




**T.C.**

**SELÇUK ÜNİVERSİTESİ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

# BİTKİSEL YAĞ ANALİZLERİ İÇİN GECİKTİRMELİ VE ÖN DERİŞTİRMELİ SPE SİSTEMLERİNİN FIA-HPLC SİSTEMLERİNE ENTEGRASYONU VE UYGULAMALARININ GELİŞTİRİLMESİ

**Fatma Nur ARSLAN**

**DOKTORA TEZİ**

**Kimya Anabilim Dalı**

**Eylül-2015**
**KONYA**
**Her Hakkı Saklıdır**

## TEZ KABUL VE ONAYI

Fatma Nur ARSLAN tarafından hazırlanan "Bitkisel Yağ Analizleri için Geciktirmeli ve Ön Deriştirmeli SPE Sistemlerinin FIA-HPLC Sistemlerine Entegrasyonu ve Uygulamalarının Geliştirilmesi" adlı tez çalışması 30.09.2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

| **Jüri Üyeleri** | **İmza** |
|---|---|
| **Başkan**<br>Prof. Dr. Adnan KENAR | ..... |
| **Danışman**<br>Prof. Dr. Hüseyin KARA | ..... |
| **Üye**<br>Prof. Dr. Zafer YAZICIGİL | ..... |
| **Üye (TİK Üyesi)**<br>Doç. Dr. Ecir YILMAZ | ..... |
| **Üye (TİK Üyesi)**<br>Doç. Dr. Semahat KÜÇÜKKOLBAŞI | ..... |

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aşır GENÇ
FBE Müdürü

Bu tez çalışması; TÜBİTAK Kimya Biyoloji Araştırma Destek Grubu tarafından 112T373 nolu 1001 araştırma projesi ve S.Ü. BAP tarafından 11201063 ve 12401045 nolu projeler ile desteklenmiştir.

## TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

## DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

İmza

Fatma Nur ARSLAN

Tarih: 30/09/2015

# ÖZET

## DOKTORA TEZİ

## BİTKİSEL YAĞ ANALİZLERİ İÇİN GECİKTİRMELİ VE ÖN DERİŞTİRMELİ SPE SİSTEMLERİNİN FIA-HPLC SİSTEMLERİNE ENTEGRASYONU VE UYGULAMALARININ GELİŞTİRİLMESİ

**Fatma Nur ARSLAN**

**Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**
**Kimya Anabilim Dalı**

**Danışman: Prof. Dr. Hüseyin KARA**

**2015, 330 Sayfa**

**Jüri**
**Prof. Dr. Hüseyin KARA**
**Prof. Dr. Adnan KENAR**
**Prof. Dr. Zafer YAZICIGİL**
**Doç. Dr. Ecir YILMAZ**
**Doç. Dr. Semahat KÜÇÜKKOLBAŞI**

Bitkisel yağlar esas olarak trigliserit molekülleri ve farklı kimyasal yapılı bileşiklerin oluşturduğu kompleks bir karışım olan minör bileşenlerden oluşmaktadır. Trigliserit molekülleri yağ içerisinde yüksek miktarda bulunmaları (~95-98%) nedeniyle *temel bileşenler*; karakteristik özellikleri kazandıran minör bileşenler (~5-2%) ise *ikincil bileşenler* olarak adlandırılmaktadır.

Yağların kalitesi, kaynağı, tağşişi ve diğer bazı özelliklerinin belirlenebilmesi için, yağlarda bulunan bir çok bileşenin çeşitli analitik yöntemler kullanılarak tayin edilmesi gerekmektedir. Bu tayinler genellikle standart metotlar olarak bilinen metotlar kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Yağların özelliklerinin belirlenmesinde kullanılan standart metotların uygulamaları ve gerektirdiği ön işlemler; oldukça maliyetli, zaman alan, zahmetli ve çevre açısından tehlike oluşturan çözücülerin fazla miktarda kullanımını gerektirmektedir. Bu nedenle; uygulanmakta olan standart metotlara alternatif olabilecek, çevre dostu yeni yağ analiz metotlarının geliştirilmesi gerekmektedir.

Sunulan çalışma ile; birçok yağ analizinin ön işlem basamağında yer alan SPE tekniğinin, FIA ve HPLC sistemlerine entegrasyonu ile, bitkisel yağlarda mevcut türlerin tek bir enjeksiyon ile 3 boyutlu kromatografik tayinleri için; numune ön işlemlerinin on-line gerçekleştirilebildiği ve analizci müdahalesinin en aza indirildiği "*On-line SPE-FIA-HPLC yağ analiz sistemi*" oluşturulmuş ve sistem üzerinde yeni yağ analiz metotlarının geliştirilip/ uygulanabilirliği gerçekleştirilmiştir.

Dünyada ve Türkiye'de ilk kez geliştirilen bu yeni analiz sistemi; HPLC sistemine değişik özelliklerdeki kolon, dedektör, çok yollu valf sistemleri ve bağlantı elamanlarının adapte edilmesi ile

oluşturulmuştur. Yağların özelliklerinin belirlenmesinde önem arz eden ve genellikle standart metotlar kullanılarak gerçekleştirilen *trigliserit, sterol, tokol, digliserit, monogliserit, FFA* ve *fosfolipit tayinlerinin* her birisi, oluşturulan bu yeni sistem üzerinde denenmiş ve önemli deneysel parametrelerin optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Deneysel parametrelerin optimizasyonu için kemometrik yaklaşım izlenerek deneysel tasarım çalışmaları uygulanmıştır. Optimum parametreler kullanılarak yürütülen analizler için; lipit standartlarının yanında ayçiçek, mısır, pamuk, soya, kanola, palm, zeytinyağı gibi farklı özellikteki bitkisel yağ numuneleri de kullanılmıştır.

