalarda bulunabilecek erusik asit miktarları için düzenlemeler yapılmış, özellikle de kanola ve kolza yağlarındaki erusik asit miktarıyla ilgili kısıtlamalar belirlenmiştir. Dünya Sağlık Teşkilatı tarafından erusik asit miktarı; 1982 yılına kadar yemeklik yağlarda % 10, 1982 yılından sonra ise % 5 olarak belirlenmiştir. Hatta yeni doğan bebek mamalarında erusik asit varlığına izin verilmemektedir (Tosun ve Özkal, 2000). Kolza yağındaki erusik asidin verdiği miyokardiyal hastalıklar yüzünden, kolza ıslahı önem kazanıp, yarım tohum tekniği ve geri melezleme yöntemi ile oleik asitce zengin erusik asitce fakir kanola yağı geliştirilmiştir (Klassen vd., 1987).

Erusik asit yüksek miktarda *Brassicaceae* bitki ailesinin bazı türlerinin tohumlarında bulunur. Bu türler toplam yağ içeriğinin % 60 a kadarında erusik asit içerir. Bu aile, tohum yağı üretimi ve hardal gibi çeşniler üretmek için yetiştirilen birkaç türü içerir (EFSA,2016).

- Kanola (*Brassica napus L.*)
- Şalgam türü (*Brassica rapa L.*)
- Krambe(*Crambehispanicasubsp. Abyssinica*)

- Hint hardalı (*Brassica juncea L.*) (EFSA, 2016).

Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) yem ve gıdalardaki erusik asit miktarı için 2016 yılında bir risk değerlendirmesi yayınlamıştır. Erusik asit için tolere edilebilir günlük alım (TDI) 7 mg/kg olarak belirlenmiştir (EFSA, 2016).

1.2.1. Türk Gıda Kodeksi Tebliğinde Erusik Asit

Türk Gıda Kodeksi (TGK) Bulaşanlar Tebliğinde erusik asit ile ilgili maksimum rezidü limiti (MRL) belirtilmiştir. Tebliğde gıdalarda % 10, katı ve sıvı yağlarda % 5, bebek formüllü gıdalarda en fazla % 1 olarak verilmiştir. Ayrıca 2016/4 nolu TGK tebliğine göre de numune alma ve analiz metotlarının geçerli kılınmasına ilişkin mevzuat yayınlanmıştır (TGK, 2011a, 2016b, 2019c).

Tablo 1. 4. Türk Gıda Kodeksi Tebliğinde erusik asit maksimum limiti

Gıda	Maksimum limit(%)
Erusik asit	
Katı ve sıvı yağlar	5
% 5' den fazla yağ ilave edilen gıda maddeleri	5
Bulunması riskli diğer gıda maddeleri	10

Tebliğe göre, tüketime hazır bebek formüllerinin bileşim gereklilikleri;

Bebek formüllerinde susam yağı ve pamuk yağı kullanımı yasaktır. Erusik asit içeriği, toplam yağ içeriğinin % 1'ini geçmemelidir (TGK, 2019).

1.3. İçinde Erusik Asit Bulunan Bitkiler

1.3.1. Latin çiçeği

Tropaeolaceae familyasından olan latin çiçeği (*Tropaeolum majus L.*) süs bitkisi olarak yetiştirilirken son zamanlarda yenilebilen çiçekler arasında da yerini almaktadır.

Latin çiçeği kendiliğinden yetiştiği gibi tohumla da üretilebilir ve tek yıllık bir bitkidir. Latin çiçeği süs bitkisi olarak dekoratif kullanılmasının yanında medikal olarak da kullanılır (Açıkgöz, 2018).



şekil 1. 9. (a) Latin çiçeği tohumu, (b) Latin çiçeği türü

Latin çiçeği yüksek fenolik bileşik ve askorbik asit içeriği ile birlikte, serbest radikal temizleme aktivitesi, gıdalardaki renk pigmenti olarak kullanılması ve antioksidan kaynağı olmasıyla tercih edilir (Garzon, 2009).

Yapraklarında ki antosiyanin miktarı: 72 mg/ 100 g, askorbik asit miktarı: 71.5 mg/ 100 g (Garzon, 2009).

Latin çiçeği potasyum, fosfor, kalsiyum ve magnezyum gibi mikro; çinko, bakır ve demir gibi makro elementler bakımından zengindir. Çiçeklerinden ve yapraklarından elde edilen bu elementler ve uçucu yağ; antimikrobiyal, antifungal, balgam söktürücü, kanser önleyici gibi etkilere sahiptir. Solunum ve sindirim sistemi hastalıkları tedavisinde de etkilidir. Latin çiçeği tohumları yüksek erusik asit içerir (Jakubczyk vd., 2018).

1.3.2. Aspir Tohumu

Aspir (*Carthamus Tinctorius L.*) Compositae/Asteraceae (papatyagiller) familyasına aittir (Eryılmaz vd., 2014). Aspir çiçeği sarı, kırmızı, turuncu veya krem renkte olabilmekte ve dikenli veya dikensiz çeşitleri de bulunmaktadır (Yakar vd., 2014). Aspir esas olarak yemeklik yağ ve kuşyemi olarak kullanılmak üzere üretilirken son zamanlarda biyodizel üretmek için kullanılmaktadır (Eryılmaz vd., 2014). Aspir tohumu yaklaşık; % 35- 40 yağ, % 16- 20 protein, % 35- 40 kabuktan oluşmaktadır. Aspir tohumlarından elde edilen proteinler iyi kaliteye sahiptir (Latha ve Prakash, 1984).

Aspir kurak alanlarda yetişebilen tek yıllık bir bitkidir. Kullanım alanı oldukça geniş olup; boya, vernik, yağ, yem ve ilaç sanayi gibi alanlarda kullanılabilir. Ülkemizde 1929’ dan beri yağ bitkisi olarak yetiştirilmektedir (Karabaş, 2013).



(a)



(b)

Şekil 1.10. Aspir tohumu (a) ve Aspir çiçeği (b)

Aspir yağı fazla miktarda oleik (% 16- 21) ve linoleik (% 71- 75) asit içerir. Ayrıca yüksek miktarlarda yağ ve protein içerdiğinden yağı alındıktan sonra kalan küspe yem olarak değerlendirilir (Yakar vd., 2014).

1.3.3. Hardal Tohumu ve Yağı

Hardal yağ ve baharat bitkisi olarak bilinmektedir. Hardal yağı yüksek erusik asit içerdiğinden beslenmeye uygun değildir fakat ilaç ve kozmetik endüstrisinde kullanılmaktadır. Kendine has lezzeti olan hardalın antimikrobiyal etkisi olduğu bilinmektedir (Özcan, 1998). Hardalın koruyucu etkisi, türlerine göre değişiklik gösteren uçucu yağdan ileri gelmektedir. Siyah hardal % 35-40 yağ, % 20 protein, sinigrin ve mirosinaz enzimi içermektedir (Coşkun ve Arıcı, 2011). Hardal mikotoksine karşı antimikrobiyal etki göstermektedir (Coşkun, 2006).

1.3.4. Kanola yağı

Kanola, rapaseed adı altında toplanan brassica türlerinin genetik olarak değiştirilmiş çeşididir. Fakat rapaseed denildiğinde direkt kanola anlaşılmamalıdır. Çünkü kanola ticari bir isimdir (Tosun ve Özkal, 2000). Kolza da bulunan erusik asit insan sağlığı için, küspesinde bulunan glukosinolat ise hayvan sağlığı için tehlikelidir (Baydar, 2005).

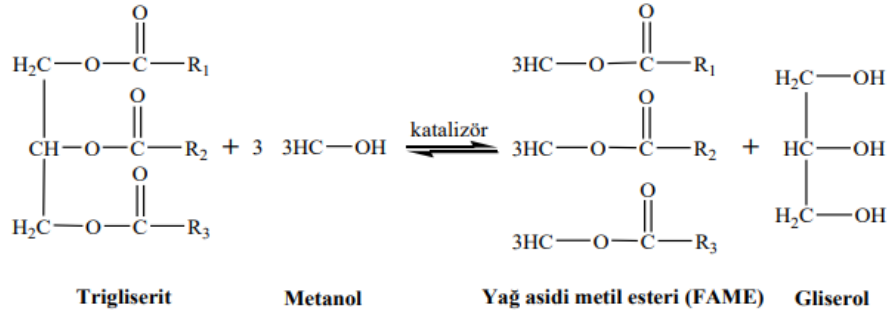
1980’lerde kolzanın yüksek erusik asit içeriğinden dolayı sağlığı tehdit edeceği düşünüldüğünden kolzadan erusik asit içermeyen kanola üretilmiştir (Velioğlu vd., 2017).

Kanola yağı ortalama % 65 oleik, % 20 linoleik, % 9 linolenik, % 4 palmitik ve % 2 stearik asit içermektedir. Kanola yağı yapısında % 60’dan fazla oleik asit içerdiği için zeytinyağı ile benzer özellik gösterir. Kanola yağı günümüzde % 2’den az erusik asit içermektedir (Baydar, 2005).

Avrupa konseyi halk sağlığını korumak için, yağlardaki toplam yağ asitleri içeriğinde erusik asiti en fazla % 5 olarak belirlemiştir (Velioğlu vd., 2017).

1.3.5. Transesterifikasyon Reaksiyonu

Yağ asidi metil esteri (YAME); bitkisel yağların metanol ile genellikle sodyum hidroksit (NaOH) ve potasyum hidroksit (KOH) gibi baz katalizörler yardımıyla transesterifikasyon reaksiyonuyla üretilir (Boz ve Sunal, 2009).



Şekil 1. 11. Transesterifikasyon reaksiyonu

İç ester değişiminde metanol kullanılırsa metil ester, etanol kullanılırsa etil ester oluşur. Transesterifikasyon işleminde daha kolay reaksiyona girmesi ve ucuz olması nedeniyle en çok metanol kullanılmaktadır.

Yine aynı şekilde katalizör olarak asit (H₂SO₄, HCl), baz (NaOH, KOH) ve biyolojik (enzim) katalizörlerde kullanılmaktadır ancak baz katalizörler asit ve biyolojik olanlara oranla hızlı olması sebebiyle daha çok tercih edilmektedir (Çildir ve Çanakçı, 2006).

1.4. Sertifikalı Referans Madde (SRM)

Maddenin özelliklerini incelemek, bileşenlerini tanımak ve ölçmek amacıyla dünyanın her yerinde analistler tarafından kimyasal ve biyolojik ölçümler yapılmaktadır. Bu ölçümler hammaddenin ve ürünlerinin kalitesinin kontrolü, üretim sürecinin takibi gibi alanlarda önemli rol oynar. Ayrıca üretim süreçlerinin izlenmesinde, üretimin çevre veya iş sağlığı üzerindeki potansiyel etkisinin kontrolünde önemli rollere sahiptirler (Wise, 2018).

Günümüzde neredeyse her şey ölçülebilir veya test edilebilir niteliktedir. Endüstrinin, ticaretin, sağlık hizmetleri sisteminin ve mevzuatın düzgün işlemesi için doğru ölçümler gereklidir. Çoğu durumda, laboratuvarlar aynı yöntemi uyguladığında bile farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bu analitik ölçümlerini doğrulanmasında en büyük pay SRM' lerindir. Referans malzemeler, farklı laboratuvarlar arasında, zaman içerisinde analitik yöntemlerin doğrulanmasında ve sonuçların doğruluğunun ve karşılaştırılabilirliğinin değerlendirilmesinde önemli role sahiptir. SRM, "bir ölçüm işleminde amaçlanan kullanımına uygun olup olmadığı tespit edilen bir veya daha fazla belirtilen özelliğe göre yeterince homojen ve kararlı bir malzeme" olarak adlandırılır (Wise, 2018).

Referans materyaller, bazı hedeflere ulaşmak için gereklidir: Yöntem doğrulama, istatistiksel kontrol durumunun izlenmesi ve ara karşılaştırmalarda ki örnekler. SRM iyi bir analitik kalite kontrolü için önemli bir araçtır.

Analitik standart kromatografik cihazların kalibrasyonu amacıyla kullanılır ve yüksek saflıktadır. Birçok laboratuvar aynı analizi yaptıkları halde farklı sonuçlar elde edebilmektedir. Bu uyumsuzlukların çözülmesi için kalite el kitabı, personel eğitimi, istatistiksel kontrollerin yanında SRM kullanımı da şarttır. SRM' ler üretim, sertifika ve depolama dahil maliyeti pahalı ürünlerdir (Lamberty vd., 1998).

SRM' lerin üretim maliyeti çok yüksektir ve kullanıcılar bunun sadece bir kısmını ödemektedir. Örneğin Avrupa Komisyonu SRM üretimi, sertifikasyonu ve fiyatların tanımlanması için şu yolları izlemektedir:

- Bir referans malzemenin fizibilite çalışması, Avrupa Komisyonu tarafından başlatılan bir teklif çağrısıyla finanse edilen bir araştırma ve geliştirme projesinin sonucudur.

• SRM adaylarının üretimi ve sertifikalandırılması, fizibilite çalışmasından elde edilen sonuçlara dayanarak, yine Avrupa Komisyonu tarafından başlatılan özel görüşmeler ile finansman altında gerçekleştirilir.

• SRM, harici bir uzmanlar kurulu tarafından resmi bir anlaşma yapıldıktan sonra onaylanır ve malzeme belirlenmiş bir fiyatla markaya konur.

• Prensipte olarak, SRM' nin satışlarından elde edilen gelir, depolamayı, devam eden herhangi bir stabilite testini ve ilk parti bittiğinde bir yedek partinin üretimini ve sertifikalandırılmasını sağlar.

Örnekler soğuk koşullarda veya özel güvenlik önlemleri alınması gereken durumlarda saklandıklarında daha pahalı olurlar. SRM ' ler sıvı formda olduklarında bu taze durumu korumak amacıyla dondurularak taşınmaktadır bu da fiyatı arttırmaktadır. Bununla birlikte, biyolojik veya önemli miktarda organik madde içeren SRM'ler, % 3 nem altına kadar kurutulurlarsa, genellikle ortam sıcaklığında saklanabilmektedir. Bu gibi sebeplerle standart fiyatı artmaktadır (Venelinov ve Quevauviller, 2003).

Ülkemizde RM ve SRM üretimi TS EN ISO 17034 standardına göre akredite olan TÜBİTAK UME tarafından üretilmektedir. Örnek olarak resimleri aşağıda verilmiştir.



Şekil 1. 12. TÜBİTAK UME tarafından üretilen RM ve SRM örnekleri

1.5. Soxhlet ekstraksiyonu

Soxhlet ekstraksiyonu, bir soxhlet aparatı içine yerleştirilmiş kartuş, soxhlet aparatı, geri soğutucu ve destilasyon balonunun bir araya gelmesi ile oluşan bir sistemdir. Destilasyon balonuna konan ekstraksiyon çözücüsü, soxhlet aparatı boyunca devamlı sifon yaptırılarak numunede ki bileşenlerin ekstraksiyonu sağlanarak, tekrar destilasyon balonunda ekstraktantın toplanması şeklindedir. Bu süre ekstraksiyonun tamamlanmasına göre değişmektedir. Genellikle aseton, kloroform, diklorometan ve eter gibi saf çözücüler kullanılmaktadır (Akdoğan, 2011).

1.6. Kromatografi

Kromatografi de temel amaç numunenin ayrımı ve miktarının belirlenmesidir. Bu yöntem ile istenen maddenin hareketli faz yardımı ile sabit faz üzerinde hareketi esasına dayanır (Eser ve Dinçel, 2018). Hareketli ve sabit faz olarak iki faz arasında dağılmış bileşenlerin durgun fazdan geçme hızına bağlı olarak ayrılmasında kullanılan metottur. Sabit faz katı veya katı destek üzerine emdirilmiş sıvıdır. Hareketli faz ise sıvı veya gazdır (Erkmen, 2019).

Tablo 1. 5. Kromatografi türleri

Uygulama biçimine göre		Ayrırma mekanizmasına göre	Hareketli faz tipine göre
Kolon kromatografisi	Düzlemsel kromatografisi	Dağılıma kromatografisi	Gaz kromatografisi
Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)	İnce tabaka kromatografisi	Adsorpsiyon kromatografisi	Sıvı kromatografisi
Gaz kromatografisi (GC)	Kağıt kromatografisi	İyon değiştirme kromatografisi	Süperkritik akışkan kromatografisi
Süperkritik akışkan kromatografisi		Afinite kromatografisi	
		Moleküler eleme kromatografisi	

Kromatografinin temel kavramları sabit faz, hareketli faz, kolon ayırma gücü ve alıkonma zamanıdır.

- Sabit faz; kolon içinde veya sabit bir yüzeye tutturulmuş faz.
- Hareketli faz; içinde analitle birlikte sabit fazın arasından geçen faz.
- Alıkonma zamanı (t_R); numune enjeksiyon edildikten sonra analit pikinin detektöre ulaşmasında geçen zaman.
- Kolon ayırma gücü(R_s); iki analiti kolonun ayırmasının bir ölçüsüdür (Akdoğan, 2011).

Faz tiplerine göre sınıflandırılması;

1. Sıvı Kromatografisi **a-** Sıvı / katı kromatografisi (LSC)
 b- Sıvı / sıvı kromatografisi (LLC)
2. Gaz Kromatografisi **a-** Gaz / katı kromatografisi (GSC)
 b- Gaz / sıvı kromatografisi (GLC) (Yalçın vd., 2004).

1.6.1. Gaz Kromatografisi -Kütle Spektroskopisi (GC-MS)

GC- MS iki analitik cihazın birleşimidir. Karışımdaki bileşenlerin kimliklerinin doğrulanması gaz kromatografisi, bilinmeyen maddelerde kimlik tespitinin yapılması da kütle spektroskopisi ile yapılır (Özkan, 2017). Genellikle GC’ de yağ asitleri metil ester türevi olarak analiz edilir (Başı, 2016).

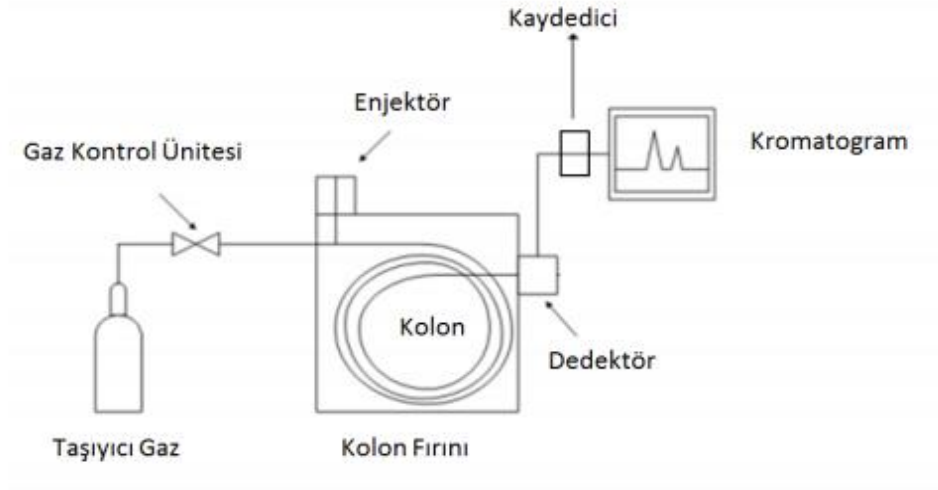


Şekil 1.13. Kullanılan GC- MS cihazı

1.6.2. Gaz Kromatografisi

GC, analitin gaz haldeki taşıyıcı faz ve bir katının yüzeyine tutturulmuş sabit sıvı faz arasında dağılımı üzerine kurulmuş bir ayırma tekniğidir. GC altı kısımdan oluşur;

- Taşıyıcı gaz sağlayıcı ve kontrol kısmı,
- Enjektör bloğu,
- Kolon ve fırın,
- Detektör,
- Sinyal işleyici
- Bilgisayar (Akdoğan, 2011).