Sonuç olarak; bitkisel yağların özelliklerini belirlemede önem arz eden tayinlerin tamamının, numune ön işlemlerinin on-line gerçekleştirildiği tek bir analiz sistemi üzerinde, tek bir enjeksiyon ile yapılabilirliği dünya literatüründe ilk kez önerilmiş ve kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Elde edilen veriler neticesinde; yağlarda mevcut lipit türlerinin tayini için daha kısa sürede, yüksek oranda iyileştirilmiş ayrımların elde edilebildiği analizler gerçekleştirilebilmiştir. Çalışmanın sanayi uygulaması ile; ülkemiz yağ sektörü açısından son derece önem arz eden analizlerin, otomatikleştirilmiş sistemlerde gerçekleştirilmesine imkan sağlanacaktır.

Yağlarda mevcut farklı fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip önemli türlerin tayini için; özel bir sistem dizaynı ve enstrümantasyonu ile tamamlanan bu yeni sistem uygulamasının, "*modern birleştirilmiş analiz sistemlerinin geliştirilmesi ve uygulamaları*" ile ilgilenen araştırmacılar için yeni ufuklar açacağı kanaatindeyiz.

**Anahtar Kelimeler:** Bitkisel yağ, Lipit, 3-boyutlu kromatografi, SPE, HPLC, FIA, Birleştirilmiş analiz sistemi, Kemometri

## ABSTRACT

## Ph.D THESIS

## INTEGRATION OF THE RETARDED AND PRE-CONCENTRATED SPE SYSTEMS TO FIA-HPLC SYSTEMS FOR VEGETABLE OIL ANALYSIS AND IMPROVEMENT OF IT'S APPLICATIONS

**Fatma Nur ARSLAN**

**THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF SELCUK UNIVERSITY**
**DOCTOR OF SCIENCE PHILOSOPHY**
**IN CHEMISTRY**

**Advisor: Prof. Dr. Hüseyin KARA**

**2015, 330 Pages**

**Jury**
**Prof. Dr. Hüseyin KARA**
**Prof. Dr. Adnan KENAR**
**Prof. Dr. Zafer YAZICIGİL**
**Assoc. Prof. Dr. Ecir YILMAZ**
**Assoc. Prof. Dr. Semahat KÜÇÜKKOLBAŞI**

Vegetable oils are composed mainly triglyceride molecules and minor components that are a mixture of complex compounds formed different chemical structure. Triglyceride molecules are called as basic components of the oil due to the high amounts (~95-98%) according to the other components; minor compounds (~5-2%) that determine the characteristics of oils, are called as secondary components of the oil.

To determine the quality of extraction and refinery process conditions used for crude and refined oil, detection source of the oil and oil adulteration, the main (triglycerides) and secondary components (minor compounds) must be identify as qualitative and quantitative by applying various analytical methods. These oil analysis are generally carried out by using several methods as known standard methods. The standard methods, other methods and front procedures applied for oil analysis, that are required for quality-control determination of the oils; are very costly, time-consuming, laborious and requires the use of large amounts of solvents that may be dangerous to the health of the environment. Therefore; the new alternative methods must be developed and optimized supporting conservation in term of time and solvent, environmentally friendly.

With this study a new "On-line SPE-FIA-HPLC oil analysis system" was developed for three-dimensional chromatographic analysis of vegetable oils with a single injection, that allow the automatic sample pre-treatments and a results can be achieved by minimizing the analyst intervention, by

integration of the SPE technique that being implemented to pre-treatment step of many oil analysis to the FIA and HPLC systems and gained the applicability of new oil analysis methods with this system.

This system was recommended in the world and Turkey for the first time and developed by adapting the various detectors, columns, multi-valve systems and necessary system components to the HPLC system in chemistry laboratory. By means of the SPE-HPLC-FIA hyphenated system, the quality control analysis of vegetable oils, such as triglyceride, sterol, tocols, diglycerides, monoglycerides, free fatty acids and phospholipid analyses, were achieved and the pre-treatment procedures were carried out as on-line over the system. For method optimization studies, the experimental designs were utilized by using a chemometric approach and different vegetable oil samples, such as sunflower, corn, cottonseed, soybean, canola, were used.

Consequently, the study suggested that all quality-control determinations/analysis of vegetable oils could be done in a single analysis system, by performing the sample pre-treatments as on-line with a single injection in the literature for the first time. The results indicate that the lipid analysis could be done in a short time and separations could be carried out with highly improved separation. In addition, if this application goes to the industrial application work, it will be a national resource for other research or implementation activities related to oil analysis and allows the analysis that are extremely significant for our country's oil sector could be carried out by minimizing the analyst intervention on automated systems. We believe that the study, completed with a special system design and instrumentation, will open new horizons for the researchers interested in "*the development & implementation of modern unified analysis systems*".

**Keywords:** Vegetable oil, Lipids, Three-dimensional chromatography, SPE, HPLC, FIA, Hyphaneted/ Multi-dimensional separation system, Chemometrics

# ÖNSÖZ

Sunulan bu çalışma, Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyelerinden Prof. Dr. Hüseyin KARA danışmanlığında tamamlanarak, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'ne Doktora Tezi olarak sunulmuştur.

Sunulan tez çalışmasının, modern birleştirilmiş analiz sistemlerinin geliştirilmesi ve uygulamaları ile ilgilenen araştırmacılar için yeni ufuklar açması ve faydalı olması dilek ve temennisiyle; çalışmada emeği geçen ve aşağıda isimleri zikredilen hocalarıma ve arkadaşlarıma şükranlarımı sunmak isterim.