Şekil 1.14. Bir GC cihazı şeması

1.6.2.1. Taşıyıcı Gaz

Hidrojen, helyum, azot gibi inert bir gaz olmalıdır. Taşıyıcı gaz kullanmadan önce GC kolonundaki sabit faza zarar vereceği için oksijen, su ve hidrokarbonlar; nem ve oksijen ayırıcı yardımıyla uzaklaştırılmalıdır (Braithwaite ve Smith, 1999).

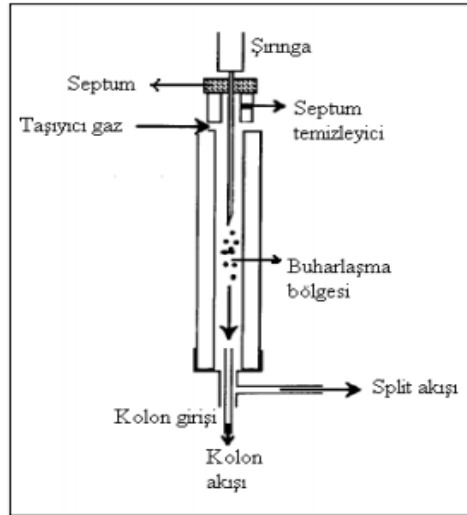
Taşıyıcı gaz;

- Toksik olmamalı

- Ucuz olmalı
- Ayrımdan sonra kolay uzaklaştırılabilmeli
- Ayrılacak maddelerle reaksiyona girmemelidir (URL 1).

1.6.2.2. Enjeksiyon Sistemi

Kromatografik analizin ilk aşamasıdır. Bu aşamada numune kolona tek seferde uygun miktarda verilmeli ve detektöre analitin tamamı ulaşmalıdır (Tandoğan, 2012). Numune yavaş verilirse pikin genişlemesine ve ayırma gücünün düşmesine neden olmaktadır (Özkan, 2017).



Şekil 1. 15. Gaz kromatografisi enjeksiyon bloğu

1.6.2.3. Kolon ve Fırın

Kolon, sıcaklığı programlanabilir kolon fırını içinde yer alır. Ayrım süresince fırın sıcaklığı dakika da 4 ile 20 °C arasında düzenli şekilde artmaktadır. Sonuçta yüksek kaynama noktası ile sabit faz bileşenler başarılı bir şekilde ayrılır. GC-MS kullanımında dolgulu ve kapiler kolon kullanılmaktadır. En sık kullanılan kolon ise kapiler kolondur. GC-MS’de 0,25 mm iç çaplı kolonlar daha çok kullanılır (Özkan, 2017).

Kapiler kolonlar bakır, çelik ve camdan üretilmekte fakat günümüzde silikadan üretilen kolonların kullanımı yaygındır. Metal kolonların kullanımından analitlerin reaksiyona girebilmesi nedeniyle kullanımından kaçınılmalıdır (Tandoğan, 2012).

Durgun fazlar ise düşük uçuculuk, termal kararlılık, inertlik, uygun alıkonma ve seçicilik faktör değerlerini verebilecek çözücü özelliklerine sahip olmalıdır. Durgun sıvı faz için dimetil siloksan, polietilen glikol, fenil-polidimetil siloksan, siyanopropil-polidimetil siloksan ve trifloropropil-polidimetil siloksan fazları kullanılmaktadır (Akdoğan, 2011).

1.6.2.4. Dedektör

Numune kolondan taşıyıcı gaz ile elde edilirken ayrılan analitler için sinyal üreterek sinyal işleyiciye aktarmaktadır. Dedektörler duyarlı, kararlı, 400 °C ye kadar sıcaklıkta çalışabilir, güvenilir, hata verimi az, kullanımı kolay olmalı ve numuneyi parçalamamalıdır (Akdoğan, 2011).

GC' de kullanılan dedektörler şunlardır:

- Alev iyonlaştırma dedektörü (FID)
- Elektron yakalama dedektörü (ECD)
- Termal iletkenlik dedektörü (TCD)
- Azot-fosfor dedektörü (NPD)
- Alev fotometrikdedektör (FPD)
- Foto iyonlaştırma dedektörü (PID)
- Kütle spektrometre (MS) (Akdoğan, 2011).

Ayrımı yapılan bileşenlerin tanınmasında kütle spektrometresi kullanılır. FID dedektör de ise hesaplanması yapılır. (Tandoğan, 2012).

1.6.2.5. Kromatogramlar

Kolon çıkışındaki çözünen maddeyi anlamaya yarayan detektörün verdiği sinyalin zamana karşı grafiğe geçirilmesiyle pik elde edilir. Bu grafiğe kromatogram denir. Karışımdaki her madde için ayrı pik vardır. Bu piklerin oluşma zamanları hangi bileşen olduğunu anlamamızı, pikin alanı da bulunan bileşenin miktarını bilmemizi sağlar (Özkan, 2017).

1.6.3. Kütle Spektrometresi (MS)

Kütle spektroskopisinin çalışma prensibi gaz fazındaki iyonların kütle/yük oranına göre ayrılarak tespit edilmesine dayanmaktadır. Bir kütle spektrometresi beş kısımdan oluşur; numune girişi, iyon kaynağı, kütle analizörü, dedektör ve veri kayıt sistemi (Tandoğan, 2012). Ayrımı yapılan bileşenlerin tanınmasında, kimlik tespitin yapılmasında kullanılmaktadır (Erkmen, 2019).

1.7. Kristallendirme ve Metil Esterlerin Ayrımı

Ayırma ve saflaştırma yöntemleri; ekstraksiyon, distilasyon, kristalizasyon, kromatografi, HPLC. Saf olmayan organik bileşiklerin saflaştırılması genellikle uygun çözücülerle kristallendirilerek yapılır (Yalçın vd., 2004). Yağ asitleri konsantrelerini serbest yağ asitleri olarak elde etmek için en etkili ve en basit ayırma yöntemi, çözücülerden fraksiyonel kristalizasyondur (Japır vd., 2018).

Kristalizasyon da kullanılabilen çözücüler; su, eter, aseton, kloroform, metanol, karbontetraklorür, etilasetat, etanol, benzen, petrol eteridir. Yanıcı özellikteki çözücülerini kullanırken su banyosu kullanılmalıdır (Boz ve Sunal, 2009). Metanolden fraksiyonel kristalizasyon, düşük maliyeti, kolay işlenmesi ve metanolü geri dönüştürme kabiliyeti nedeniyle avantajlıdır. Yağ asitlerinin çözünürlükleri, kaynama noktaları ve yoğunlukları birbirine benzerdir bu yüzden yüksek saflıklara ulaşmak için ayırmanın kolay bir temeli yoktur. Bu sebeple, bir yağ asidi karışımının solvent kristalizasyonu kullanılarak iki fraksiyona ayrılması, bunların metanol, etanol ve aseton gibi organik solventlerin bir karışımı içindeki çözünürlüklerindeki farklılığa dayanır (Japır vd., 2018).

Kristallendirme tekniği; kimyasal bileşik uygun çözücü ile kaynama noktasına kadar ısıtılır. Soğumadan önce hızlıca süzülmelidir. Süzme işleminde genellikle süzgeç kağıdı ve geniş kısa boyunlu bir huni kullanılır. Süzülen çözelti saat camı ile kapatılarak soğumaya bırakılır (Yalçın vd., 2004).

Yağlı faz transesterifikasyon reaksiyonuna girdikten sonra doymuş ve doymamış yağ asitlerini uzaklaştırmak için kristalizasyona tabi olan metil esterleri verir. Metanolden kristalizasyon yoluyla yağ asitlerinin ayrılması, yağ asitleri karışımının çeşitli bileşenleri arasındaki çözünürlük farklılıklarına bağlıdır (Elkacmi vd., 2016).

1.8. Önceki Çalışmalar

Ersungur (2008); kolza tohumu yağı %22- 60 erusik asit içerdiği bilinmektedir. Erusik asidi fazlaca içeren yağlar, çeşitli kardiyolojik hastalıklara yol açmaktadır ve kalpte yağ birikmesine de neden olmaktadır. Bu nedenle kolza yağındaki erusik asit içeriği tohuma uygulanan genetik modifikasyonlar ile %5'in altına düşürülmüştür.

Klassen vd.(1987); yapılan çalışmalar tüketilen erusik asit ile miyokardiyal yağlanma arasında ilişki olduğunu göstermektedir. Miyokardiyal yağlanmanın kalp kasılma gücünü azaltmakta olduğu bilinmektedir.

Klassen vd. (1987); Kolza yağındaki erusik asidin verdiği miyokardiyal hastalıklar yüzünden kolza ıslahı önem kazanıp, yarım tohum tekniği ve geri melezleme yöntemi ile oleik asitçe zengin erusik asitçe fakir kanola yağı geliştirilmiştir.

Tosun ve Özkal (2000); WHO tarafından, erusik asit miktarı için standartlar oluşturulmuştur. FDA' da da gıdalarda bulunabilecek erusik asit miktarları için düzenlemeler yapılmış, özellikle de kanola ve kolzayağlarındaki erusik asit miktarıyla ilgili kısıtlamalar belirlenmiştir. WHO tarafından erusik asit miktarı; 1982 yılına kadar yemeklik yağlarda % 10, 1982 yılından sonra ise % 5 olarak belirlenmiştir. Hatta yeni doğan bebek mamalarında erusik asit varlığına izinverilmemektedir.

EFSA (2016) ; EFSA yem ve gıdalardaki erusik asit miktarı için 2016 yılında bir risk değerlendirmesi yayınlamıştır. Erusik asit için tolere edilebilir günlük alımı 7 mg/kg olarak belirlenmiştir.

Karabaş (2013); Aspir kurak alanlarda yetişebilen tek yıllık bir bitkidir. Kullanım alanı oldukça geniş olup; boya, vernik, yağ, yem ve ilaç sanayi gibi alanlarda kullanılabilir. Ülkemizde 1929' dan beri yağ bitkisi olarak yetiştirilmektedir.

Venelinov (2003); Hergün, kimyasal ve biyolojik ölçümler, maddenin özelliklerini incelemek ve maddenin bileşenlerini daha iyi tanımlamak ve ölçmek amacıyla dünyanın dört bir yanındaki laboratuvarlarda çok sayıda analist tarafından yapılmaktadır. Örneğin, hammaddelerin ve ara ve nihai ürünlerin kalitesinin kontrol edilmesine katkıda bulunurlar. Ayrıca, üretim süreçlerinin izlenmesinde, üretimin çevre veya iş sağlığı hizmetleri üzerindeki potansiyel etkisinin kontrolünde vb. kilit rollere sahiptirler.

Pasini vd. (1992); diyetdeki yüksek erusik asitle beslenme sonucunda; kalp kasındaki kasılma düzeninin azaldığını, trigliserid ve serbest yağ asitinin kan düzeylerinin arttığını ancak propionil-L-carnitine verilerek kardiyak toksisitenin engellenebileceği görülmüştür.

Salaviya vd. (2014); Süperkritik metanol kullanımının, katalizörü olmayan, transesterifiye ürünlerin çok daha basit saflaştırılmasını içeren, reaksiyon süresinin daha düşük olduğu, daha çevre dostu ve daha düşük enerji kullanımı gerektiren bir süreç olduğunu bildirdi.

Salaviya vd. (2014); Sabun yağ asitleri metil esterlerini saflaştırma ve katalizör giderimini zorlaştırmaktadır. Klasik homojen katalizör kullanımının daha yüksek verim kaybına neden olduğu sonucuna varılmıştır. Sabunlaşma yoluyla olduğu kadar, sabun oluşumundan kaynaklanan karmaşık ayırma işleminden de kaynaklanmaktadır.

Japır vd. (2018); Adsorpsiyon kromatografisi, enzimatik ayırma, moleküler distilasyon, düşük sıcaklıkta kristalizasyon, üre kompleksleşmesi ve çözücülerden fraksiyonel kristalizasyon gibi değişen verimlere sahip bir yağ asidi karışımını ayırmak için çeşitli yöntemler bildirilmiştir. Bununla birlikte, yağ asidi konsantrelerini serbest yağ asitleri olarak elde etmek için en etkili ve en basit ayırma yöntemi, çözücülerden fraksiyonel kristalizasyondur. Bu, hurma yağlı asit karışımının bileşiminin bir parçası olan laurik asit ve miristik asit gibi tekli doymamış ve çoklu doymamış yağ asitlerini ve doymuş yağ asitlerini uzaklaştırmak için iyi bilinen bir tekniktir. Metanolden fraksiyonel kristalizasyon, düşük maliyeti, kolay işlenmesi ve metanolü geri dönüştürme yeteneği nedeniyle avantajlıdır.

Alver vd. (2012); Mikroekstraksiyon teknikleri klasik ekstraksiyon yöntemleri ile karşılaştırıldıkları zaman: toksik ve pahalı ekstraksiyon sıvılarının kullanımını en aza indirmeleri, ekstraksiyondan alınan örneğin doğrudan analitik cihaza verilebilmesi, ekonomik olması, birçoğunda hassas, doğru ve hızlı sonuçlar elde edilebilmesi, fazladan ekstraksiyon adımlarına gerek duyulmaması gibi bir çok avantajlara sahiptirler.

Akdoğan (2011); Örnekler analit dışında birçok bileşen içerdiği için cihaz kalibrasyonu dahil birçok etki etmektedir. Bu nedenle HPLC, GC- MS, GC gibi cihazlarda yapılan analizlerden önce örnek hazırlama tekniklerine başvurulmalıdır.

1.9. Çalışmanın amacı

Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliğine göre erusik asit bulunma ihtimali olan gıdalarda erusik asit analizinin yapılması gerekmektedir. Erusik asit tayini GC- MS/ FID cihazında veya TLC ile analizleri yapılırken laboratuvarlarda analitik standardına ihtiyaç vardır. Analitik standart kromatografik ölçüm cihazlarının kalibrasyonu amacıyla kullanılan yüksek saflıkta ki ürünlerdir. Bu standartlar hem çok maliyetli hem de

Ülkemizde yurtdışından alınmaktadır. Yurtdışına bağımlılığı da önlemek adına erusik asit tayini için kullanılacak erusik asit metil esterinin analitik standart olarak doğal kaynaklar kullanılarak üretimi bu tezin amacıdır. Bu alışma, ülkemizde erusik asit bulunma ihtimali olan gıdalarda bu asidin analizinin yapılması amacıyla kullanılabilecek olan bir analitik standardın doğal kaynaklardan üretimini amaçlamaktadır. İnsan sağlığı açısından tehlikeli bir konuma sahip olan erusik asitçe zengin yağ ve yağ ilave edilmiş gıdaların tespiti için analizin yapılması gerekmektedir. Bu çalışmayla bu analizde kullanılabilecek olan referans malzeme, analitik standardın yerli olarak üretimi istenen sonuçtur. Doğal kaynak olarak hardal yağı, sarı hardal, siyah hardal ve aspir tohumu kullanılacak olması ile bu çalışma literatüre yeni bir katkı yapmış olacaktır.

1.10. Çalışmanın Kapsamı

28157 sayılı resmi gazete de yayınlanan Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği bölüm 7 de erusik asidin limiti verilmiştir. Bu nedenle de bu analitin riskli gıdalarda analizlerinin yapılması zorunludur. Erusik asit ile ilgili çeşitli analiz metodu bulunmaktadır. Tezin alışma konusu erusik asitle ilgili analitik standardın geliştirilmesi ve üretimidir. Geliştirilecek ve üretimi yapılacak olan bu standart ile katı ve sıvı yağlar, % 5 den fazla yağ içeren gıdalar ve erusik asit bulunma riski olan gıdalar da erusik asit tayini metodunda üretimi yapılacak olan referans materyal standardının kullanılması kapsamaktadır. Ayrıca tez kapsamında SRM' lerin yapısında bulunması zorunlu olduğu için diğer yağ asiti metil esterleri de belirlenmektedir. Erusik asit bulunma riski olan gıdalarda erusik asit tayini kapsamı olan bu çalışma erusik asidin eş zamanlı olarak tayini ve doğrulanması analizi ile ilgili olan standardın ülkemizde üretilmesi amacıyla geliştirilecek olan bu çalışmayla ilgilidir.

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Yağ Ekstraksiyonu

Analiz sırasında sıvı yağ halinde bulunan (Aspir, hardal ve kanola) numuneler işlem gerektirmeden direkt olarak kullanıldı. Tohum numuneleri (Aspir, sarı ve siyah hardal, latin çiçeği) ise Waring Commercial marka 38BL70 model temiz bir öğütücü de ekstraksiyon işlemi için homojen hale getirildi. Homojen numuneler hassas terazide 5 g kadar tartılarak süzgeç kağıdı ile sarıldı ve Soxhlet kartuşuna yerleştirildi. Üzerleri de hidrofil pamuk ile kapatıldı. Ekstraksiyon balonu 103 °C de 2 saat tutuldu ve desikatörde soğutularak darası alındı. Kartuşlar ekstraktöre yerleştirildi ve üzerine petrol eteri koyuldu. Bir kez sifon yaptırılıp yarısına kadar tekrar petrol eteri ilave edildi. Cam balon ve ekstraktör Soxhlet cihazına yerleştirildi ve 6 saat boyunca ekstraksiyon işlemi uygulandı. İşlem sonunda ekstraktörde biriken çözücü alındı ve kartuşlar temizlendi. 103 °C de cam balonda kalan çözücü uzaklaştırılıp ham yağ elde edilmesi için etüve konuldu. Daha sonra sabit ağırlığa gelene kadar desikatörde bekletildikten sonra ham yağ miktarı hesaplandı. Bütün tohum numunesi için bu işlem tekrar edildi (ISO 736, 1977).



Şekil 2. 1. Tohum yağlarından yağ eldesi için Soxhlet ekstraksiyon düzeneği

2.2. Numunelerde Erusik Asit ve Diğer Yağ Asitleri Miktarlarının Bulunması, erusik asit tayini

Çalışma da erusik asidi saflaştırmak için kullanılan numunelerin tüm yağ asitleri kompozisyonunu tespit etmek için önce 100 mg yağ numunesi ağzı kapaklı tüp içine tartıldı. Üzerine 5 mL n-hekzan ilave edildi. Yağ çözeltisine 100 µL 2M metanollü KOH ilave edildi ve 5 dk karıştırıldı. Daha sonra karışım 10 dk 3000 rpm' de santrifüj edildi. Son olarak üst kısımdan viallere alınarak GC-MS/FID cihazında analiz edildi. (Erkmen, 2019).

2.2.3. GC-MS/FID Cihazının Kromatografik Çalışma Şartları

2.2.3.2. İnlet şartları

Sıcaklık	: 250 °C
Basınç	: 21.231 psi
Toplam Akış	: 42.398 mL/dk
Enjeksiyon Hacmi	: 1 µL
Split Oranı	: 1:20

2.2.3.3. Kolon Şartları

RESTEK Rtx-2330 kolon (fusedsilica) 30 mm x 0,25 mm x 0,2 µm (Cat. No 10723, Seri no 1081624) veya başka uygun ayırım imkanı veren kapiller GC kolonu ya da muadili kullanıldı.

Akış Hızı	: 1.8761 mL/dakika
Basınç	: 21.231 psi
Akış durumu	: Sabit basınç

2.2.3.4. Kolon Fırın Programı

Kolon başlangıç sıcaklığı 50 °C' de 1 dk bekletildi. Sonra kolon sıcaklığı dakikada 25 °C artışlarla 200 °C' ye çıkıldı ve bu sıcaklıkta 1 dk bekletildi. Daha sonra kolon sıcaklığı dakika da 3 °C' lik artışla 230 °C' ye çıkarılarak bu sıcaklıkta 10 dk beklendi.

Dolayısıyla toplam program süresi 45 dakika sürdü. Alternatif bir kolonun kullanılması durumunda programda yeterli kromatografik ayırımı sağlayabilmek için farklı bir sıcaklık programlaması da yapılabilir.

2.2.3.5. Detektör Şartları

FID sıcaklığı	: 280 °C
H ₂ akış hızı	: 40 mL/dk
Hava akış hızı	: 450 mL/dk
Make-up helyum akış hızı	: 25 mL/dk

2.2.3.6. MS Detektör Şartları

MS quad	: 150 °C
MS source	: 230 °C
Aux-2 sıcaklığı	: 230 °C
Solvent delay	: 4.25 dk

2.2.3.7. Yağ Asitleri Miktarlarının Hesaplanması

Genel olarak yağ asitlerinin tanımlamaları uluslararası kullanılan YAME referans standartları ve referans hidrojene yağ örnekleri ile karşılaştırılarak tanımlanır. YAME ve referans yağ örneklerindeki yağ asitlerinin alıkonma zamanları temel alınarak aynı şartlarda çalışıldığından bu şekilde tanımlama yapıldı.

Bilinmeyen pikler gözlendiğinde, GC/MS, FTIR, gümüş-iyon kromatografisi ve klasik kimyasal yöntemler gibi uygun prosedürler kullanılarak tanımlanmalıdır. Bilinmeyen piklerin kimliğinin yağ asitleri olduğu doğrulanmadıkça, yağ asidi bileşimini hesaplarken pik alanlarının toplamına dahil edilmemelidir.

Formülle verilen metil esterlerin alanına göre yüzde olarak ifade edilen her bir yağ asidi metil esterlerinin x_i alan fraksiyonu aşağıdaki formülere göre hesaplanmıştır.

$$x_i = \frac{A_i}{\sum A} \times 100 \quad (2.1.)$$

A_i = her bir yağ asidi metil esterinin alanı;

$\sum A$ = her bir yağ asidi metil esterinin tüm pik alanlarının toplamı

Çoğu yağ için, yağ asidi metil esterlerinin alan fraksiyonu, 100 g başına gram cinsinden triağılglicerollerin alan fraksiyonuna eşittir.

Yağ asitlerinin numune içindeki miktarları için önce GC-MS/FID cihazında gelen her pikin hangi yağ asidi olduğu MS detektörü ile tanımlandı. Daha sonra FID detektördeki alanlar tespit edilerek % alan cinsinden miktarları Formül 2.1 ile hesaplandı. Sonuçlar, değerler için bir ondalık basamak ile 100 g başına gram olarak ifade edildi.

2.3. Esterleştirme Çalışması

Sarı hardal ve hardal tohum yağından 100 ml alınarak 250 ml' lik şilifli balonlara konuldu. Esterleştirme reaksiyonu için katalizör olarak 0.65 g NaOH 20 ml metanol içinde çözüldü. Yağdaki nem içeriğini gidermek için biraz ısıtıldı. Çözünmüş katalizör (sodyum metoksit) yağa ilave edildi ve 60 °C' de su banyosunda 60 dk boyunca geri soğutucu altından mantet yardımıyla kuvvetlice karıştırıldı. Reaksiyon sonunda kontaminasyonu önlemek için karışıma 10-15 damla asetik asit ilave edildi. Reaksiyon karışımı bir ayırıcı huniye döküldü. 1-2 saat sonra oluşan fazlardan, ester tabakası ayrı bir behere döküldü ve yan ürünler gliserin ve sabun da ayrıldı. Ham YAME, 200 ml su kullanılarak fazla alkolden ve atık katalizörden yıkanarak arındırıldı. Bu adım üç kez tekrarlandı. Üçüncü yıkamadan sonra 30 dakika bekletildi. Son olarak, YAME, içinde susuz sodyum sülfat bulunan süzgeç kağıdından geçirilerek kurutuldu (Ahmad ve ark., 2010) .



Şekil 2. 2. Esterleştirme çalışması

2.4. Ester Verimi(%)

Çalışma üç paralel olarak gerçekleştirildi. 78.5 mL, 79.1 mL, 78.9 mL elde edildi.

$$\% Ester\ verimi = \frac{V \times 100}{Y} \quad (2.2.)$$

V= 100 mL mezürde okunan ester hacmi

Y= Esterleştirme için kullanılan yağın hacmi

2.5. Yağ Asitleri Metil Esterlerinin Tayini

Esterleşme reaksiyonundan elde edilen numuneden 100 µL alınıp 5 mL hekzanda çözüldü ve Bölüm 2.2’de belirtildiği gibi GC-MS/FID ile analiz edildi.

2.6. Kristallendirme

İlk olarak, erusik asit miktarını arttırmak için yağ asitlerinin ayrılmasında etkili faktörleri seçmek amacıyla aşağıdaki prosedür gerçekleştirildi. Bu çalışmada, hardalda düşük ve yüksek erusik asitli yağ asidi esterleri karışımının kristallenmesi, sıcaklığı kontrol etmek için bir buzdolabında uygun bir beher ile gerçekleştirildi. Yağ asidi karışımı sulu metanolden (% 95) kristalize edildi. Çözünen için, çözücü oranları 1:5, 1:15 ve 1:25 g/ mL

arasında ayarlandı. Kristallenme sıcaklıkları da -18, 0 ve 4 °C arasında değişirken, kristallenme süresi de 24 saat devam ettirildi. Sıvı - kristal karışımı, dekantasyon ile ayrıldı. Sıvı faz ile katı fazlar önce sıvı üst ve alt katı faz olarak ayrıldı. (Şekil 2.3). Bu işlem pastör pipeti yardımıyla yapıldı. Sıvı fazdan metanol su çözücüsü evaporatörde 100 mbar basınç altında ve 60 °C' de ayrıldı ve N₂ gazı altında tamamen kurutuldu. Aynı şekilde alt katı fazlar evaporatörde üste açıklanan işleme tabi tutuldu. Daha sonra, GC-MS/FID ile analiz yapıldı.

Üç adet farklı sıcaklık çalışmasından en iyi verimi sağladığı için +4 °C' de 1.0 g numune ile 25 mL % 95' lik metanol muamele edildi ve kristallenmesi için 24 saat bu sıcaklıkta tutuldu. Katı faz ile sıvı faz birbirinden bir pastör pipet yardımıyla ayrıldı. Vakum evaporatörde çözücü uzaklaştırılarak azot gazı altında kurutuldu ve alt fazın tartımı yapıldı (0.7102±0.043 g). Her iki fazın YAME kompozisyonuna 100 mg örnek alınarak 5 mLn-hexan ilave edilerek çözüldü ve Bölüm 2.2' deki gibi analiz yapıldı.

Tablo 2. 1. Kristallendirme de kullanılan sıcaklık ve çözücü parametreleri

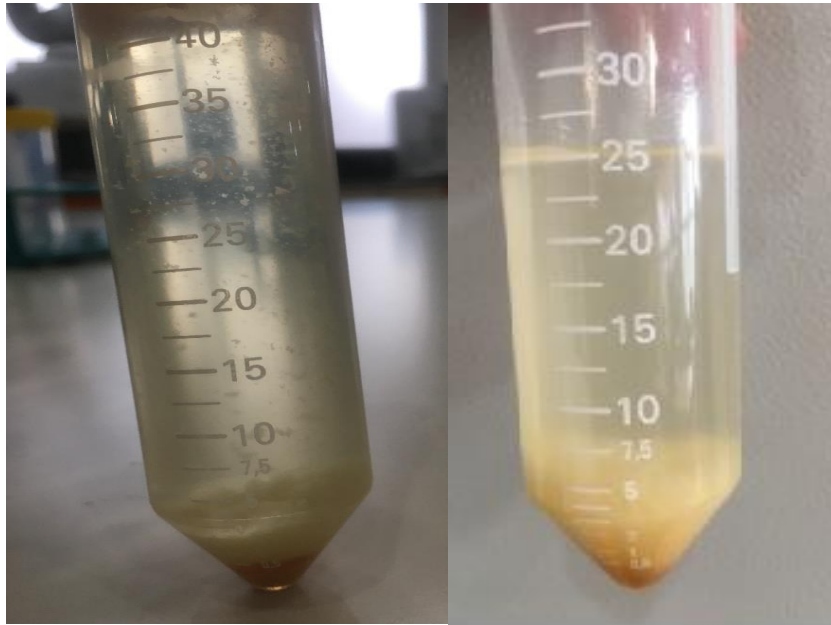
Yağ asitlerinin ayrılması için deneysel aralık ve bağımsız değişken seviyeleri				
		Değişken seviyeleri		
Bağımsız değişken	Kod	-1	0	1
YAME / MeOH oranı (w/v) (g/mL)	X ₁	5	15	25
Kristalleşme sıcaklığı (°C)	X ₂	-18	0	4

Yüksek erusik asit içeren örnekte (sarı hardal yağı) 10 adet 50 mL konik satrafüj tüplerine 1 gr YAME (% 17 civarında erusik asit) konarak üzerilerine 25 mL % 95 metanol ilave edildi. GC-MS/FID analizi sonuçlarına göre üst fazın erusik asit bakımından

fakir alt fazların ise daha zengin olduğu görüldü. İkinci kristallendirme işleminde alt fazın üzerine tekrar % 95 metanol ilavesi ile zenginleştirme işlemine devam edildi.

0.7102 g ester karışımına 25 mL % 95 metanol ilave edildi, karıştırıldı ve +4 °C de 24 saat tutuldu. Oluşan alt ve üst fazlar ayrılarak GC-MS/FID ile analiz yapıldı. Kristallendirme işlemi 5 defa tekrarlandı. Her defasında % 95 metanol ilave edilerek 24 saat +4 °C' de tutuldu. Beşinci aşamadan sonra artış olmadığından kristallendirme işlemine son verildi.

Beşinci adımda 10 adet alt faz iki adet 15 mL santrifüj tüpünde eşit miktarda toplandı. 3000 rpm' de 10 dk santrifüj edildi. Üst kısımlar bir pastör pipeti yardımıyla ayrıldı. Daha sonra 50 mL' lik dibi yuvarlak bir cam balona alınarak vakum evaporatörde 100 mbar basınç altında 60 °C' de kalan metanol ve sudan ayrıldı. Erusik asidin % 55 civarında olduğu bu metil esterleri karışımı azot gazı ile muamele edilerek tamamen kurutuldu. Metil esterleri analiz sonuçları Tablo 3.7'de verilmiştir. Toplamda ayrı ayrı 1.0 g' lık 10 adet örnekle başlanan çalışma sonunda tüm örnekler birleştirildi ve tartımı yapıldı.



Şekil 2. 3. YAME için +4 °C kristallendirme ortamında oluşan fazlar

Düşük erusik asit içerikli (hardal tohum yağı) örnekte 4 adet 50 mL konik santrifüj tüplerine 1 g metil esteri (% 6 civarında erusik asit) konarak üzerlerine 25 mL % 95 metanol ilave edildi. GC-MS/FID analizi sonuçlarına göre üst fazın erusik bakımından fakir, alt fazın daha zengin olduğu görüldü. İkinci kristallendirme işleminde alt katın üzerine tekrar % 95 metanol ile zenginleştirme işlemine devam edildi. Yaklaşık 0.7 g ester karışımına 25 mL % 95' lik metanol ilave edildi, karıştırıldı ve +4 °C de 24 saat tutuldu.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. Numunelere Ait Yağ Asidi Kompozisyonları

Bu çalışma da sarı hardal yağı, hardal tohum yağı, siyah hardal yağı, kolza yağı, aspir yağı, kanola yağı hardal yağı ve latin çiçeği tohum yağı analiz numunesi olarak kullanılmıştır. Tablo 3.1. numuneler analizi sonucunda tespit edilen yağ asitleri kompozisyonu bakıldığında;

Sarı hardal için yağ asidi kompozisyonları incelendiğinde en yüksek orana oleik asit % 29.24 ve linoleik asit % 25.97 sahip olduğu, erusik asidin ise % 17.90 seviyesinde kaldığı tespit edilmiştir.

Hardal tohumu yağında % 50.48 ile linoleik asit en yüksek bulunurken, erusik asit % 6.11 olarak belirlenmiştir.

Tablo 3.1'den siyah hardal yağının yağ asidi kompozisyonları değerlendirildiğinde, en yüksek oranın % 29.49 ile erusik aside ait olduğu, onu % 16.98 ile oleik asidin takip ettiği görülmektedir. Tüm numuneler arasında en yüksek erusik asit miktarı da siyah hardal yağına aittir.

Kolza yağında erusik asit miktarı % 0.40 iken en yüksek yağ asidi oleik asittir ve miktarı da % 62.69 dur.

Aspir yağı ve kanola yağında bulunan erusik asit miktarı % 0.01 dir ve en az bu numunelerde çıkmıştır. Bu yağlar yemeklik yağ olarak tüketilebilmektedir. Aspir yağında linoleik asit %74.21, kanola yağında ise oleik asit % 58.83 miktarı en fazladır.

Hardal yağında ise erusik asit miktarı % 15.25' dir. Erusik asidi linoleik asit % 34.60 ve oleik asit % 26.58 takip etmektedir.

Latin çiçeği tohum yağında ise erusik asit miktarı % 71.04 olarak bulundu.

Bu verilere bakarak erusik asit en fazla siyah hardal yağı % 29.49 ve sarı hardal yağında % 17.90 çıkarken en az aspir % 0.01 ve kanola % 0.01 yağındadır. Numunelerimiz arasında en yüksek oleik asit miktarı % 62.69 kolza yağında en yüksek linoleik asit % 74.21 miktarı ise aspir yağında bulunmuştur.

Çalışmamızda zenginleştirme işlemi için sarı hardal yağı ve hardal tohumu yağını kullandık. Diğer örneklerin; yani latin çiçeği, siyah hardal, kolza yağının miktarları yeterli değildi.

Tablo 3.1. Çalışılan numunelere ait yağ asidi kompozisyonları (%)

	Sarı Hardal Yağı	Hardal Tohum Yağı	Siyah Hardal Yağı	Kolza Yağı	Aspir Yağı	Kanola Yağı	Hardal Yağı	Latin Çiçeği Tohum Yağı
Palmitik asit(C16:0)	3.44 ±0.02	5.91 ±0.03	3.99 ±0.05	4.65 ±0.01	6.23 ±0.02	3.93 ±0.02	4.99 ±0.02	2.25 ±0.44
Palmitiloik asit (C16:1)	0.01 ±0.00	0.01 ±0.00	0.14 ±0.01	0.18 ±0.00	0.01 ±0.00	0.19 ±0.03	0.13 ±0.00	- -
Stearik asit (C18:0)	1.82 ±0.01	2.78 ±0.01	1.59 ±0.02	1.75 ±0.01	2.32 ±0.00	1.95 ±0.04	2.42 ±0.00	- -
Oleik asit (C18:0)	29.24 ±0.07	27.97 ±0.08	16.98 ±0.10	62.69 ±0.00	16.35 ±0.03	58.83 ±0.02	26.58 ±0.03	5.57 ±0.03
Linoleik asit (C18:2)	25.97 ±0.03	50.48 ±0.10	15.50 ±0.06	19.17 ±0.00	74.21 ±0.03	23.53 ±0.08	34.60 ±0.02	3.77 ±0.88
Linolenik asit (C18:3)	11.76 ±0.09	2.10 ±0.01	14.60 ±0.10	8.94 ±0.01	0.22 ±0.01	10.10 ±0.02	7.75 ±0.26	0.61 ±0.16
Linolelaidik asit (C18:2)	0.01 ±0.00	0.18 ±0.02	0.01 ±0.00	0.01 ±0.00	0.01 ±0.00	0.01 ±0.00	0.01 ±0.00	- -
Araşidik asit (C20:0)	0.01 ±0.00	0.35 ±0.02	0.01 ±0.00	0.52 ±0.00	0.32 ±0.01	0.01 ±0.00	0.01 ±0.00	- -
Eikosenik asit(C20:1)	7.16 ±0.05	2.82 ±0.04	14.30 ±0.04	1.30 ±0.00	0.01 ±0.00	0.82 ±0.00	7.00 ±0.04	16.41 ±1.26
Eikosadienik asit (C20:2)	0.63 ±0.01	0.01 ±0.00	0.86 ±0.01	0.07 ±0.00	0.01 ±0.00	0.01 ±0.00	0.43 ±0.00	- -
Behenik asit (C22:0)	0.70 ±0.01	0.74 ±0.02	1.10 ±0.01	0.27 ±0.00	0.20 ±0.01	0.20 ±0.02	0.88 ±0.01	- -
Erusik asit (C22:1)	17.90 ±0.09	6.11 ±0.13	29.49 ±0.34	0.40 ±0.00	0.01 ±0.00	0.01 ±0.00	15.25 ±0.21	71.04 ±3.43
Lignoserik asit (C24:0)	0.32 ±0.01	0.24 ±0.01	0.28 ±0.03	0.01 ±0.00	0.01 ±0.00	0.01 ±0.00	0.01 ±0.00	- -
Nervonik asit (C24:1n-9)	0.83 ±0.02	0.22 ±0.01	0.77 ±0.00	0.01 ±0.00	0.01 ±0.00	0.01 ±0.00	0.01 ±0.00	- -

3.2. YAME Çalışmalarına Ait Bulgular

Bölüm 2.3.' de yapılan esterleştirme çalışmalarında hem yüksek erusik asit içerikli (sarı hardal yağı) hemde düşük erusik asit içerikli örnekten (hardal tohum yağı) 3' er paralel çalışılmıştı. Yüksek erusik asit içerikli örnekten elde edilen verimler sırasıyla YN1, YN2 ve YN3 için % 78.5, % 79.1 ve % 78.9 olarak bulundu. Düşük erusik asit içerikli örnekten elde edilen verimler ise sırasıyla DN1, DN2 ve DN3 için % 77.4, % 78.3 ve % 77.5 olarak tespit edildi. YN ve DN kodlu numunelere ait YAME miktarları da Tablo 3.2'de verilmiştir. YAME içerisinde erusik asit değerleri YN için ortalama % 19.19 ve DN için % 6.87 olarak bulundu. Diğer YAME değerleri de ayrıca Tablo 3.2'de verilmiştir.