Tez çalışması süresince engin bilgi ve tecrübesinden yararlandığım, maddi ve manevi desteğiyle her zaman yanımda olan ve hayatıma değer katan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Hüseyin KARA beyefendiye sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Tez izleme komitesi üyesi; Doç. Dr. Ecir YILMAZ ve Doç. Dr. Semahat KÜÇÜKKOLBAŞI hocalarıma bilimsel katkılarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmaların yürütülebilmesi için gerekli mali kaynağı, 112T373 nolu 1001-araştırma projesi ile sağlayan TÜBİTAK Kimya Biyoloji Araştırma Destek Grubuna ve 11201063 ve 12401045 nolu projeler ile destekleyen S.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğüne teşekkürlerimi sunarım.

Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölüm Başkanı Prof. Dr. İbrahim YILMAZ hocam başta olmak üzere; çalışmalarım süresince desteklerini esirgemeyen Kimya Bölümünün değerli öğretim üyeleri; Prof. Dr. Fevzi KILIÇEL, Yrd. Doç. Dr. Aysel ÇİMEN, Yrd. Doç. Dr. Oktay TALAZ'a ve göstermiş oldukları dostluktan ötürü arkadaşlarım Arş. Gör. H. Nevin GENÇ, Arş. Gör. Hacer AZAK ve Arş. Gör. Ş. Nihan KARUK'a teşekkürlerimi sunarım.

Deneysel çalışmalarım süresince kemometri konusundaki bilgi ve tecrübelesi ile beni yönlendiren Prof. Dr. Adnan KENAR hocama sonsuz şükranlarımı sunarım. Maddi ve manevi desteklerinden ötürü, Yrd. Doç. Dr. Fatih DURMAZ ve Arş. Gör. İsmail TARHAN'a teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmalarım sırasında güzel bir çalışma ortamının oluşmasını sağlayan, dostlukları ve fedakarlığıyla manevi açıdan desteklerini ve hürmetlerini esirgemeyen; Ayça Nesibe ŞAPCI, Aslan TAŞ, Huriye ÇAKIR TAŞ, Hacer KAPLAN, Fatma DURU ve Mehmet Tansel SARI'ya sonsuz sevgi ve şükranlarımı sunarım. Laboratuarımıza kattıkları güzellikleri ve değerleri

unutamayacağım Pakistanlı dostlarım Dr. Saba NAZ, Dr. Fakhar-un Nisa MEMON ve Dr. M. Younis TALPUR'a teşekkürlerimi sunarım.

Sağlam karakterleri ve dürüstlükleri ile hayatıma değerler katan, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen sevgili dostlarım; A. Gökçen SARAÇ GENCER, Havva Nur TURGUT, Ferda ÖZÇANAK GÜNEŞ ve Beyza DİZBAY YÜZBAŞIOĞLU'na sonsuz sevgi ve şükranlarımı sunarım.

*Ve; çalışmalarım süresince dualarını ve desteklerini benden esirgemeyen aileme; annem Fadime ARSLAN, babam Mehmet ARSLAN, kardeşlerim Sümeyye ARSLAN ve Adem ARSLAN'a sonsuz sevgi ve şükranlarımı sunarım.*

Fatma Nur ARSLAN
KONYA-2015

*"İhya etmek için ne kadar ilim lazımsa, imha için de o kadar cehalet kafidir..."*

*Necip Fazıl KISAKÜREK*

# İÇİNDEKİLER

**ÖZET** ..... **iv**

**ABSTRACT** ..... **vi**

**ÖNSÖZ** ..... **viii**

**İÇİNDEKİLER** ..... **x**

**ŞEKİLLER DİZİNİ** ..... **xiv**

**ÇİZELGELER DİZİNİ** ..... **xxiii**

**SİMGELER VE KISALTMALAR** ..... **xxvi**

**1. GİRİŞ** ..... **1**

**1.1. Yağın Tanımı ve Önemi** ..... **2**

**1.2. Yağların Sınıflandırılması** ..... **3**

**1.3. Yağların Karakterizasyonu ve Lipit Türlerinin Özellikleri** ..... **5**

1.3.1. Nötral lipitler ..... 6

1.3.2. Polar lipitler ..... 16

**1.4. Yağ Analizleri için Uygulanan Analitik Yöntemler** ..... **19**

1.4.1. Klasik analitik yöntemler ..... 19

1.4.2. Modern analitik yöntemler ..... 20

1.4.2.1. Katı faz ekstraksiyon (SPE) tekniği ..... 21
1.4.2.2. Kromatografi tekniği ..... 22
1.4.2.3. Akış enjeksiyon analiz (FIA) tekniği ..... 29
1.4.2.4. Diğer analiz teknikleri ..... 29