Tablo 3.2. Düşük ve yüksek erusik asitli numunelerden elde edilen YAME kompozisyonları(%)

	YN1	YN2	YN3	Ȫ	DN1	DN2	DN3	Ȫ
Palmitik asit(C16:0)	5.59	4.61	4.54	4.91	6.56	5.91	6.59	6.35
Palmitoleik asit (C16:1)	0.12	0.11	0.11	0.11	0.08	0.01	0.11	0.07
Stearik asit (C18:0)	2.51	2.36	2.29	2.39	2.96	2.78	2.93	2.89
Oleik asit (C18:0)	26.08	25.26	24.91	25.42	28.32	27.97	28.30	28.20
Linoleik asit (C18:2)	33.37	31.06	32.27	32.23	48.11	50.48	48.22	48.94
Linolenik asit (C18:3)	6.51	6.53	7.09	6.71	1.97	2.10	1.93	2.00
Linolelaidik asit (C18:2)	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.18	0.18	0.12
Araşidik asit (C20:0)	0.57	0.57	0.56	0.57	0.37	0.35	0.38	0.37
Eikosenik asit(C20:1)	6.34	6.97	6.69	6.67	2.85	2.82	2.91	2.86
Eikosadienik asit (C20:2)	0.42	0.38	0.42	0.41	0.17	0.01	0.01	0.06
Behenik asit (C22:0)	0.83	1.01	0.94	0.93	0.88	0.74	0.92	0.85
Erusik asit (C22:1)	17.29	20.56	19.71	19.19	7.34	6.11	7.15	6.87
Lignoserik asit (C24:0)	0.39	0.56	0.48	0.48	0.39	0.24	0.41	0.35

YN: Yüksek erusik asitli örnek, DN: Düşük erusik asitli örnek

Madde 2.3.' de yapılan esterleştirme çalışmalarında düşük erusik içerikli örnekten (hardal tohum yağı) 3 adet numune çalışıldı. Bu çalışmadan elde edilen verimler sırasıyla DN1, DN2 ve DN3 için % 77.4, % 78.3 ve % 77.5 olarak bulundu. Numunelere ait YAME

miktarları Tablo 3.2’ de verilmiştir. Erusik asit miktarı YAME içerisinde ortalama % 6.87 olarak bulundu. Diğer YAME’ lere ait miktarlar tabloda görülmektedir.

3.3. Yüksek Erusik Asitli Numune İçin YAME Kristallendirme Çalışmalarına Ait Bulgular

Bu çalışmada, sarı hardal yağ asidi metil esterleri karışımının (YAME) kristallendirilmesiyle elde edilen doymuş yağ asitlerinin (katı fraksiyon) metanollü karışımdan kristalleşmeyi gerçekleştirmek için aynı deneysel çalışma koşulları altındametanol oranı (g/mL, X1) ve sıcaklık (°C, X2) olmak üzere iki bağımsız değişken belirlenmiştir. Bu faktörlerin kodları ve aralığı Tablo 3. 3'de gösterilmiştir.

Tablo 3. 3. -18, 0 ve +4 °C’ de yapılan kristallendirme çalışmalarına ait YAME verileri

Parametre	Palmitik Asit (C16:0)	Palmitoleik Asit (C16:1)	Stearik Asit (C18:0)	Oleik Asit (C18:1)	Linoleik Asit (C18:2)	Linolenik Asit (C18:3)	Araşidik Asit (C20:0)	Eikosenik Asit (C20:1)	Eikosadienik Asit (C20:2)	Behenik Asit (C22:0)	Erusik Asit (C22:1)	Lignoserik Asit (C24:0)
0°C 1:5 Üst	5.42	0.22	1.81	25.88	43.94	12.21	0.01	3.55	0.01	0.18	6.41	0.01
0°C 1:5 Alt	4.47	0.11	2.39	24.85	29.57	6.22	0.01	7.26	0.01	1.11	22.99	0.51
0°C 1:15 Üst	5.89	0.12	1.95	28.96	38.9	8.84	0.01	5.56	0.01	0.01	9.78	0.01
0°C 1:15 Alt	4.58	0.06	2.81	25.18	24.65	4.01	0.69	8.81	0.01	1.23	27.59	0.01
0°C 1:25 Üst	4.36	0.11	2.53	26.75	35.06	5.73	0.67	5.36	0.46	1.26	13.92	0.6
0°C 1:25 Alt	3.70	0.07	2.67	21.83	22.05	4.03	1.02	8.65	0.44	2.29	31.97	1.25
4°C 1:5 Üst	5.27	0.16	1.89	26.39	41.16	10.77	0.25	4.25	0.39	0.25	9.13	0.07
4°C 1:5 Alt	5.03	0.16	2.18	26.85	35.65	8.14	0.32	6.06	0.43	0.38	14.73	0.07
4°C 1:15 Üst	5.81	0.12	2.02	29.08	38.58	7.44	0.19	6.78	0.01	0.01	9.98	0.01
4°C 1:15 Alt	4.67	0.05	3.01	25.02	24.51	3.97	0.71	8.53	0.01	1.28	27.87	0.41
4°C 1:25 Üst	5.09	0.13	2.19	27.08	36.25	8.17	0.01	5.93	0.46	0.24	14.22	0.06
4°C 1:25 Alt	3.76	0.06	2.66	21.85	21.46	3.78	0.95	8.72	0.4	2.46	32.58	1.28
-18°C 1:5 Üst	2.45	0.21	0.31	26.83	46.25	12.67	0.01	3.56	0.63	0.01	7.10	0.01
-18°C 1:5 Alt	4.75	0.11	2.55	24.77	29.22	6.06	0.63	7.18	0.56	1.34	22.16	0.63
-18°C 1:15 Üst	2.41	0.2	0.01	28.33	44.03	11.53	0.01	4.29	0.42	0.01	8.77	0.01
-18°C 1:15 Alt	5.31	0.08	3.04	23.91	25.83	4.77	0.81	7.84	0.42	1.53	25.65	0.79
-18°C 1:25 Üst	2.69	0.16	0.61	28.91	41.97	10.11	0.01	5.19	0.45	0.01	9.91	0.01
-18°C 1:25 Alt	5.91	0.07	3.69	22.08	21.97	3.81	1.06	8.14	0.43	1.68	29.88	0.79

Erusik asidin diğer asitlerden ayrılması, Tablo 3.3 'de belirtildiği gibi belirli ayırma koşulları altında hardal yağ asidi metil esterleri karışımının (YAME) metanol de kristalizasyon seçilerek gerçekleştirilmiştir. Ayırma, yağ asitleri karışımının çeşitli bileşenleri arasındaki çözünürlük farkına bağlıdır. -18, 0 ve +4 °C’ de yapılan kristallendirme çalışmaları sonucunda elde edilen YAME değerleri Tablo 3. 3’ de verilmiştir.

Daha yüksek doymuş yağ asitlerinin benzer doymamış yağ asitlerinden çok daha az çözünür olduğu uzun zamandır bilinmektedir. YAME’ nin bu çözünürlük davranışı, karışım içeriğinin polaritesi ve hidrojen bağı oluşturma özellikleri dikkate alınarak açıklanabilir (Japır vd., 2018). Bir yağ asidi olarak, stearik asit ve palmitik asit gibi uzun zincirli doymuş yağ asitleri nispeten polar olmayan bileşiklerdir. Ancak, daha kısa zincirli laurik asit ve miristik asit gibi yağ asitleri stearik ve palmitik aside kıyasla daha polardır. Sonuç olarak, metanolde oleik asit, linoleik asit ve linolenik asidin yüksek çözünürlükleri nedeniyle ayrılma meydana gelebilmiştir (Tablo 3.3, 3.4, 3.5, 3.6 ve 3.7).

Tablo 3. 4. Birinci zenginleştirme sonucunda elde edilen yağ asitleri metil esterleri miktarları (Yüksek)

	Örnek (Saflaştırmada kullanılan)		Alt Faz (Kristal kısım)		Üst Faz (Çözelti kısmı)	
Palmitik asit(C16:0)	5.59	±0.22	4.86	±0.03	5.67	±0.03
Palmitoleik asit (C16:1)	0.12	±0.02	0.08	±0.01	0.21	±0.01
Stearik asit (C18:0)	2.51	±0.11	2.33	±0.03	1.60	±0.01
Oleik asit (C18:1)	26.08	±2.01	24.88	±0.08	25.98	±0.08
Linoleik asit (C18:2)	33.37	±2.06	28.94	±0.04	40.44	±0.10
Linolenik asit (C18:3)	6.51	±0.65	7.03	±0.09	12.88	±0.01
Linolelaidik asit (C18:2)	0.01	±0.00	0.01	±0.00	0.01	±0.00
Araşidik asit (C20:0)	0.57	±0.02	0.99	±0.02	0.39	±0.03
Eikosenik asit(C20:1)	6.34	±0.37	8..07	±0.06	4.55	±0.04
Eikosadienik asit (C20:2)	0.42	±0.02	0.42	±0.04	0.47	±0.01
Behenik asit (C22:0)	0.83	±0.03	0.87	±0.03	0.111	±0.02
Erusik asit (C22:1)	17.29	±0.88	21.66	±0.44	8.04	±0.13
Lignoserik asit (C24:0)	0.39	±0.01	0.30	±0.01	0.07	±0.01

Tablo 3.3 e bakıldığında alt fazlardaki YAME miktarlarının üst fazlardakinden yüksek olduğu görülmektedir. 0 °C de en yüksek YAME içeriği üst fazda 13.92 iken alt fazda 31.97’ dir. 4 °C de en yüksek YAME içeriği üst fazda 14.22 iken alt fazda 32.58 ‘dir. -18 °C de en yüksek YAME içeriği üst fazda 9.91 iken alt fazda 29.88 ‘dir.

En yüksek değerlere 4 °C de ulaşılmıştır. Erusik asit ile beraber diğer yağ asitlerini ayırma ve saflaştırma için yapılan ön çalışmada değişkenlerin aralığında, kristalleşme sıcaklığı 4 °C, işlem süresi 24 saat ve YAME-metanol oranı da (g/mL) 1:25 olarak optimize edilmiştir.

Tablo 3. 5. İkinci zenginleştirme sonucunda elde edilen yağ asitleri metil esterleri miktarları (Yüksek)

	Örnek (Saflaştırmada kullanılan)		Alt Faz (Kristal kısım)		Üst Faz (Çözelti kısmı)	
Palmitik asit(C16:0)	5.59	±0.22	4.74	±0.08	5.82	±0.03
Palmitoleik asit (C16:1)	0.12	±0.02	0.08	±0.04	0.24	±0.02
Stearik asit (C18:0)	2.51	±0.11	2.41	±0.03	1.54	±0.04
Oleik asit (C18:1)	26.08	±2.01	22.64	±0.08	26.26	±0.08
Linoleik asit (C18:2)	33.37	±2.06	27.81	±0.04	40.37	±0.10
Linolenik asit (C18:3)	6.51	±0.65	6.48	±0.09	12.99	±0.01
Linolelaidik asit (C18:2)	0.01	±0.00	0.01	±0.00	0.01	±0.00
Araşidik asit (C20:0)	0.57	±0.02	0.52	±0.02	0.116	±0.03
Eikosenik asit(C20:1)	6.34	±0.37	8.56	±0.06	44.51	±0.04
Eikosadienik asit (C20:2)	0.42	±0.02	0.38	±0.04	0.332	±0.01
Behenik asit (C22:0)	0.83	±0.03	1.74	±0.03	0.113	±0.02
Erusik asit (C22:1)	17.29	±0.87	23.18	±0.43	7.65	±0.13
Lignoserik asit (C24:0)	0.39	±0.01	0.35	±0.01	0.01	±0.00

Zenginleştirme çalışması için içerisinde % 19.19 erusik asit bulunan yağ kullanıldı. Tablo 3.4. te birinci zenginleştirme sonucu bulunan yağ asidi miktarları verilmiştir. Bulunan miktarlar arasında erusik asit alt fazda üst faza göre daha yüksek bulunmuştur. Erusik asit alt faz da % 21.66 iken üst fazda % 8.04 dur. Alt faz da en fazla bulunan yağ asidi metil esterleri miktarları % 28.94 ile iki çift bağ içeren çoklu doymamış yağ asidi olan linoleik asit (18: 2 cis-9,12) ve % 24.88 ile doymamış yağ asidi olan oleik asittir (18:1 cis-9). Aynı zamanda

linoleik asit (18: 2 cis-9,12) üst fazda % 40.44 ile en çok bulunan yağ asididir. Onu % 25.98 ile oleik asit (18:1 cis-9) izlemiştir.

Alt fazda en az bulunan yağ asitleri ise % 0.01 ile iki çift bağ içeren çoklu doymamış yağ asidi olan linolelaidik asit (C18:2, n-6,9 tüm-trans) ve % 0.07 ile tek çift bağ içeren doymamış yağ asidi olan palmitoleik asittir (16:1Δ-9). Üst fazda da en az bulunan yağ asitleri yine bu yağ asitleri ve doymuş yağ asidi olan lignoserik (C24:0) asittir.

Tablo 3.4 ve 3.5 bakıldığında, ikinci zenginleştirme sonucunda erusik asit miktarının birinci zenginleştirmeye göre artışı görülmektedir. Birinci zenginleştirmede alt faz % 21.66 iken ikinci zenginleştirmede % 7.00 kadar artarak % 23.18'e çıkmıştır. Üst faz ise % 8.04'ten % 7.65'e düşmüştür.

Erusik asit miktarındaki artışla paralel olarak ikinci zenginleştirme sonucunda alt fazda doymuş yağ asitleri olan stearik asit, behenik asit, lignoserik asit de ve tekli doymamış yağ asidi olan eikosenik asitte de artış olmuştur.

İki çift bağlı linolelaidik asit ve tek çift bağlı palmitoleik asit sabit kalırken doymuş yağ asitleri olan palmitik asit, stearik asit, araşidik asit, oleik asit, iki çift bağlı doymamış yağ asitleri olan linoleik asit, eikosadienik asit üç çift bağlı çoklu doymamış yağ asidi olan linolenik asit miktarlarında ise azalma görülmektedir.

Tablo 3. 6. Üçüncü zenginleştirme sonucunda elde edilen yağ asitleri metil esteri miktarları (Yüksek)

	Örnek (Saflaştırmada kullanılan)		Alt Faz (Kristal kısım)		Üst Faz (Çözelti kısmı)	
Palmitik asit(C16:0)	5.59	±0.22	4.34	±0.03	5.79	±0.09
Palmitoleik asit (C16:1)	0.12	±0.02	0.01	±0.08	0.21	±0.04
Stearik asit (C18:0)	2.51	±0.11	2.66	±0.04	1.89	±0.09
Oleik asit (C18:1)	26.08	±2.01	23.22	±0.09	27.36	±0.06
Linoleik asit (C18:2)	33.37	±2.06	22.82	±0.04	36.93	±0.04
Linolenik asit (C18:3)	6.51	±0.65	4.69	±0.09	10.12	±0.03
Linolelaidik asit (C18:2)	0.01	±0.00	0.01	±0.00	0.01	±0.00
Araşidik asit (C20:0)	0.57	±0.02	0.39	±0.06	0.28	±0.06
Eikosenik asit(C20:1)	6.34	±0.37	9.56	±0.04	5.97	±0.04
Eikosadienik asit (C20:2)	0.42	±0.02	0.45	±0.03	0.41	±0.03
Behenik asit (C22:0)	0.83	±0.03	1.44	±0.03	0.13	±0.03
Erusik asit (C22:1)	17.29	±0.45	29.35	±1.78	10.91	±0.45
Lignoserik asit (C24:0)	0.39	±0.01	0.59	±0.01	0.01	±0.01

Üst faza bakıldığında ise linoleik asit (C18:2), eikosadienik asit (C20:2), lignoserik asit (C24:0) azalırken linoelaidik asit sabit kalmış, diğer yağ asitleri miktarları artmıştır.

Tablo 3.6' ya bakıldığında, üçüncü zenginleştirmede ikinciye oranla artış gözlemlenmiştir. İkinci zenginleştirmede % 23.18 olan alt faz, üçüncü zenginleştirmede % 6.17 artış ile % 29.35'e yükselmiştir. Üst faz da % 7.65 den % 10.91'e yükselmiştir.

Tabloda alt fazdaki yağ asidi miktarlarına bakarsak; stearik asit (C18:0), oleik asit (C18:0), eikosenik asit (C20:1), eikosadienik asit (C20:2), lignoserik asit (C24:0) miktarları ikinci zenginleştirmeye göre biraz daha artmıştır. Palmitik asit (C16:0), palmitoleik asit (C16:1), linoleik asit (C18:2), linolenik asit (C18:3), araşidik asit (C20:0), behenik asit (C22:0) ikinci zenginleştirmeye göre azalmıştır. Nervonik asit (C24:1) ve linolelaidik asit (C18:2) ise sabit kalmıştır.

Üst fazda ise eikosadienik asit (C20:2) ve oleik asit (C18:0) seviyeleri ikinci zenginleştirmeye göre artarken, nervonik asit (C24:1), lignoserik asit (C24:0) ve linolelaidik asit (C18:2) ise sabit kalmıştır. Diğer yağ asitleri ise ikinci zenginleştirmeye göre azalmıştır.

Behenik asit, eikosenik asit, araşidik asit, stearik asit miktarlarında ikinci zenginleştirmeye nazaran üçüncü zenginleştirmede artma gözlenmiştir.

Tablo 3. 7. Dördüncü zenginleştirme sonucunda elde edilen yağ asitleri metil esteri miktarları (Yüksek)

	Örnek (Saflaştırmada kullanılan)		Alt Faz (Kristal kısım)		Üst Faz (Çözelti kısmı)	
Palmitik asit(C16:0)	5.59	±0.22	3.55	±0.03	5.00	±0.11
Palmitoleik asit (C16:1)	0.12	±0.02	0.05	±0.01	0.11	±0.04
Stearik asit (C18:0)	2.51	±0.11	2.92	±0.24	2.54	±0.06
Oleik asit (C18:1)	26.08	±2.01	20.11	±0.39	25.82	±0.02
Linoleik asit (C18:2)	33.37	±2.06	16.54	±0.34	27.83	±0.34
Linolenik asit (C18:3)	6.51	±0.65	22.77	±0.29	5.94	±0.44
Linolelaidik asit (C18:2)	0.01	±0.00	0.01	±0.00	0.01	±0.00
Araşidik asit (C20:0)	0.57	±0.02	1.02	±0.06	0.58	±0.06
Eikosenik asit(C20:1)	6.34	±0.37	10.57	±0.112	8.79	±0.14
Eikosadienik asit (C20:2)	0.42	±0.02	0.42	±0.03	0.45	±0.03
Behenik asit (C22:0)	0.83	±0.03	2.23	±0.02	0.77	±0.022
Erusik asit (C22:1)	17.29	±0.45	38.76	±0.55	22.12	±0.44
Lignoserik asit (C24:0)	0.39	±0.01	1.03	±0.01	0.01	±0.01

Tablo 3.7 incelendiğinde, üçüncü zenginleştirmede alt fazda bulunan % 29.35 erusik asit miktarının % 38.77 yükselmiştir. % 9.42 ' lik artış gözlenmiştir. Üst faz da ise % 10.91 den %22. 12'ye bir artış söz konusudur.

Alt faza baktığımızda diğer yağ asitleri için artış gösterenler; palmitoleik asit (C16:1), stearik asit (C18:0), linolenik asit (C18:3), eikosenik asit (C20:1), behenik asit (C22:0), lignoserik asittir (C24:0). Azalış gösterenler ise palmitik asit (C16:0), oleik asit (C18:0), linoleik asit (C18:2), araşidik asit (C20:0), eikosadienik asittir (C20:2). Sabit kalanlar ise linolelaidik asit (C18:2) ve nervonik asittir (C24:1).

Üst faza baktığımızda ise sabit kalanlar; lignoserik asit (C24:0), nervonik asit (C24:1) ve linolelaidik asit (C18:2)' dir. Azalanlar; palmitik asit (C16:0), palmitoleik asit (C16:1), oleik asit (C18:0), linoleik asit (C18:2), linolenik asit (C18:3), eikosadienik asit (C20:2)' dir.

Artanlar ise; stearik asit (C18:0), araşidik asit (C20:0), eikosenik asit (C20:1), behenik asit (C22:0)' dir.

Tablo 3. 8. Beşinci zenginleştirme sonucunda elde edilen yağ asitleri metil esteri miktarları (Yüksek)

	Örnek (Saflaştırmada kullanılan)		Alt Faz (Kristal kısım)		Üst Faz (Çözelti kısmı)	
Palmitik asit(C16:0)	5.59	±0.22	2.08	±0.11	3.99	±0.13
Palmitoleik asit (C16:1)	0.12	±0.02	0.05	±0.01	0.07	±0.04
Stearik asit (C18:0)	2.51	±0.11	2.79	±0.26	2.95	±0.21
Oleik asit (C18:1)	26.08	±2.01	12.78	±0.32	21.96	±0.02
Linoleik asit (C18:2)	33.37	±2.06	7.79	±0.17	18.87	±0.34
Linolenik asit (C18:3)	6.51	±0.65	0.93	±0.29	3.33	±0.33
Linolelaidik asit (C18:2)	0.01	±0.00	0.01	±0.00	0.01	±0.00
Araşidik asit (C20:0)	0.57	±0.02	0.29	±0.03	0.95	±0.06
Eikosenik asit(C20:1)	6.34	±0.37	10.57	±0.19	10.49	±0.44
Eikosadienik asit (C20:2)	0.42	±0.02	0.42	±0.03	0.47	±0.03
Behenik asit (C22:0)	0.83	±0.03	3.76	±0.18	1.91	±0.31
Erusik asit (C22:1)	17.29	±0.98	55.66	±0.99	34.15	±0.78
Lignoserik asit (C24:0)	0.39	±0.01	2.12	±0.01	0.01	±0.01

Kristallendirme çalışmasında 1.0 g' lık 10 adet numune çalışıldı. Beşinci kristallendirme sonucunda 4.19 ± 0.29 g içerisinde $\% 55.56 \pm 0.99$ erusik asit içeren

karışım elde edildi. Sonuç olarak, metanolde oleik asit, linoleik asit ve linolenik yüksek çözünürlük nedeniyle ayrılabilmiştir. Bununla birlikte, palmitik asit başta olmak üzere doymuş yağ asitlerinin metanoldeki çözünürlüğü düşük olduğundan tercihen kristalize olmuştur. Stearik asit miktarındaki hafif artışın, YAME'deki diğer asitlerin çözünürlüğünden kaynaklanan birlikte kristalleşmeden kaynaklandığı söylenebilir. Araşidik ve behenik asitler doymuş asitlerdir, ancak konsantrasyonları artmıştır, çözünürlükleri ise palmitik asitten daha yüksektir. Erusik asitinde metanoldeki çözünürlüğü düşüktür. Çalışmada bu nedenle miktarı en fazla artan asit olmuştur. Sonuç olarak, örnek erusik asitçe zenginleştirilmiştir.

YAME'nin bu çözünürlük davranışı, karışım içeriğinin polaritesi ve hidrojen bağı oluşturma özellikleri dikkate alınarak açıklanabilir. Yağ asitleri olarak stearik, palmitik, araşidik ve erusik asit gibi uzun zincirli doymuş yağ asitleri nispeten polar olmayan bileşiklerdir. Ancak, bu asitler daha kısa zincirli yağ asitleri olan linoleik, oleik, erusik, araşidik ve behenik asit ile karşılaştırıldığında daha fazla polardırlar. Tekli doymamış yağ asitleri ve çoklu doymamış yağ asitleri ile ilgili olarak, doymuş yağ asitlerinden daha polar oldukları söylenir (Japır vd., 2018). Sarı hardal yağı YAME karışımının metanoldeki çözünürlüğü, artan polarite açısından sıralandığında linolenik asit, linoleik asit, oleik asit, palmitik asit, stearik asit, araşidik asit, behenik asit, erusik asit ve lignoserik asit şeklindedir.

3.4. Düşük Erusik Asitli YAME Kristallendirme Çalışmalarına Ait Bulgular

Zenginleştirme için içerisinde % 6.87 erusik asit bulunan hardal tohum yağı kullanıldı. Tablo 3.9' da birinci zenginleştirme sonucu bulunan yağ asidi miktarları verilmiştir. Bulunan miktarlar arasında erusik asit alt fazda fazlaca üst fazda ise daha az bulunmuştur. Erusik asit alt faz da % 12.06 iken üst fazda % 4.86 oranındadır. Alt faz da en fazla bulunan yağ asidi miktarları % 39.84 ile iki çift bağ içeren çoklu doymamış yağ asidi olan linoleik asit (18: 2 cis-9,12) ve % 29.13 ile doymamış yağ asidi olan oleik asittir (18:1 cis-9). Aynı zamanda linoleik asit (18: 2 cis-9,12) üst fazda % 51.93 ile en çok bulunan yağ asididir. Onu % 20.06 ile oleik asit (18:1 cis-9) takip etmektedir.

Tablo 3. 9. Üst kısmın birinci zenginleştirmesi sonucunda elde edilen yağ asitleri metil esteri miktarları (Düşük)

	Örnek (Saflaştırmada kullanılan)		Alt Faz (Kristal kısım)		Üst Faz (Çözelti kısmı)	
Palmitik asit(C16:0)	6.35	±0.62	6.06	±0.54	6.81	±0.99
Palmitoleik asit (C16:1)	0.07	±0.01	0.08	±0.01	0.11	±0.01
Stearik asit (C18:0)	2.89	±0.11	3.93	±0.09	2.59	±0.12
Oleik asit (C18:1)	28.20	±1.23	29.13	±1.54	28.06	±2.22
Linoleik asit (C18:2)	48.94	±1.32	39.84	±2.01	51.93	±3.43
Linolenik asit (C18:3)	2.00	±0.43	1.31	±0.34	2.31	±0.21
Linolelaidik asit (C18:2)	0.12	±0.00	0.11	±0.00	0.01	±0.00
Araşidik asit (C20:0)	0.37	±0.01	0.57	±0.02	0.28	±0.01
Eikosenik asit(C20:1)	2.86	±0.24	3.82	±0.09	2.27	±0.24
Eikosadienik asit (C20:2)	0.06	±0.01	0.24	±0.01	0.17	±0.01
Behenik asit (C22:0)	0.85	±0.06	1.91	±0.04	0.42	±0.02
Erusik asit (C22:1)	6.87	±0.65	12.06	±0.33	4.86	±0.66
Lignoserik asit (C24:0)	0.35	±0.01	0.94	±0.01	0.17	±0.01

Alt fazda en az bulunan yağ asidi miktarları ise % 0.01 ile iki çift bağ içeren çoklu doymamış yağ asidi olan linolelaidik asit (C18:2, n-6, 9 tüm-trans), % 0.07 ile tek çift bağ içeren doymamış yağ asidi olan palmitoleik asittir (16:1Δ-9). Üst fazda da en az bulunan yağ asitleri yine bu yağ asitleri ve doymuş yağ asidi olan lignoserik (C24:0) asittir.

Bu çalışma sonucunda erusik asit metil esteri içeren 14 adet farklı konsantrasyonda malzeme elde edildi (Tablo 3.11). Bunun yanı sıra diğer yağ asitlerinin de metil esteri içeren konsantrasyonlar elde edildi. Elde edilen bu yağ asidi karışımının büyük bir kısmı kristallenme esnasında alt faz kısımlarından olup bir kısmı da üst faz kısımlarından elde edilmiştir.

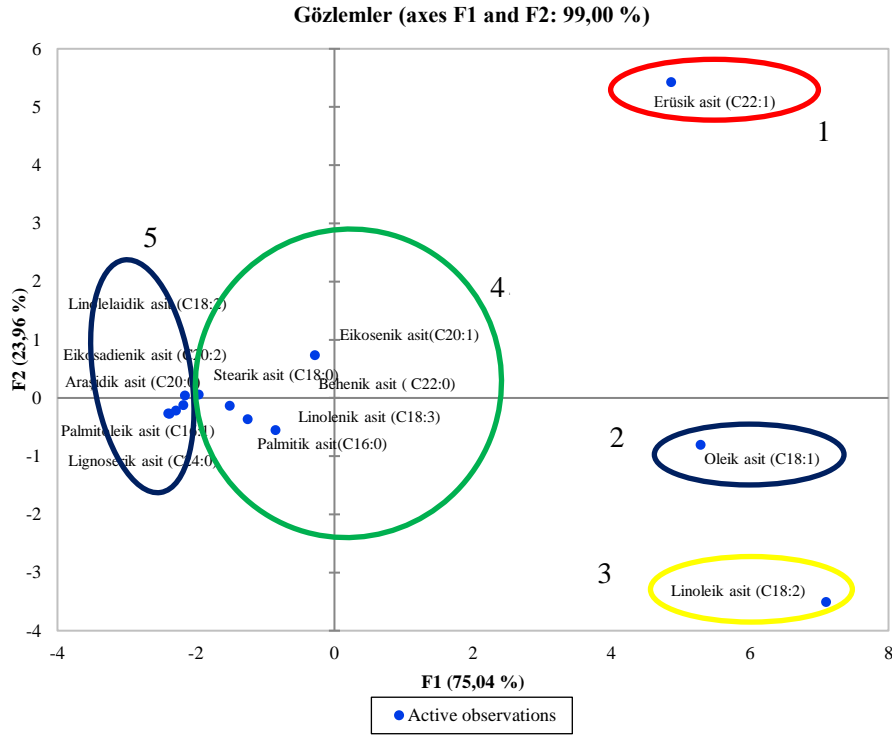
Tablo 3. 10. Üst kısmın ikinci zenginleştirmesi sonucunda elde edilen yağ asitleri metil esteri miktarları (Düşük)

	Örnek (Saflaştırmada kullanılan)		Alt Faz (Kristal kısım)		Üst Faz (Çözelti kısım)	
Palmitik asit(C16:0)	6.35	±0.22	6.87	±0.77	6.88	±0.54
Palmitoleik asit (C16:1)	0.07	±0.02	0.11	±0.01	0.11	±0.01
Stearik asit (C18:0)	2.89	±0.11	3.56	±0.32	2.59	±0.26
Oleik asit (C18:1)	28.20	±2.01	29.46	±1.12	30.06	±1.78
Linoleik asit (C18:2)	48.94	±2.06	45.15	±2.11	52.32	±2.67
Linolenik asit (C18:3)	2.00	±0.65	1.56	±0.76	2.31	±0.01
Linolelaidik asit (C18:2)	0.12	±0.00	0.01	±0.00	0.01	±0.00
Araşidik asit (C20:0)	0.37	±0.02	0.43	±0.02	0.28	±0.04
Eikosenik asit(C20:1)	2.86	±0.37	3.26	±0.43	2.27	±0.23
Eikosadienik asit (C20:2)	0.06	±0.02	0.18	±0.01	0.17	±0.01
Behenik asit (C22:0)	0.85	±0.03	0.93	±0.11	0.42	±0.02
Erusik asit (C22:1)	6.87	±0.45	8.28	±0.44	2.33	±0.43
Lignoserik asit (C24:0)	0.35	±0.01	0.65	±0.01	0.17	±0.01

Tablo 3.11'e bakıldığında, her konsantrasyon için erusik asit miktarı artarken diğer yağ asitleri için bazılarında artış bazılarında da azalışlar gözlemlenmiş veya bazılarında miktarlar sabit kalmıştır. Erusik asit her konsantrasyonda artış gösterirken, palmitik asit (C16: 0), oleik asit (C18: 1) ve linoleik asit (C18: 2) farklı konsantrasyonlara göre azalma göstermiştir. Eikosenik asit (C20:1) ise artmıştır.

Tablo 3. 11. Farklı bileşimlerde erusik asit ve diğer yağ asidi metil esterleri (%)

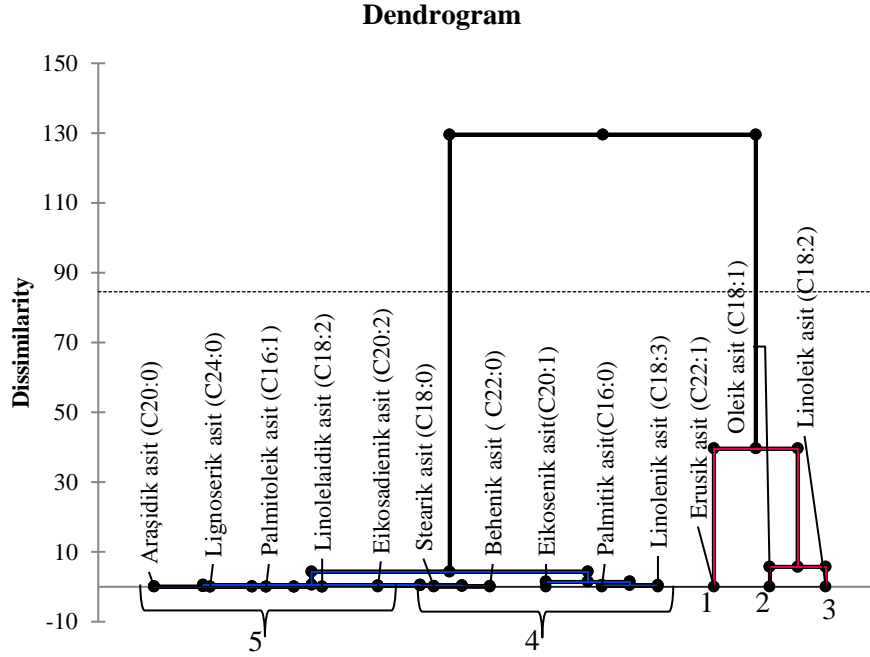
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Palmitik asit(C16:0)	6.88	6.81	6.35	6.87	5.79	6.06	5.59	5.00	4.34	3.99	3.55	3.03	2.67	2.08
Palmitoleik asit (C16:1)	0.11	0.11	0.07	0.11	0.21	0.08	0.12	0.11	0.01	0.07	0.05	0.01	0.01	0.05
Stearik asit (C18:0)	2.59	2.59	2.89	3.56	1.89	3.93	2.51	2.54	2.66	2.95	2.92	3.23	3.76	2.79
Oleik asit (C18:1)	30.06	28.06	28.20	29.46	27.36	29.13	26.08	25.82	23.22	21.96	20.11	19.81	17.99	12.78
Linoleik asit (C18:2)	52.32	51.93	48.94	45.15	36.93	39.84	33.37	27.83	22.82	18.87	16.14	13.82	10.71	7.79
Linolenik asit (C18:3)	2.31	2.31	2.00	1.56	10.12	1.31	6.51	5.94	4.69	3.33	2.77	1.48	0.77	0.93
Linolelaidik asit (C18:2)	0.01	0.01	0.12	0.01	0.01	0.11	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
Araşidik asit (C20:0)	0.28	0.28	0.37	0.43	0.28	0.57	0.57	0.58	0.39	0.95	1.02	2.71	1.59	0.29
Eikosenik asit(C20:1)	2.27	2.27	2.86	3.26	5.97	3.82	6.34	8.79	9.56	10.49	10.07	9.38	6.64	10.57
Eikosadienik asit (C20:2)	0.17	0.17	0.06	0.18	0.41	0.24	0.42	0.45	0.45	0.47	0.42	0.45	9.54	0.42
Behenik asit (C22:0)	0.42	0.42	0.85	0.93	0.13	1.91	0.83	0.77	1.44	1.91	2.23	3.06	2.97	3.76
Erusik asit (C22:1)	2.33	4.86	6.87	8.28	10.91	12.06	17.29	22.12	29.35	34.15	38.76	43.48	51.63	55.66
Lignoserik asit (C24:0)	0.17	0.17	0.35	0.65	0.01	0.94	0.39	0.01	0.59	0.01	0.58	0.01	0.01	2.12



Şekil 3. 1. Farklı konsantrasyonlarda elde edilen YAME' lerin PCA analizi

Bu çalışmada elde edilen 14 farklı konsantrasyondaki erusik asit örneğine ait analiz sonuçlarına PCA (Principal Component Analysis) analizi uygulanmıştır. Şekil 3.1. ' de görülen PCA analizinde PC1 ve PC2 verilerin % 99.0'unu açıklayabilmiştir. Buna göre YAME konsantrasyonlarda ki değişime göre 5 ana grup oluşmuştur. 1. grupta erusik asit metil esteri, 2. grupta oleik asit metil esteri, 3. grupta linoleik asit metil esteri, 4. grupta palmitik, linolenik, behenik, stearik ve eikosenik asit metil esterleri, 5. grupta araşidik, palmitoleik, lignoserik, linelolaidik ve eikosadienik asit metil esterleridir. Ana YAME' lerin bileşenleri erusik, oleik ve linoleik asitlerdir.

Aglomeratif hiyerarşik kümeleme (AHC) analizi elde edilen farklı konsantrasyonlardaki erusik asit metil esterleri ürünlerini sınıflandırma şemaları oluşturmak kullanılmış olan bir yöntemdir. Elde edilen 14 adet farklı konsantrasyondaki örneğin AHC analizi Şekil 3.2' de verilmiştir. Söz konusu bu şekilde kümelenme görülmektedir. Burada da YAME ' ler 5 ana gruba ayrılmıştır.



Şekil 3. 2. Farklı konsantrasyonlarda elde edilen YAME'lerin AHC analizi

Farklı konsantrasyonlardaki erusik asit metil esterlerinin korelasyon matrisi (Pearson (n)) Tablo 3.12'de verilmiştir. Tablodaki koyu olan değerler, $\alpha = 0.05$ anlamlılık düzeyine sahip 0'dan farklı değerlerdir. Anlamlı olan korelasyonlar koyu olarak verilmiştir. Korelasyon katsayısı -1 ve 1 olarak değişmektedir. 1 veya -1'e daha yakın olan iki değişkenin arasındaki bağlantı daha güçlüdür. Negatif değerler negatif korelasyonu, pozitif değerler de pozitif korelasyonu göstermektedir. Sıfıra yakın değerlerde karşılaştırılan iki değer arasında korelasyonun bulunmadığını göstermektedir.