**1.5. Birleştirilmiş Analitik Yöntemler: Teorik Temelleri, Enstrümantasyonu ve Uygulamaları** ..... **31**

1.5.1. Çok boyutlu ayırma yöntemleri ..... 31

1.5.2. Birleştirilmiş analiz sistemleri ..... 34

1.5.2.1. Valf sistemleri ..... 34

1.5.3. Birleştirilmiş analiz sistemi uygulamaları ..... 35

**2. KAYNAK ARAŞTIRMASI** ..... **37**

**2.1. Tez Çalışmasının Amacı** ..... **49**

**3. MATERYAL VE YÖNTEM** ..... **52**

**3.1. Kullanılan Kimyasallar, Çözeltiler ve Hareketli Faz Sistemleri** ..... **52**

**3.2. Kullanılan Analiz Sistemleri / Cihazlar** ..... **55**

**3.3. On-line SPE-FIA-HPLC Yağ Analiz Sisteminin İşleyişi ..... 56**

**3.4. On-line SPE-FIA-HPLC Yağ Analiz Sisteminde Uygulanan Yöntemler ..... 59**

3.4.1. SPE tekniğinin uygulandığı I. boyut ayrım ($1^{st}$-D) analizleri ..... 60

3.4.1.1. Hareketli faz türü etkisi ..... 63
3.4.1.2. Numune miktarı etkisi ..... 63
3.4.1.3. Sıcaklık etkisi ..... 64
3.4.1.4. Akış hızı etkisi ..... 64
3.4.1.5. ELSD sistemi nebülizasyon ve buharlaştırma sıcaklığı etkisi ..... 65

3.4.2. NP-HPLC tekniğinin uygulandığı II. boyut ayrım ($2^{nd}$-D) analizleri ..... 66

3.4.2.1. Numune çözücü türü etkisi ..... 70
3.4.2.2. Numune miktarı etkisi ..... 70
3.4.2.3. Akış hızı etkisi ..... 70
3.4.2.4. Sıcaklık etkisi ..... 70
3.4.2.5. Sabit faz türü etkisi ..... 71
3.4.2.6. Azot gazı akış hızı etkisi ..... 71
3.4.2.7. ELSD sistemi nebülizasyon ve buharlaştırma sıcaklığı etkisi ..... 71
3.4.2.8. ELSD parametrelerinin kemometrik yöntem ile optimizasyonu ..... 71
3.4.2.9. Lipit standartları ile yürütülen kalibrasyon çalışmaları ..... 73

3.4.3. NP-HPLC, RP-HPLC ve $Ag^{+}$-HPLC tekniğinin uygulandığı III. boyut ayrım ($3^{rd}$-D) analizleri ..... 74

3.4.3.1. NP-HPLC tekniğinin uygulandığı III. boyut ayrım analizleri ..... 76
3.4.3.2. RP-HPLC tekniğinin uygulandığı III. boyut ayrım analizleri ..... 76
3.4.3.3. $Ag^{+}$-HPLC tekniğinin uygulandığı III. boyut ayrım analizleri ve kemometrik yöntem ile metot optimizasyonu ..... 78

3.4.4. SPE ve NP-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı I. ve II. boyut ayrım ($1^{st}$-D & $2^{nd}$-D) analizleri ..... 80

3.4.4.1. Numune çözücü türü etkisi ..... 86
3.4.4.2. Akış hızı etkisi ..... 86
3.4.4.3. Valf pozisyonlarının değiştirilme süresinin etkisi ..... 86
3.4.4.4. Azot gazı akış hızı etkisi ..... 86
3.4.4.5. Sabit ve hareketli faz türü etkisi ..... 87

3.4.5. NP-HPLC, FIA ve $Ag^{+}$-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı II. ve III. boyut ayrım ($2^{nd}$-D & $3^{rd}$-D) analizleri ..... 89

3.4.5.1. Sabit ve hareketli faz türü etkisi ..... 95
3.4.5.2. Valf pozisyonlarının değiştirilme sürelerinin etkisi ..... 95

3.4.6. SPE, NP-HPLC, FIA ve $Ag^{+}$-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı I., II. ve III. boyut ayrım ($1^{st}$-D & $2^{nd}$-D & $3^{rd}$-D) analizleri ..... 96

3.4.6.1. Valf pozisyonlarının değiştirilme sürelerinin etkisi ..... 101

**3.5. Standart Yağ Analiz Metotları ..... 105**

3.5.1. Trigliserit Analizi (AOCS Ce 5b-89, Standart Metot) ..... 105

3.5.2. Tokol (Tokoferol ve Tokotrienol) Analizi (AOCS Ce 8-89, Standart Metot) ..... 106

**4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA ..... 107**

**4.1. On-line SPE-FIA-HPLC Yağ Analiz Sisteminde Uygulanan Yöntemler ..... 107**

4.1.1. SPE tekniğinin uygulandığı I. boyut ayrım ($1^{st}$-D) analizleri ..... 107

4.1.1.1. Hareketli faz türü etkisi ..... 108
4.1.1.2. Numune miktarı etkisi ..... 110
4.1.1.3. Sıcaklık etkisi ..... 112
4.1.1.4. Akış hızı etkisi ..... 113
4.1.1.5. ELSD sistemi nebülizasyon ve buharlaştırma sıcaklıklarının etkisi ..... 115
4.1.1.6. Optimum şartlarda gerçekleştirilen yağ analizleri ..... 117

4.1.2. NP-HPLC tekniğinin uygulandığı II. boyut ayrım ($2^{nd}$-D) analizleri ..... 120

4.1.2.1. Numune çözücü türü etkisi ..... 121
4.1.2.2. Numune miktarı etkisi ..... 125
4.1.2.3. Akış hızı etkisi ..... 127
4.1.2.4. Sıcaklık etkisi ..... 129
4.1.2.5. Sabit faz türü etkisi ..... 130
4.1.2.6. Azot gazı akış hızı etkisi ..... 132
4.1.2.7. ELSD sistemi nebülizasyon ve buharlaştırma sıcaklığı etkisi ..... 134
4.1.2.8. ELSD parametrelerinin kemometrik yöntem/ tepki yüzeyi metodolojisi ile optimizasyonu ..... 136
4.1.2.9. Lipit standartları ile yürütülen kalibrasyon çalışmaları ..... 147
4.1.2.10. Optimum şartlarda gerçekleştirilen yağ analizleri ..... 188