Ana bileşen olan YAME'lerden erusik asidin diğer bileşenlerle yapmış olduğu korelasyonlara bakıldığında erusik asidin; palmitik, palmitoleik, oleik ve linoleik asit metil esterleri ile güçlü negatif korelasyon gösterdiği görülmektedir. Erusik asit miktarı arttıkça korelasyonun negatif olduğu, yani diğer asit miktarlarının azaldığı anlaşılmaktadır. Erusik asit; linolenik ve linolelaidik asit metil esterleri ile zayıf negatif korelasyon göstermiştir. Yine erusik asit; araşidik, eikosenik ve behenik asit ile güçlü pozitif korelasyon göstermektedir. Stearik, eikosadienik ve lignoserik asit ile zayıf pozitif korelasyon göstermektedir. Erusik asit miktarı arttıkça söz konusu asitlerin miktarı artmaktadır. Bu

korelasyon % 95 metanol kullanarak yapılan zenginleştirme işleminde alt fazda erusik, araşidik, eikosenik ve behenik asit bulunması, üst fazda ise oleik, linoleik asit bakımından zengin olmasından kaynaklanmaktadır. Yani C16:0, C16:1, C18:1, C18:2 ve C18:3 karbonlu yağ asitleri metil esterleri zenginleştirme sırasından % 95 metanol fazında çözünmekte ve üst faza geçmektedir. Bu karbon sayısına sahip YAME'lerden sadece palmitik asit doymuş olup diğerleri doymamış YAME ' lerdir. C18:0, C20:0, C20:1, C20:2, C22:0, C22:1 ve C24:0 karbon sayısına sahip olan YAME' ler % 95 metanol fazında kristallenerek alt faza geçmektedir. Bunlardan strearik, araşidik, behenik asit ve lignoserik asit doymuş olup diğerleri doymamıştır. Linolelaidik asit metil esteri (C18:2) göstermiş olduğu pozitif ve negatif korelasyonlar -0.430 ile 0.358 arasında değişmiştir. Bu nedenle de diğer YAME ile olan korelasyon bu asit için istatistiksel olarak anlamlı seviyede değildir. Lignoserik asit metil esteri (C24:0) göstermiş olduğu pozitif ve negatif korelasyonlar -0.417 ile 0.488 arasında değişmiştir. Bu nedenle de diğer YAME ile olan korelasyon bu asit için istatistiksel olarak anlamlı seviyede değildir.

Tablo 3. 12. Farklı konsantrasyonlardaki erusik asit metil esterlerinin korelasyon matrix (Pearson (n))

	Palmitik asit(C16:0)	Palmitiloik asit (C16:1)	Stearik asit (C18:0)	Oleik asit (C18:1)	Linoleik asit (C18:2)	Linolenik asit (C18:3)	Linolelaidik asit (C18:2)	Araşidik asit (C20:0)	Eikosenik asit(C20:1)	Eikosadienik asit (C20:2)	Behenik asit (C22:0)	Erusik asit (C22:1)	Lignoserik asit (C24:0)
Palmitik asit(C16:0)	1	0.654	-0.178	0.971	0.980	0.222	0.328	-0.572	-0.851	-0.432	-0.886	-0.993	-0.285
Palmitiloik asit (C16:1)		1	-0.567	0.614	0.603	0.683	-0.041	-0.569	-0.444	-0.378	-0.755	-0.680	-0.198
Stearik asit (C18:0)			1	-0.123	-0.178	-0.766	0.363	0.419	-0.101	0.429	0.523	0.255	0.167
Oleik asit (C18:1)				1	0.928	0.279	0.358	-0.451	-0.792	-0.386	-0.883	-0.973	-0.417
Linoleik asit (C18:2)					1	0.121	0.380	-0.569	-0.905	-0.405	-0.839	-0.975	-0.240
Linolenik asit (C18:3)						1	-0.257	-0.304	0.119	-0.249	-0.581	-0.292	-0.351
Linolelaidik asit (C18:2)							1	-0.169	-0.430	-0.145	-0.071	-0.347	0.149
Araşidik asit (C20:0)								1	0.398	0.382	0.585	0.574	-0.330
Eikosenik asit(C20:1)									1	0.055	0.621	0.820	0.194
Eikosadienik asit (C20:2)										1	0.386	0.475	-0.210
Behenik asit (C22:0)											1	0.909	0.488
Erusik asit (C22:1)												1	0.310
Lignoserik asit (C24:0)													1

4. SONUÇ ve ÖNERİLER

Referans materyal (RM) ve sertifikalı referans materyaller (SRM) ortaya çıkmalarından beri tüm alanlarda olduğu gibi gıda analizlerinde de kritik bir rol oynamışlardır. Tüm analitik sonuçların güvenilirliği tamamen uygun referans materyallerin mevcudiyetine bağlıdır ve şimdi neredeyse tüm Analitik Kimya dalları bu standartlara acil bir ihtiyaç olduğunu beyan etmektedir (Müstakim, 2019).

Standartlar ve referans materyalleri arasında genellikle bazı karışıklıklar vardır. Birincil standartlar, kimyasal standartların en üst katmanını temsil eder ve prensip olarak, analitik verilerin SI ölçüm birimlerine (örneğin, kilogram, mol, metre ve ikinci) izlenebilirliğini sağlamak için bir araç sağlarlar. Sınırlı sayıda saf kimyasallar birincil standartlar olarak kabul edilirler (ve bu nedenle sertifikalı referans materyalleri oluşturabilirler). Sertifikalı referans materyallerin çoğu birincil standart değildir; daha doğrusu, kendilerine verilen özellik değerler pratik temel standartlarla uyumlu değildir. Birincil standart, en yüksek metrolojik niteliklere sahip olarak belirlenmiş veya yaygın olarak kabul edilen ve değeri aynı kalitedeki diğer standartlara atıfta bulunmadan kabul edilen standarttır (Store, 2012).

İkincil standart, değeri birincil standartla karşılaştırıldığında atanan standarttır.

Referans malzeme, özellik değerleri yeterli olan malzeme veya madde bir cihazın kalibrasyonu, bir ölçüm yönteminin değerlendirilmesi veya malzemelere değerler atamak için kullanılacak şekilde homojendir. Bir referans malzeme saf veya karışık gaz, sıvı veya katı şeklinde olabilir. Örneğin referans malzeme, kimyasal analizde kullanılan kalibrasyon çözeltileri gibi sentetik karışımların yanı sıra sedimentler gibi doğal çevresel örneklerle dayanan malzemeleri içerir (Zakaria ve Rezali, 2014).

Sertifikalı referans malzeme, özellik değerleri olan referans malzemesi mülkiyet değerlerinin ifade edildiği birimin doğru bir şekilde gerçekleştirilmesine izlenebilirliğini belirleyen ve her sertifikalı değere belirli bir güven seviyesinde bir belirsizlik beyanı (sertifika) eşlik eden bir prosedürle onaylanmış malzemedir (TSE, 2016).

İzlenebilirlik, bir ölçüm sonucunun özelliği veya bir standardın değeri bu nedenle, belirtilen referanslarla, genellikle ulusal veya uluslararası standartlarla, kırılmamış bir karşılaştırma zinciri aracılığıyla, hepsi belirtilen belirsizliklere sahip olabilir.

Tam analitik metodun doğrulanması veya validasyonunda (çözücü ekstraksiyonu, ekstraktların temizlenmesi, ilgili analitlerin izolasyonu ve kromatografik ayırma ve algılama dahil), gerçek örneklerin analizinde tipik olarak karşılaşılanlara benzer matrislere sahip SRM' lerin kullanılmasını gerektirir. Bu nedenle, doğal matris SRM' leri bu amaç için en uygun malzemelerdir. Çevresel matrislerdeki kirletici maddelerin ölçümleri, insan serumu ve idrarındaki klinik analizler ve gıda matrislerindeki vitaminler ve diğer gıdalar için hem NIST (Amerikan Teknoloji ve Standartlar Ulusal Enstitüsü) hem de BCR (British Retail Consortium) tarafından çok çeşitli doğal matris RM ve SRM' leri mevcuttur (Müstakim, 2019).

Türkiye' de TÜBİTAK tarafından gıda analizleri için RM, SRM üretilmektedir. Örneğin; Kırmızı Pul Biber, **UME RM 9923**, Nem, Kül, Tuz ve Yağ için değeri atanmıştır. Kırmızı Pul Biber, **UME RM 9919**, doğal malzeme ve ekleme yapılar hazırlanmış aflatoksin (AF) içeren kırmızı pul biber. AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂ ve Toplam AF için atanmış değeri mevcuttur. Süzme çiçek balı, **UME RM 9905**, Glikoz, Fruktoz, Diastaz Sayısı, Serbest Asitlik, Nem, Prolin, İletkenlik, pH tayini için. Toz kuru incir **UME CRM 1302** B₁, B₂, G₁, G₂ ve Toplam Aflatoksin (URL 2).

Erusik asidin uzun süreli olarak kullanımı sonucunda, insan sağlığı açısından olumsuz etkiler gösterebileceği yapılan bilimsel çalışmalarla ortaya konulmuştur. Bu nedenle de Türkiye' de TGK bulaşanlar yönetmeliğinde erusik asitle alakalı maksimum residu limitleri belirlenmiştir. Ayrıca FDA'da da gıdalarda bulunabilecek erusik asit miktarlarıyla ilgili bazı düzenlemeler mevcuttur. Bu sebeple erusik asit bulunabilecek gıdalarda ihracat, ithalat ve yurtiçi denetimlerde analizleri yapılmaktadır. Dolayısıyla erusik asitle ilgili olarak eğer laboratuvar bir analiz metodunu uygulayacaksa bu durumda ilgili laboratuvar verifikasyon ve validasyon çalışmalarını yapma zorunluluğu vardır. Bu nedenle laboratuvarlar verifikasyon ve validasyon çalışmalarında farklı konsantrasyonlarda içerisinde erusik asit içeren çalışmalar yapmak durumundadır (Tosun ve Özkal, 2000).

Ayrıca erusik asit analizinden TÜRKAK tarafından akredite olan laboratuvarlar 48 aylık akreditasyon süreçlerinde en az bir defa yeterlilik çalışmalarına katılma zorunluluğu vardır. Bu bakımdan farklı konsantrasyonlarda üretmiş olduğum erusik asit metil esterleri laboratuvarlar için ayrıca yeterlilik çalışmalarında (YT), laboratuvarlar arası karşılaştırma çalışmalarında (LAK) iç kalite kontrol amacıyla kullanabileceklerdir (UGRL, 2019).

Bu tez çalışması sonucunda şu sonuçlar ortaya çıkmıştır:

- ✓ Gıdalarda erusik asit analizleri yapacak olan gıda kontrol laboratuvarları için verifikasyon ve validasyon çalışmalarında çeşitli konsantrasyonlarda erusik asit metil esteri içeren doğal kaynaklardan elde edilen 14 farklı konsantrasyonda analitik referans malzeme üretilmiştir.
- ✓ Bir zenginleştirme yapılarak zenginleştirme yapılan konsantrasyonla birlikte alt ve üst fazdan elde edilen 3 farklı konsantrasyon içeren erusik asit metil esteri üretebilmek için yöntem geliştirilmiştir.
- ✓ Gıda kontrol laboratuvarları ortaya koyulan bu yöntemle kendileri için farklı konsantrasyonlarda erusik asit metil esteri üreterek verifikasyon, validasyon ve iç kalite kontrol çalışmalarında kullanabileceklerdir.
- ✓ Üretilen bu malzemeler TS EN ISO 17043 standartından akredite olan ve yeterlilik çalışmaları düzenleyen laboratuvarlar için kullanılabilir.
- ✓ TS EN ISO 17034 Standartına göre referans üretiminde akredite olan bir laboratuvar için erusik asit ile alaklı olan ve gıda kontrol laboratuvarlarının kullanabileceği RM veya SRM üretimi farklı konsantrasyonlarda yapılabilir.
- ✓ Erusik asit analizinde kullanılan örnek miktarı çok az olduğu için yapılacak olan böyle bir çalışmanın maliyeti yüksek değildir.
- ✓ Yapmış olduğu çalışmada erusik asit yanında kullanılacak doğal kaynağa göre palmitik asit (C16:0), stearik asit (C18:0), oleik asit (C18:1), linoleik asit (C18:2), linolenik asit (C18:3) araşidik asit (C20:0), eikosenik asit (C20:1), behenik asit (C22:0) ve lignoserik asit (C24:0) gibi yağ asitleri metil esterleride çeşitli konsantrasyonlarda elde edildi.

Bu tez çalışması sonucunda şu öneriler ortaya çıkmıştır:

- ✓ Ülkemizde TS EN ISO 17034 standardına göre referans üretiminde akredite olan olan TÜBİTAK UME ile bir proje geliştirilerek erusik asit analizleri konusunda YT katılım konusunda sıkıntı çeken gıda kontrol laboratuvarları için yeterlilik çalışmaları düzenlenebilir.
- ✓ TÜBİTAK UME tarafından düzenlenecek olan YT çalışmasında sonucunda tüm dünyada gıda kontrol laboratuvarlarının kullanılabileceği RM ve SRM üretimi gerçekleştirilebilir.
- ✓ Gıda kontrol laboratuvarları ile bir çalıştay düzenlenerek kendileri için farklı konsantrasyonlarda erusik asit metil esteri üretimi konusunda bilgilendirme yapılabilir.

- ✓ Gıda kontrol laboratuvarlarının kendi aralarında düzenleyebileceği LAK çalışmaları düzenlenebilir.

Sonuç olarak yapmış olduğum bu çalışma ülkemizde faaliyet gösteren özel ve resmi gıda kontrol laboratuvarlarının erusik asit ile ilgili yapacakları analizler için verifikasyon, validasyon, yeterlilik çalışması, laboratuvarlar arası karşılaştırma, iç kalite kontrol çalışmalarında kullanılabilecek analitik malzeme üretilmiş ve üretim yolu ortaya konulmuştur. Ayrıca yapmış olduğum bu çalışma TS EN ISO 17034 standartına göre RM ve SRM üreten kuruluşlar içinde faydalı olacaktır.

5. KAYNAKLAR

- Açıkgöz, F. E., 2012. Yenilebilir Çiçeklerden Latin Çiçeği (*Tropaeolum majus* L.) Bitkisi ve Biyokimyasal İçeriği Üzerine Bir İnceleme, Ordu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi, 8, 1, 50-58.
- Ahmad, M., Zafar, M., Rashid, S., Sultana, S., Sadia, H. ve Ajab Khan, M., 2013. Production of Methyl Ester (Biodiesel) From Four Plant Species of Brassicaceae: Optimization of The Transesterification Process. International Journal of Green Energy, 10,4, 362-369.
- Akdoğan, A., 2011. Bazı Pestisitlerin Kromatografik Ayrılmaları ve Tayinleri. Yüksek Lisans Tezi, Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Denizli, 183s.
- Alver, E., Demirci ve A., Özçimder, M., 2012. Mikroekstraksiyon Metotları. Journal of Engineering and Natural Sciences Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi, Sigma 30, 75- 90.
- Ascherio, A., & Willett, W. C., 1997. Health Effects of Trans Fatty Acids, The American Journal of Clinical Nutrition, 66, 4, 1006-1010s.
- Asif, M., 2011. Health effects of omega-3,6,9 fatty acids: *Perilla frutescens* is a good example of plant oils, Oriental Pharmacy & Experimental Medicine, 11, 1, 51-59.
- Ballesteros-Vásquez, M. N., Valenzuela-Calvillo, L. S., Artalejo-Ochoa, E. ve Robles-Sardin, A. E., 2012. Ácidos Grasos Trans: Un Análisis Del Efecto De Su Consumo En La Salud Humana, Regulación Del Contenido En Alimentos y Alternativas Para Disminuirlos, Nutrición Hospitalaria, 27, 1, 54-64.
- Başhan, U., 2019. Farklı Pişirme Tekniklerinin Uskumru Balığının (*Scomber Scombrus*, Linnaeus, 1758) Yağ Asidi İçeriğine Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Biruni Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 83s.
- Başı, Z., 2016. İnsan Plazmasından Afinite Kromatografisi Yöntemiyle Saflaştırılan Anjiotensin Konverting Enzim Üzerine *Nigella Sativa* L. Ekstraktından Kolon Kromatografisi İle İzole Edilen Bazı Etken Maddelerin Etkisinin Araştırılması, Doktora Tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Van, 147s.
- Baydar, H., 2005. Isparta Koşullarında Kanola (*Brassica napus* L.) Çeşitlerinin Verim ve Kalite Özellikleri, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 9, 3, Isparta, 1-6.
- Boz, N., Sunal, O., 2009. Kanola Yağından Çinko Oksit Destekli Katalizör Varlığında Biyodizel Üretimi, Gazi Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakültesi Dergisi, 24, 3, 389- 395.

- Braithwaite, A. ve Smith, F. J., 1999. Chromatographic Methods, Kluwer Academic Publishers, London, 571s.
- Castro-González, M. I., 2002. Ácidos Grasos Omega 3: Beneficios Fuentes, *Interciencia*, 27, 3, 128-136.
- Coşkun, F. , 2006. Gıdalarda bulunan doğal koruyucular, Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi, 2, 27- 33.
- Coşkun, F. ve Arıcı, M. 2011. Hardaliyenin Bazı Özellikleri Üzerine Farklı Hardal Tohumları ve Üzüm Çeşitleri Kullanımının Etkisi, Akademik Gıda Araştırma Makalesi, 9,3, Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Tekirdağ, 6- 11.
- Çakmakçı, S. ve Kahyaoğlu, D. T. , 2012. Yağ Asitlerinin Sağlık ve Beslenme Üzerine Etkileri, Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi, 5, 2, 133- 137s.
- Çildir, O. ve Çanakçı, M., 2006. Çeşitli Bitkisel Yağlardan Biyodizel Üretiminde Katalizör ve Alkol Miktarının Yakıt Özellikleri Üzerine Etkisinin İncelenmesi, Gazi Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakültesi Dergisi, 21, 2, 367-372.
- Dağlıoğlu, M. ve Taşan, O., 2005. Trans Yağ Asitlerinin Yapısı, Oluşumu ve Gıdalarla Alınması, Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi, 2,1, 79- 88.
- Demirci, M., 2015. İstanbul Piyasasında Satışa Sunulan Tavuk Etlerinin Yağ Asidi Kompozisyonunun Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, İstanbul, 69s.
- Deuel Jr, H. J., Johnson, R. M., Calbert, C. E., Gardner, J. ve Thomas, B., 1949. Studies on the Comparative Nutritive Value of Fats: XII. The Digestibility of Rapeseed and Cottonseed Oils in Human Subjects. The Journal of Nutrition, 38,3, 369- 379.
- EFSA, 2016. Scientific opinion on erucic acid in feed and food, EFSA J., 14, 1–173.
- Elkacmi, R., Kamil, N., Boulmal, N. ve Bennajah, M., 2016. Experimental Investigations of Oleic Acid Separation From Olive Oil and Olive Mill Wastewater: A Comparative Study, J. Mater. Environ. Sci, 7, 5, 1485-1494.
- Erkmen D., 2019. Gıdalarda Erüsik Asidin Eş Zamanlı Gc-MS/Fıd Tayini İçin Metot Geliştirme ve Validasyon Çalışmalarının Yapılması, Yüksek Lisans Tezi, Gümüşhane Üniversitesi, Gümüşhane, 99s.
- Ersungur, S., 2008. Üretim Yönteminin Kolza Yağının Özelliklerine Etkisinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 69s.
- Eryılmaz, T., Cesur, C., Yeşilyurt, M. K. ve Aydın, E., 2014. Aspir (Carthamus tinctorius L.), Remzibey-05 Tohum Yağı Metil Esteri: Potansiyel Dizel Motor Uygulamaları için Yakıt Özellikleri, Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi, 1,1, 85-90.

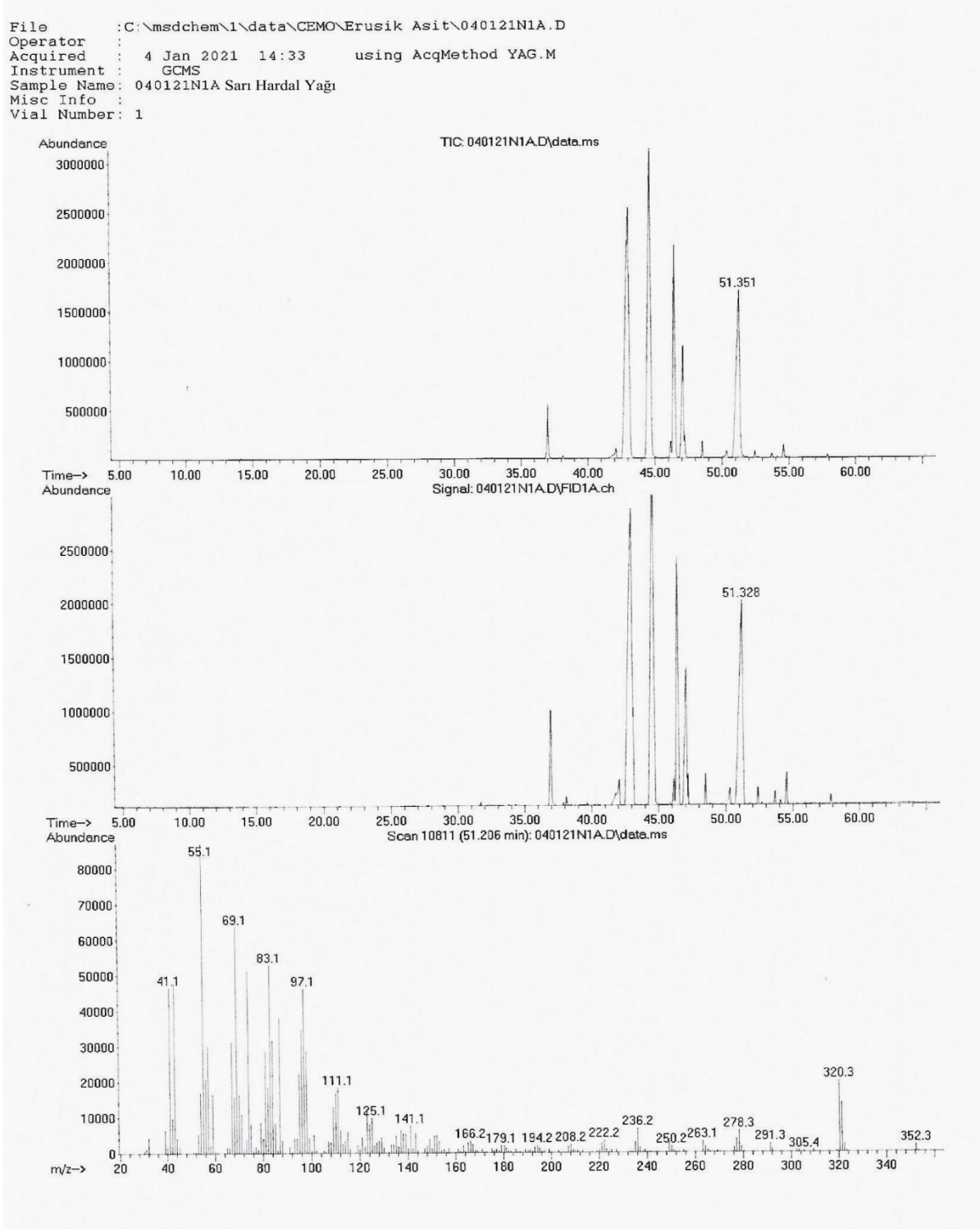
- Eser, B. ve Dinçel, A.S., 2018. Kromatografiye Giriş, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Kullanımında Basit İpuçları, Sağlık Hizmetleri ve Eğitimi Dergisi, 2, 2, 51-57.
- Garzón, G. A. ve Wrolstad, R. E., 2009. Major Anthocyanins and Antioxidant Activity of Nasturtium Flowers (*Tropaeolum majus*), Food Chemistry, 114, 1, 44-49.
- Gökmen, H. ve Köksal, G., 2001. Bebek Beslenmesinde Yağ Asitlerinin Önemi, Beslenme ve Diyet Dergisi, 30, 1, 35- 44.
- ISO 736, 1977. Oilseed Residues- Determination of Diethyl Ether Extract.
- Jakubczyk, K., Janda, K., Watychowicz, K., Lukasiak, J.ve Wolska, J., 2018. Garden Nasturtium (*Tropaeolum Majus L.*)- A Source of Mineral Elements and Bioactive Compounds, Roczniki Państwowego Zakładu Higieny, 69, 2, 119-126.
- Japir, A. A. W., Salimon, J., Derawi, D., Yahaya, B. H., Jamil, M. S. M. ve Yusop, M. R., 2018. Optimization of Methanol Crystallization For Highly Efficient Separation of Palmitic Acid From Palm Fatty Acid Mixture Using Response Surface Methodology, Grasas Aceites, 68, 4, 224.
- Karabaş, H., 2013. Ülkemiz Islahçı Çeşitlerinden Remzibey-05 Aspir (*Carthamus Tinctorius L.*) Tohumlarından Üretilen Biyodizelin Yakıt Özelliklerinin İncelenmesi, Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 27, 1, 9- 17.
- Karaca, E., Aytaç, S., 2007. Yağ Bitkilerinde yağ asitleri üzerine etki eden faktörler, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 22, 1, 123-131.
- Keller, U., 2008. Fette mit gesättigten Fettsäuren, Schweizer Zeitschrift für Ernährungsmedizin, 4, 12- 15.
- Klassen, A. J., Downey, R. K., ve Capcara, J. J., 1987. Westar Summer Rape, Canadian Journal Of Plant Science, 67, 2, 491-493.
- Lamberty, A., Schimmel, H., & Pauwels, J., 1998. The study of the stability of reference materials by isochronous measurements. Fresenius' journal of analytical chemistry, 360,3, 359-361.
- Latha, T. S. ve Prakash, V., 1984. Studies On The Proteins From Safflower Seed (*Carthamus Tinctorius L.*), Journal of agricultural and food chemistry, 32, 6, 1412-1416.
- Mol, S., 2008. Balık Yağı Tüketimi ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri, Journal of Fisheries Sciences, 2,4, 601-607.
- Müstakim, G., 2019. Türkiye’ deki TS EN ISO/ IEC 17025 Standardına Göre Akredite Gıda Laboratuvarlarının Yeterlilik Testi Katılımları ve Referans Malzeme Kullanımlarının Analizi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 99s.
- Özcan, M., Akgül, A. ve Bayrak, A., 1998. Yabani Hardal (*Sinapsis arvensis L.*) Tohumu ve Yağlarının Bazı Bileşim Özellikleri, Gıda, 23, 4, 285- 289.

- Özkan, E., 2017. Down Sendromunun Tanısına Yönelik Seçilmiş Metabolitlerin Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometrisi ile Tayini, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Ankara, 139s.
- Pasini, E., Cargnoni, A., Condorelli, E., Marzo, A., Lisciani, R. ve Ferrari, R., 1992) Effect Of Prolonged Treatment With Propionyl-L-Carnitine On Erucic Acid Induced Myocardial Dysfunction In Rats, Molecular And Cellular Biochemistry, 112(2), 117-123.
- Sahasrabudhe, M. R., 1977. Crismer Values And Erucic Acid Contents Of Rapeseed Oils, Journal of the American Oil Chemists' Society, 54,8, 323-324.
- Samur, G., 2006. Kalp Damar Hastalıklarında Beslenme, ISBN: 975-590-181-7, Sinem Matbaacılık, Ankara, 57s.
- Savaliya, M. L., Dhorajiya, B. D.ve Dholakiya, B. Z., 2015. Current Trends in Separation and Purification of Fatty Acid Methyl Ester, Separation & Purification Reviews, 44,1, 28-40.
- Sayan, A. , 1999. Beslenme Alışkanlıkları ve Temel Besin Gereksinimleri, Anadolu Hemşirelik ve Sağlık Bilimleri Dergisi, 2,2, 53-65.
- Semma, M., 2002. Trans Fatty Acids: Properties, Benefits And Risks, Journal of health science, 48,1, 7-13.
- Siri-Tarino, P. W., Sun, Q., Hu, F. B. ve Krauss, R. M., 2010. Saturated Fatty Acids and Risk of Coronary Heart Disease: Modulation by Replacement Nutrients, Current Atherosclerosis Reports, 12, 6, 384-390.
- Smith, L. M., Dunkley, W. L., Franke, A. ve Dairiki, T., 1978. Measurement Oftrans And Other Isomeric Unsaturated Fatty Acids In Butterand Margarine, Journal of the American Oil Chemists' Society, 55,2, 257-261.
- Store, S. I. S. O., 2012. International Standard ISO/ IEC Conformity Assessment General Requirements For Bodies Operating.
- Şahingöz, S. A., 2007. Omega-3 Yağ Asitlerinin İnsan Sağlığına Etkileri, Gazi Üniversitesi Endüstriyel Sanatlar Eğitim Fakültesi Dergisi, 21, 1-13.
- T.C. Resmi Gazete, Türk Gıda Kodeksi Bebek Formülleri ve Devam Formülleri Tebliği 2019/ 14, 02.07.2019. Sayı:30819, Ek- 2: Bölüm 4,3.
- T.C. Resmi Gazete, Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği, 29.12.2011. Sayı: 28157, Ekler: Bölüm 7.
- Tandoğan, M., 2012. Raloksifen'in Biyolojik Materyalden ve Farmasötik Preparattan Analizi İçin Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi Yönteminin Geliştirilmesi ve Valide Edilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 116s.
- Taşan, M. ve Geçgel, Ü., 2007. Bitkisel Karışım Sıvı Yağların Yağ Asidi Bileşimlerinin İncelenmesi, Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi, 4, 1, 6s.

- TGK 2016/4, 2016. Türk Gıda Kodeksi Belirli Gıdalarda Erusik Asit Seviyesinin Resmi Kontrolü İçin Gıdalardan Numune Alma Ve Analiz Metodu Kriterleri Tebliği.
- Tosun, A. ve Özkal, N., 2000. Kanola, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi, 29,1.
- TSE, 2016. ISO 17034 Referans Malzeme Üreticilerinin Yetkinliği İçin Genel Gerekler.
- Turan, H., Erkoyuncu, İ. ve Kocatepe, D., 2013. Omega-6, Omega-3 Yağ Asitleri ve Balık, Yunus Araştırma Bülteni, 2, 45-50.
- UGRL, 2019. Yeterlilik Test Birimi Kalite Sistem Formu, Ulusal Gıda Referans Laboratuvar Müdürlüğü Yeterlilik Test Birimi.
- URL 1: http://docs.neu.edu.tr/staff/serdar.susever/13%20kolonkromatografisi_99.pdf. 10.02.2021
- URL 2: https://rm.ume.tubitak.gov.tr/urun_grup.aspx?p=c. 26.05.2021
- Ünsal A. , 2019. Beslenmenin Önemi ve Temel Besin Öğeleri, Sağlık Bilimleri Dergisi, Ahi Evran Üniversitesi Sağlık Yüksek Okulu, Hemşirelik Bölümü, Kırşehir, 10s.
- Vaisey-Genser, M. ve Ylimaki, G., 1989. Baking With Canola Oil Products. Cereal foods world, 34, 246–255.
- Velioğlu, S. D., Temiz, H. T., Ercioğlu, E., Velioğlu, H. M., Topçu, A. ve Boyacı, I.H., 2017. Use of Raman Spectroscopy for Determining Erucic Acid Content İn Canola Oil, Food Chemistry, 221, 87- 90.
- Venelinov, T. ve Quevauviller, P., 2003. Are certified reference materials really expensive, TrAC Trends Anal. Chem., 22, 15-18.
- Wise, S. A., 2018. What İs Novel About Certified Reference Materials, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 410, 2045–2049.
- Yakar, Y., Tekeli, Y., Duru, M., Danahaliloğlu, H. ve Bucak, S., 2014. Aspir Tohumu Katkılı Karma Yemle Beslemenin Yumurta Yağ Asitleri Kompozisyonuna Etkisi, Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 19, 1, 44-55.
- Yalçın, İ., Özden, S., 2004. Farmasötik Kimya Pratikleri 1-2, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Ankara Üniversitesi Basımevi, ISBN : 975-482-649-8, Ankara, 183s.
- Yaprakçı, A., 2009. Zeytin Asit Yağının Süperkritik Metanol Ortamında Esterleştirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 53s.
- Yaşar, T., 2004. Morina Karaciğer Yağından Enzimatik Hidroliz ile DHA'nın Zenginleştirilmesinde Enzim Miktarı ve Sürenin Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 119s.
- Yeltekin, A. Ç., 2012. Alabalıklarda (Oncorhynchus Mykiss) Yağ Asiti ve Önemi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 17,2, 118-123.

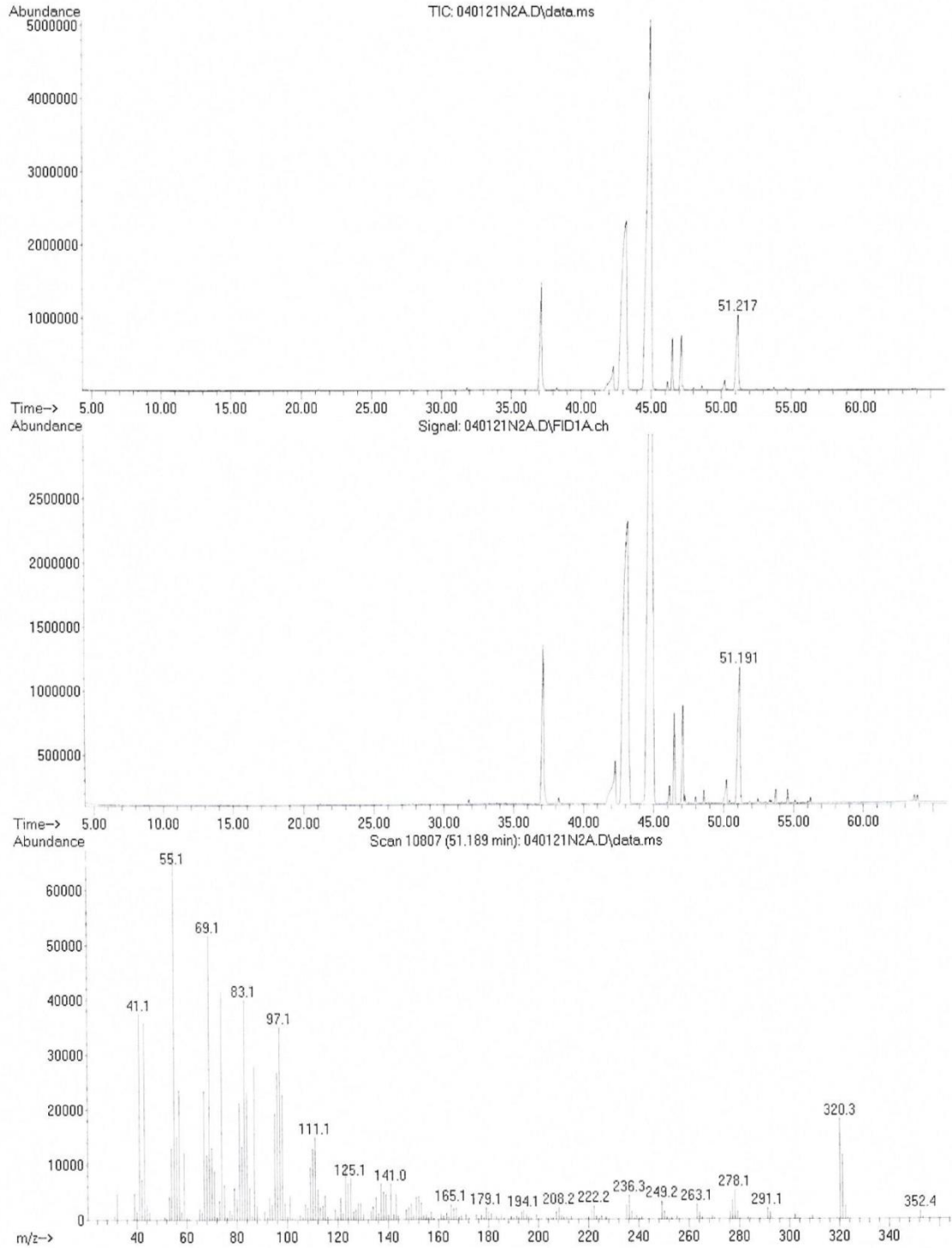
Zakaria, O., & Rezali, M.F., 2014. Referans Materials as a Crucial Tools for Validation and Verification of the Analytical Process, *Procedia- Social and Behavioral Sciences*, 121, 204-213.

6. EKLER



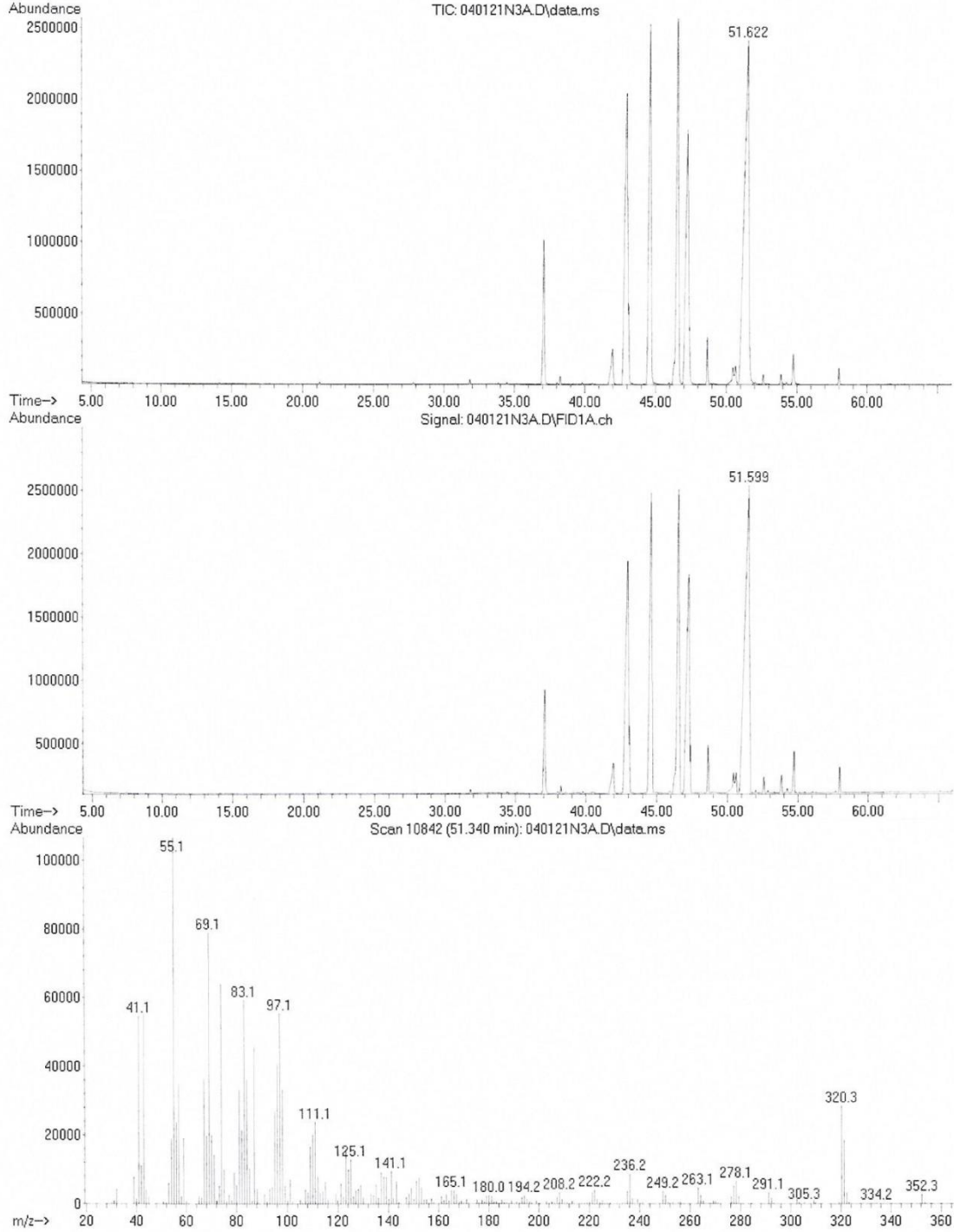
Şekil 6.1. Sarı hardal yağına ait MS, FID ve MS spektrumu.