4.1.3. NP-HPLC, RP-HPLC ve $Ag^{+}$-HPLC tekniğinin uygulandığı III. boyut ayrım ($3^{rd}$-D) analizleri ..... 190

4.1.3.1. NP-HPLC tekniğinin uygulandığı III. boyut ayrım analizleri ..... 190
4.1.3.2. RP-HPLC tekniğinin uygulandığı III. boyut ayrım analizleri ..... 197
4.1.3.3. $Ag^{+}$-HPLC tekniğinin uygulandığı III. boyut ayrım analizleri ve kemometrik yöntem ile optimizasyonu ..... 200

4.1.4. SPE ve NP-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı I. ve II. boyut ayrım ($1^{st}$-D & $2^{nd}$-D) analizleri ..... 210

4.1.4.1. Numune çözücü türü etkisi ..... 211
4.1.4.2. Akış hızı etkisi ..... 213
4.1.4.3. Valf pozisyonlarının değiştirilme sürelerinin etkisi ..... 214
4.1.4.4. Azot gazı akış hızı etkisi ..... 216
4.1.4.5. Sabit ve hareketli faz türü etkisi ..... 218

4.1.5. NP-HPLC, FIA ve $Ag^{+}$-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı II. ve III. boyut ayrım ($2^{nd}$-D & $3^{rd}$-D) analizleri ..... 226

4.1.5.1. Sabit faz ve hareketli faz türü etkisi ..... 227
4.1.5.2. Valf pozisyonlarının değiştirilme sürelerinin etkisi ..... 234

4.1.6. SPE, NP-HPLC, FIA ve $Ag^{+}$-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı I., II. ve III. boyut ayrım ($1^{st}$-D & $2^{nd}$-D & $3^{rd}$-D) analizleri ..... 253

4.1.6.1. Valf pozisyonlarının değiştirilme sürelerinin etkisi ..... 255

**4.2. Standart Yağ Analiz Metotları ..... 266**

4.2.1. Trigliserit Analiz Sonuçları ..... 266
4.2.2. Tokol (Tokoferol ve Tokotrienol) Analiz Sonuçları ..... 269
**5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER ..... 272**
**KAYNAKLAR ..... 283**
**EKLER..... 290**
**ÖZGEÇMİŞ..... 301**

# ŞEKİLLER DİZİNİ


**Şekil 1. 1.** Stearik, linoleik ve linolenik asitten oluşan trigliserit molekülünün oluşum reaksiyonu....8

**Şekil 1. 2.** Trigliserit, digliserit ve monogliserit bileşenlerine ait kimyasal yapılar....9

**Şekil 1. 3.** Linoleik ve linolenik asitten oluşan 1,2-digliserit molekülüne ait kimyasal yapı....10

**Şekil 1. 4.** Linolenik asitten oluşan monogliserit molekülüne ait kimyasal yapı....10

**Şekil 1. 5.** Tokoferol ve tokotrienol izomerlerine ait kimyasal yapılar....12

**Şekil 1. 6.** Siklopentanopentanentren (steran) halkasına ait kimyasal yapı....13

**Şekil 1. 7.** Bitkisel yağlarda mevcut bazı sterol türlerine ait kimyasal yapılar....14

**Şekil 1. 8.** Skualen bileşiğine ait kimyasal yapı....15

**Şekil 1. 9.** Fosfolipit bileşiğine ait genel kimyasal yapı....16

**Şekil 1. 10.** Bitkisel yağlarda mevcut bazı fosfolipit türlerine ait kimyasal yapılar....17

**Şekil 1. 11.** Lipit türlerinin tek ve iki boyutlu İTK ayrımına ait şematik gösterim....25

**Şekil 1.12.** Modern analiz sistemlerinde, pik seçimli (heart-cutting) MD-HPLC tekniğinin uygulandığı sisteme ait şematik gösterim....33

**Şekil 1. 13.** Farklı port ve pozisyon sayısına sahip yönlendirme valf sistemleri....35

**Şekil 1. 14.** Valf sistemlerinin farklı işlevlerine ait şematik gösterim....36

**Şekil 2. 1.** SPE tekniği ile farklı lipit türlerinin ayrımı....39

**Şekil 2. 2.** SPE tekniği ile lipit türlerinin ayrımına dair şematik gösterim....39

**Şekil 2.3.** İTK tekniği ile lipit türlerinin tek boyutlu kromatografik ayrımının optimizasyonu....42

**Şekil 2. 4.** İTK tekniği ile lipit türlerinin iki boyutlu kromatografik ayrımının optimizasyonu....43

**Şekil 2. 5.** İTK tekniği ile lipit türlerinin iki boyutlu kromatografik ayrımının optimizasyonu....44

**Şekil 2. 6.** Fosfolipit türlerinin tayini için geliştirilen on-line birleştirilmiş analiz sistemine ait şematik gösterim....45

**Şekil 2. 7.** Trigliserit türlerinin çok boyutlu kromatografi tekniği ile tayini için geliştirilen on-line birleştirilmiş analiz sistemine ait şematik gösterim....46

**Şekil 2. 8.** Mısır yağındaki trigliserit türlerinin çok boyutlu kromatografi tekniği ile tayini için geliştirilen on-line birleştirilmiş analiz sistemine ait şematik gösterim....47

**Şekil 3. 1.** HPLC sisteminin modifiye edilmesi ile oluşturulan On-line SPE-FIA-HPLC yağ analiz sistemine ait şematik gösterim....58