File :C:\msdchem\1\data\CEMO\Erusik Asit\040121N2A.D
Operator :
Acquired : 4 Jan 2021 16:56 using AcqMethod YAG.M
Instrument : GCMS
Sample Name: 040121N2A Hardal Tohum Yağı
Misc Info :
Vial Number: 3



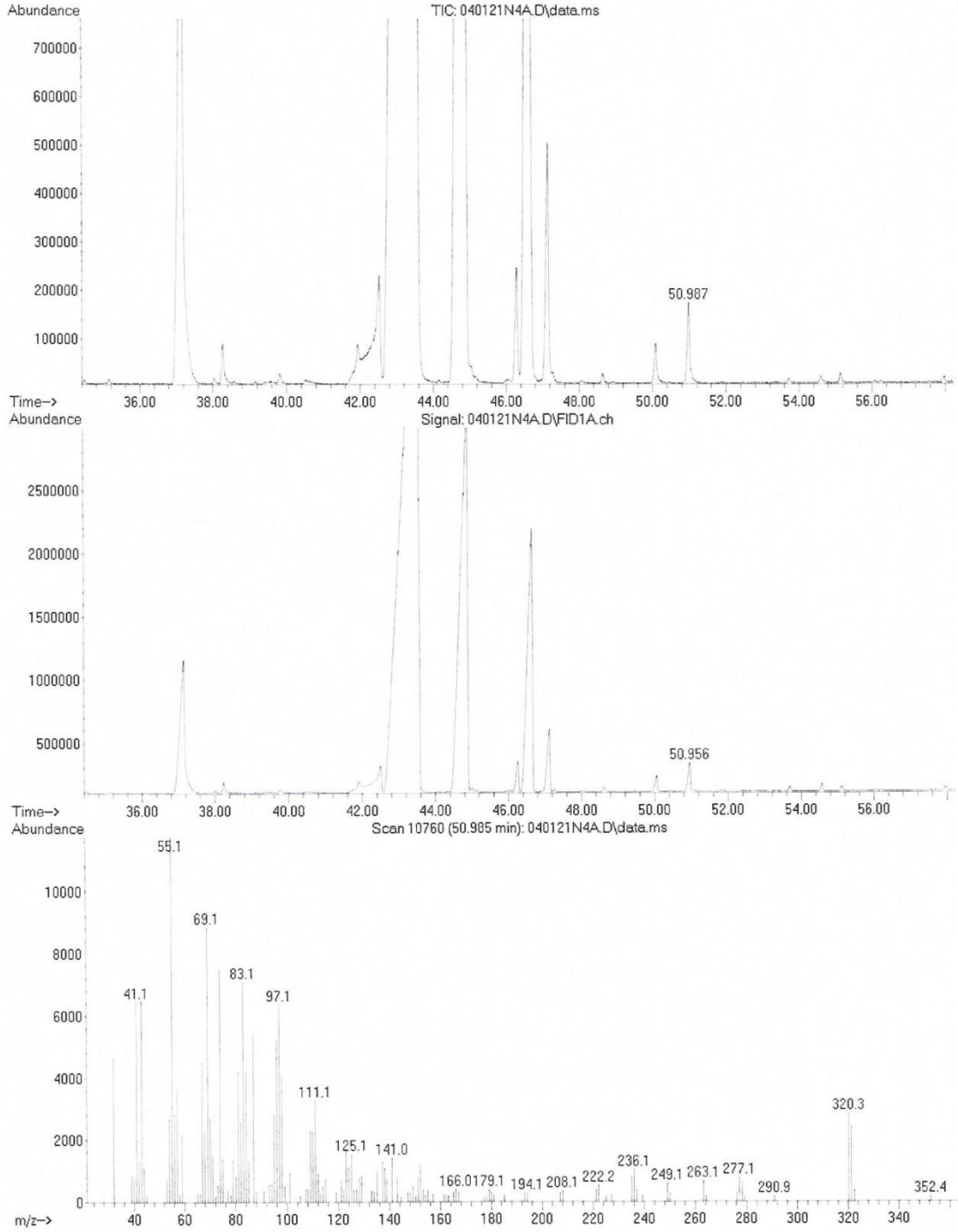
Şekil 6.2. Hardal tohum yağına ait MS, FID ve MS spektrumu.

File : C:\msdchem\1\data\CEMO\Erusik Asit\040121N3A.D
Operator :
Acquired : 4 Jan 2021 18:20 using AcqMethod YAG.M
Instrument : GCMS
Sample Name : 040121N3A Siyah Hardal Yağı
Misc Info :
Vial Number : 5



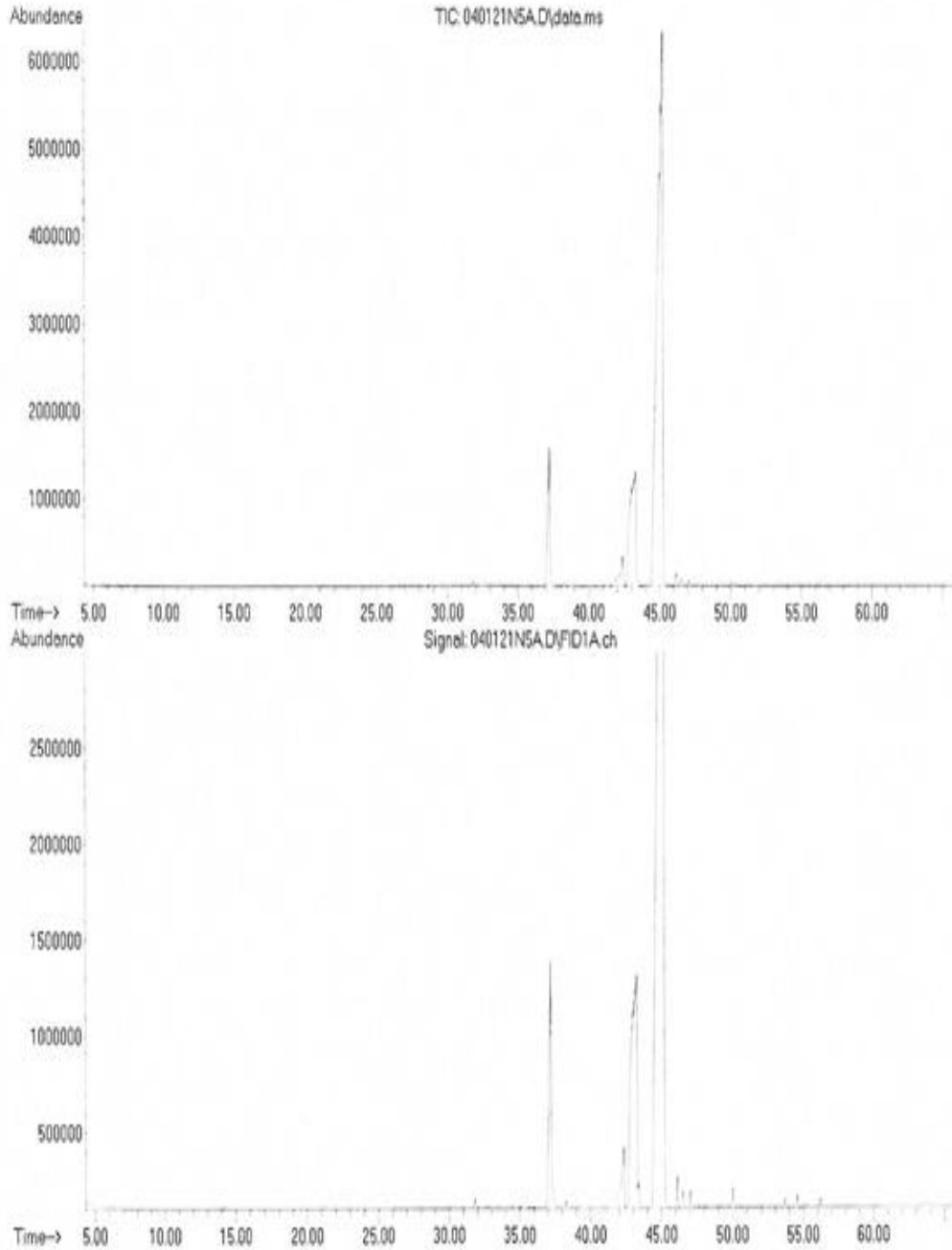
Şekil 6.3. Siyah hardal tohum yağına ait MS, FID ve MS spektrumu.

File :C:\msdchem\1\data\CEMO\Erusik Asit\040121N4A.D
Operator :
Acquired : 4 Jan 2021 20:43 using AcqMethod YAG.M
Instrument : GCMS
Sample Name: 040121N4A Kolza Yağı
Misc Info :
Vial Number: 7



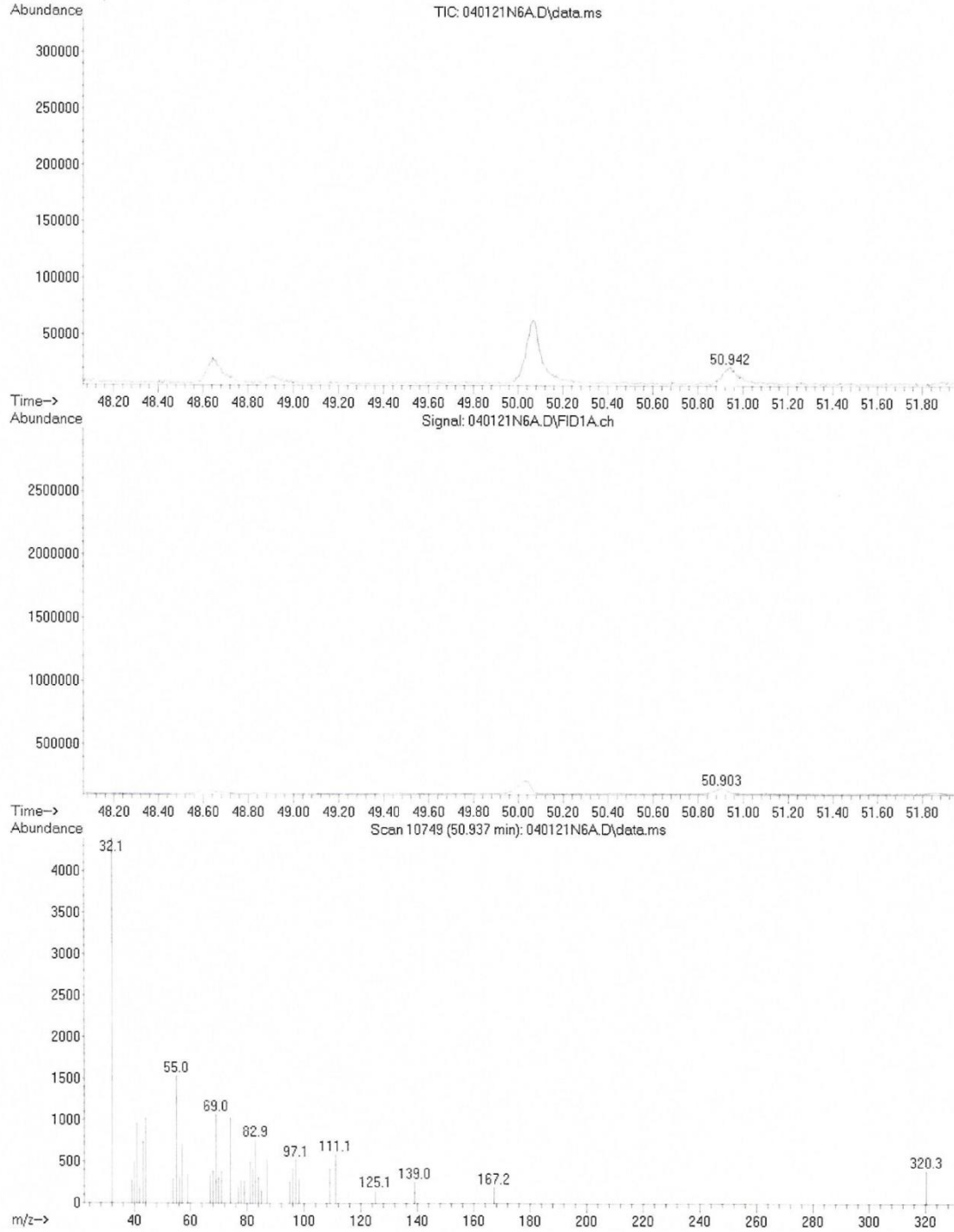
Şekil 6.4. Kolza yağına ait MS, FID ve MS spektrumu.

File : C:\msdchem\1\data\CEMO\Erusik Asit\040121N5A.D
Operator
Acquired : 4 Jan 2021 23:06 using AcqMethod YAG.M
Instrument : GCMS
Sample Name: 040121N5A Aspir Yağı
Misc Info
Vial Number: 9



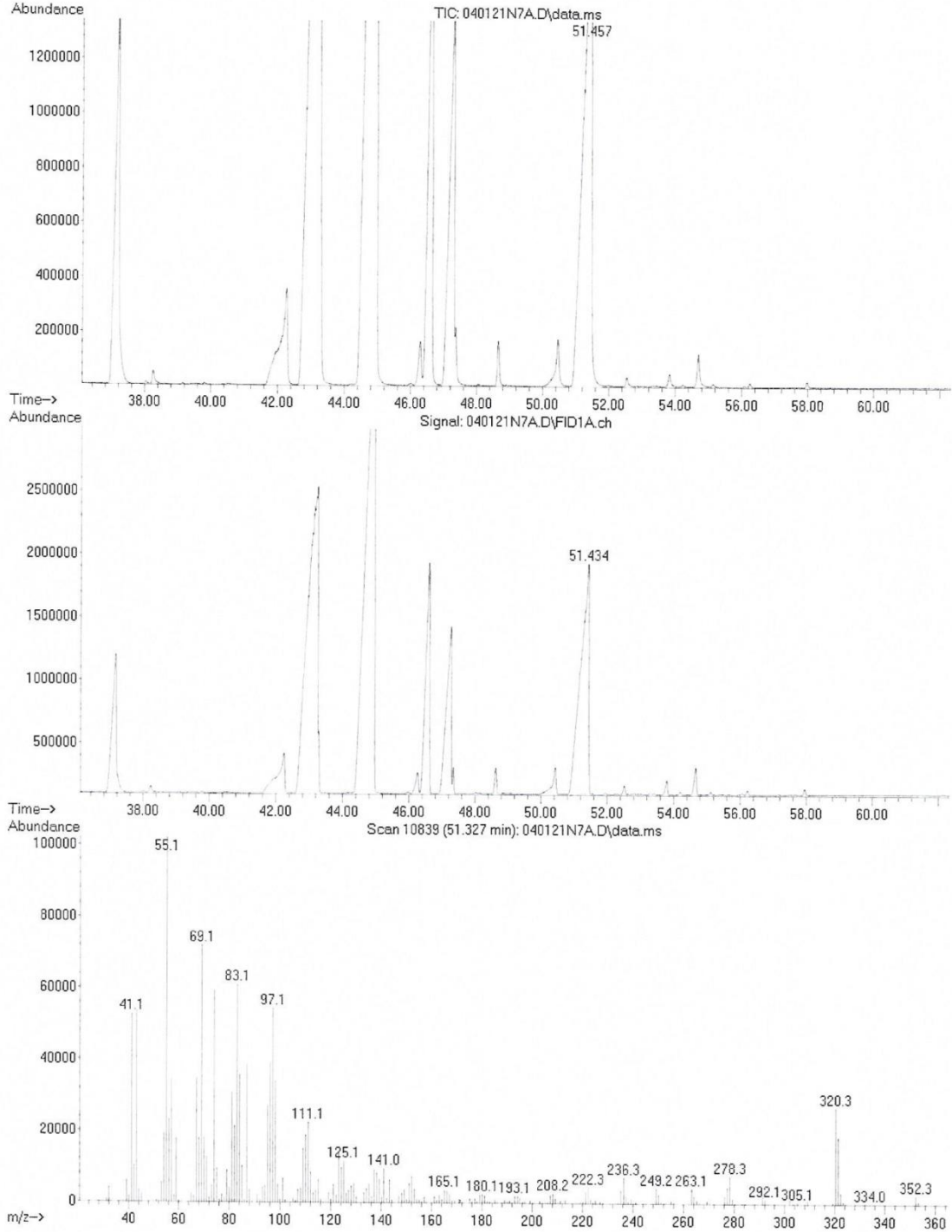
Şekil 6.5 Aspir yağına ait MS, FID ve MS spektrumu.

File : C:\msdchem\1\data\CEMO\Erusik Asit\040121N6A.D
Operator :
Acquired : 5 Jan 2021 1:29 using AcqMethod YAG.M
Instrument : GCMS
Sample Name: 040121N6A Kanola Yağı
Misc Info :
Vial Number: 11



Şekil 6.6 Kanola yağına ait MS, FID ve MS spektrumu.

File : C:\msdchem\1\data\CEMO\Erusik Asit\040121N7A.D
Operator :
Acquired : 5 Jan 2021 3:51 using AcqMethod YAG.M
Instrument : GCMS
Sample Name: 040121N7A Piyasadan Alinan Hardal Yağı
Misc Info :
Vial Number: 13



Şekil 6.7 Piyasadan alınan hardal yağına ait MS, FID ve MS spektrumu.

ÖZGEÇMİŞ

2010 yılında Gümüşsuyu ilköğretim okulunda ilköğretim ve ortaöğretimini, 2014 yılında 19 Eylül Kız Teknik ve Meslek Lisesi'nde lise öğrenimini tamamladı. 2014 'de Gümüşhane Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü' nü kazandı ve 2018 yılında mezun oldu. 2018' de Gümüşhane Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitime başladı. Yüksek Lisans eğitime halen devam etmektedir.