**Şekil 3. 2.** SPE tekniğinin uygulandığı I. boyut ayrım analizlerine ait şematik gösterim....60

**Şekil 3. 3.** SPE tekniğinin uygulandığı I. boyut ayrım analizleri için On-line SPE-FIA-HPLC yağ analiz sisteminin işleyişine ait şematik gösterim....61

**Şekil 3. 4.** ELSD sisteminin işleyişine ait şematik gösterim....65

**Şekil 3. 5.** NP-HPLC tekniğinin uygulandığı II. boyut ayrım analizlerine ait şematik gösterim.....66

**Şekil 3. 6.** NP- HPLC tekniğinin uygulandığı II. boyut ayrım analizleri için On-line SPE-FIA-HPLC yağ analiz sisteminin işleyişine ait şematik gösterim.....68

**Şekil 3. 7.** NP-HPLC, RP-HPLC ve $Ag^{+}$-HPLC tekniğinin uygulandığı III. boyut ayrım analizleri.....74

**Şekil 3. 8.** NP-HPLC, RP-HPLC ve Ag+-HPLC tekniğinin uygulandığı III. boyut ayrım analizleri için On-line SPE-FIA-HPLC yağ analiz sisteminin işleyişine ait şematik gösterim .....75

**Şekil 3. 9.** SPE ve NP-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı I. ve II. boyut ayrım analizleri için On-line SPE-FIA-HPLC yağ analiz sisteminin işleyişine ait şematik gösterim .....81

**Şekil 3. 10.** SPE ve NP-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı I. ve II. boyut ayrım analizleri için On-line SPE-FIA-HPLC yağ analiz sisteminin işleyişine ait şematik gösterim .....82

**Şekil 3. 11.** NP-HPLC, FIA ve $Ag^{+}$-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı II. ve III. boyut ayrım analizleri için On-line SPE-FIA-HPLC yağ analiz sisteminin işleyişine ait şematik gösterim .....90

**Şekil 3. 12.** SPE, NP-HPLC, FIA ve $Ag^{+}$-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı I., II. ve III. boyut ayrım analizleri için I. aşama işleyişine ait şematik gösterim.....97

**Şekil 3. 13.** SPE, NP-HPLC, FIA ve $Ag^{+}$-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı I., II. ve III. boyut ayrım analizleri için II. aşama işleyişine ait şematik gösterim.....98

**Şekil 3. 14.** SPE, NP-HPLC, FIA ve Ag+-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı I., II. ve III. boyut ayrım analizleri için III. aşama işleyişine ait şematik gösterim.....99

**Şekil 3. 15.** SPE, NP-HPLC, FIA ve $Ag^{+}$-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı I., II. ve III. boyut ayrım analizleri için IV. aşama işleyişine ait şematik gösterim.....100

**Şekil 3. 16.** SPE, NP-HPLC, FIA ve Ag+-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı I., II. ve III. boyut ayrım analizleri için V. aşama işleyişine ait şematik gösterim.....101

**Şekil 4. 1.** I. boyut ayrım analizleri üzerine hareketli faz bileşimi etkisinin, ham palm yağı numunesi kullanılarak incelendiği analizlerden elde edilen kromatogramlar .....109

**Şekil 4. 2.** I. boyut ayrım analizleri üzerine numune miktarı etkisinin, sızma zeytinyağı numunesi kullanılarak incelendiği analizlerden elde edilen kromatogramlar .....111

**Şekil 4. 3.** I. boyut ayrım analizleri üzerine sıcaklık etkisinin, sızma zeytinyağı numunesi kullanılarak incelendiği analizlerden elde edilen kromatogramlar .....112

**Şekil 4. 4.** I. boyut ayrım analizleri üzerine akış hızı etkisinin, sızma zeytiyağı numunesi kullanılarak incelendiği analizlerden elde edilen kromatogramlar .....114

**Şekil 4. 5.** I. boyut ayrım analizleri üzerine ELSD dedektör sıcaklıklarının

etkisinin, ham palm yağı numuneleri kullanılarak incelendiği analizlerden elde edilen kromatogramlar .....117

**Şekil 4. 6.** SPE tekniğinin uygulandığı I. boyut ayrım analizleri için tespit edilen optimum şartlarda gerçekleştirilen rafine ayçiçek yağı analizine ait kromatogram .....119

**Şekil 4. 7.** II. boyut ayrım analizleri üzerine numune çözücü sistemi etkisinin, ham ayçiçek yağı numunesi kullanılarak incelendiği analizlerden elde edilen kromatogramlar .....122

**Şekil 4. 8.** II. boyut ayrım analizleri üzerine numune çözücü sistemi etkisinin, ham palm yağı numunesi kullanılarak incelendiği analizlerden elde edilen kromatogramlar .....123

**Şekil 4. 9.** II. boyut ayrım analizleri üzerine numune çözücü sistemi etkisinin, ham ayçiçek yağı numunesi kullanılarak incelendiği analizlerden elde edilen kromatogramlar .....124

**Şekil 4. 10.** II. boyut ayrım analizleri üzerine numune miktarı etkisinin, ham ayçiçek yağı numunesi kullanılarak incelendiği analizlerden elde edilen kromatogramlar .....126

**Şekil 4. 11.** II. boyut ayrım analizleri üzerine hareketli faz akış hızı etkisinin, ham ayçiçek yağı numunesi kullanılarak incelendiği analizlerden elde edilen kromatogramlar .....127

**Şekil 4. 12.** II. boyut ayrım analizleri üzerine hareketli faz akış hızı etkisinin, ham ayçiçek yağı numunesi kullanılarak incelendiği analizlerden elde edilen kromatogramlar .....128

**Şekil 4. 13.** II. boyut ayrım analizleri üzerine kolon sıcaklığı etkisinin, ham ayçiçek yağı numunesi kullanılarak incelendiği analizlerden elde edilen kromatogramlar .....129

**Şekil 4. 14.** II. boyut ayrım analizleri üzerine sabit faz yapısı etkisinin, ham ayçiçek yağı numunesi kullanılarak incelendiği analizlerden elde edilen kromatogramlar .....131

**Şekil 4. 15.** II. boyut ayrım analizleri üzerine azot gazı (sisleştirme gazı) akış hızı etkisinin, ham ayçiçek yağı numuneleri kullanılarak incelendiği analizlerden elde edilen kromatogramlar .....132

**Şekil 4. 16.** II. boyut ayrım analizleri üzerine azot gazı (sisleştirme gazı) akış hızı etkisinin, ham ayçiçek yağı numuneleri kullanılarak incelendiği analizlerden elde edilen kromatogramlar .....133

**Şekil 4. 17**. II. boyut ayrım analizleri üzerine nebülizasyon (sisleştirme) ve buharlaştırma sıcaklıklarının etkisinin, ham ayçiçek yağı numuneleri kullanılarak incelendiği analizlerden elde edilen kromatogramlar.....134

**Şekil 4. 18.** II. boyut ayrım analizleri üzerine nebülizasyon (sisleştirme) ve buharlaştırma sıcaklıklarının etkisinin, ham ayçiçek yağı numuneleri kullanılarak incelendiği analizlerden elde edilen kromatogramlar.....135

**Şekil 4. 19.** ELSD sistemi optimizasyonu için 1.5 SLM gaz akışında uygulanan deneysel tasarım çalışması sonucu elde edilen 3-B yüzey grafiği grafikleri .....139

**Şekil 4. 20.** ELSD sistemi optimizasyonu için 1.5 SLM gaz akışında uygulanan deneysel tasarım çalışması sonucu elde edilen 3-B yüzey grafiği grafikleri .....140

**Şekil 4. 21.** ELSD sistemi optimizasyonu için 2 SLM gaz akışında uygulanan deneysel tasarım çalışması sonucu elde edilen 3-B yüzey grafiği grafikleri ..... 141

**Şekil 4. 22.** ELSD sistemi optimizasyonu için 2 SLM gaz akışında uygulanan deneysel tasarım çalışması sonucu elde edilen 3-B yüzey grafiği grafikleri ..... 142

**Şekil 4. 23.** ELSD sistemi optimizasyonu için uygulanan faktörlerin cevap değerleri (S/N oranı ve pik alanı) üzerine olan etkilerinin, normal dağılım grafikleri ile gösterimi ..... 144

**Şekil 4. 24.** Standart triolein + 1,2 diolein + 1,3 diolein + monoolein 4'lü karışımı konsantrasyon çalışmalarına ait analizlerden elde edilen kromatogramlar ..... 148

**Şekil 4. 25.** Triolein standart maddesi konsantrasyon çalışmalarına ait kalibrasyon grafikleri ..... 149

**Şekil 4. 26.** 1,3-Diolein standart maddesi konsantrasyon çalışmalarına ait kalibrasyon grafikleri ..... 150

**Şekil 4. 27.** 1,2- Diolein standart maddesi konsantrasyon çalışmalarına ait kalibrasyon grafikleri ..... 151

**Şekil 4. 28.** Monoolein standart maddesi konsantrasyon çalışmalarına ait kalibrasyon grafikleri ..... 152

**Şekil 4. 29.** Standart triolein + 1,2 diolein + 1,3 diolein + monoolein 4'lü karışımı konsantrasyon çalışmalarına ait analizlerden elde edilen kromatogramlar ..... 153

**Şekil 4. 30.** Triolein standart maddesi konsantrasyon çalışmalarına ait kalibrasyon grafikleri ..... 154

**Şekil 4. 31.** 1,3- ve 1,2- Diolein standart maddesi konsantrasyon çalışmalarına ait kalibrasyon grafikleri ..... 155

**Şekil 4. 32.** Monoolein standart maddesi konsantrasyon çalışmalarına ait kalibrasyon grafikleri ..... 156

**Şekil 4. 33.** Tristearin standart maddesi konsantrasyon çalışmalarına ait analizlerden elde edilen kromatogramlar ..... 157

**Şekil 4. 34.** Tristearin standart maddesi konsantrasyon çalışmalarına ait kalibrasyon grafikleri ..... 158

**Şekil 4. 35.** Oleik asit standart maddesi konsantrasyon çalışmalarına ait analizlerden elde edilen kromatogramlar ..... 159

**Şekil 4. 36.** Oleik asit standart maddesi konsantrasyon çalışmalarına ait kalibrasyon grafikleri ..... 160

**Şekil 4. 37.** Stearik asit standart maddesi konsantrasyon çalışmalarına ait analizlerden elde edilen kromatogramlar ..... 161

**Şekil 4. 38.** Stearik asit standart maddesi konsantrasyon çalışmalarına ait kalibrasyon grafikleri ..... 162

**Şekil 4. 39.** Alfa (α) tokoferol standart maddesi konsantrasyon çalışmalarına ait analizlerden elde edilen kromatogramlar ..... 163

**Şekil 4. 40.** Alfa (α-) tokoferol standart maddesi ile standart ekleme metoduna göre gerçekleştirilen konsantrasyon çalışmalarına ait analizlerden elde edilen kromatogramlar ..... 164

**Şekil 4. 41.** Alfa (α) tokoferol standart maddesi konsantrasyon çalışmalarına ait kalibrasyon grafikleri .....165

**Şekil 4. 42.** Beta (β) tokoferol standart maddesi konsantrasyon çalışmalarına ait analizlerden elde edilen kromatogramlar .....166

**Şekil 4. 43.** Beta (β) tokoferol standart maddesi konsantrasyon çalışmalarına ait kalibrasyon grafikleri .....167

**Şekil 4. 44.** Gama (ɣ) tokoferol standart maddesi konsantrasyon çalışmalarına ait analizlerden elde edilen kromatogramlar .....168

**Şekil 4. 45.** Gama(ɣ) tokoferol standart maddesi konsantrasyon çalışmalarına ait kalibrasyon grafikleri .....169

**Şekil 4. 46.** Sigma (***δ***) tokoferol standart maddesi konsantrasyon çalışmalarına ait analizlerden elde edilen kromatogramlar .....170

**Şekil 4. 47.** Sigma (***δ***) tokoferol standart maddesi konsantrasyon çalışmalarına ait kalibrasyon grafikleri .....171

**Şekil 4. 48.** Stigma sterol standart maddesi konsantrasyon çalışmalarına ait analizlerden elde edilen kromatogramlar .....172

**Şekil 4. 49.** Stigma sterol standart maddesi konsantrasyon çalışmalarına ait kalibrasyon grafikleri .....173

**Şekil 4. 50.** Stearyl stearate standart maddesi konsantrasyon çalışmalarına ait analizlerden elde edilen kromatogramlar .....174

**Şekil 4. 51.** Stearyl stearate standart maddesi konsantrasyon çalışmalarına ait kalibrasyon grafikleri .....175

**Şekil 4. 52.** Lipit standart maddeleri kullanılarak hazırlanan karışım analizine ait kromatogram .....177

**Şekil 4. 53.** Lipit türlerinin tümünü içeren standart karışım için yürütülen konsantrasyon çalışmasına ait analizlerden elde edilen kromatogramlar.....179

**Şekil 4. 54.** Standartların tümünü içeren karışımda, stearyl stearate standart maddesi konsantrasyon çalışmalarına ait kalibrasyon grafikleri .....180

**Şekil 4. 55.** Standartların tümünü içeren karışımda, triolein standart maddesi konsantrasyon çalışmalarına ait kalibrasyon grafikleri .....181

**Şekil 4. 56.** Standartların tümünü içeren karışımda, oleik asit standart maddesi konsantrasyon çalışmalarına ait kalibrasyon grafikleri .....182

**Şekil 4. 57.** Standartların tümünü içeren karışımda, alfa tokoferol standart maddesi konsantrasyon çalışmalarına ait kalibrasyon grafikleri .....183

**Şekil 4. 58.** Standartların tümünü içeren karışımda, diolein stigma sterol ve tokoferol standardları için gerçekleştirilen konsantrasyon çalışmalarına ait kalibrasyon grafikleri .....184

**Şekil 4. 59.** Standartların tümünü içeren karışımda, sigma tokoferol standardı için gerçekleştirilen konsantrasyon çalışmalarına ait kalibrasyon grafikleri.....185

**Şekil 4. 60.** Standartların tümünü içeren karışımda, monoolein standardı için gerçekleştirilen konsantrasyon çalışmalarına ait kalibrasyon grafikleri.....186

**Şekil 4. 61.** III. boyut ayrım tokol analizleri üzerine hareketli faz bileşimi etkisinin sızma zeytinyağı numuneleri kullanılarak incelendiği analizlerden elde edilen kromatogramlar .....192

**Şekil 4. 62.** III. boyut ayrım tokol analizleri üzerine hareketli faz akış hızı etkisinin

rafine ayçiçeği yağı numuneleri kullanılarak incelendiği analizlerden elde edilen kromatogramlar.....193

**Şekil 4. 63.** III. boyut ayrım tokol analizleri üzerine sıcaklık etkisinin rafine mısır yağı numuneleri kullanılarak incelendiği analizlerden elde edilen kromatogramlar.....194

**Şekil 4. 64.** III. boyut ayrım analizleri için rafine mısır yağı kullanılarak gerçekleştirilen tokol analizlerinden elde edilen kromatogramlar.....195

**Şekil 4. 65.** III. boyut ayrım analizleri için rafine soya yağı kullanılarak gerçekleştirilen trigliserit analizinden elde edilen kromatogram.....198

**Şekil 4. 66.** $Ag^+$-HPLC tekniğinin uygulandığı III. boyut ayrım analizlerinde numune miktarı etkisinin, rafine soya yağı numuneleri kullanılarak incelendiği analizlerden elde edilen kromatogramlar.....201

**Şekil 4. 67.** $Ag^+$-HPLC tekniği III. boyut ayrım analizleri üzerine sıcaklık etkisinin, rafine soya yağı numuneleri kullanılarak incelendiği analizlerden elde edilen kromatogramlar.....203

**Şekil 4. 68.** $Ag^+$-HPLC tekniği ile trigliserit tayin yöntemi optimizasyonu için uygulanan deneysel tasarım çalışmasına ait 3-B yüzey grafikleri.....205

**Şekil 4. 69.** $Ag^+$-HPLC tekniğinin uygulandığı III. boyut ayrım analizleri için tespit edilen optimum şartlarda gerçekleştirilen, rafine ayçiçek yağı numunesi analizine ait kromatogram.....207

**Şekil 4. 70.** I. ve II. boyut ayrım analizleri üzerine numune çözücü sistemi etkisinin, ham ayçiçek yağı numuneleri kullanılarak incelendiği analizlerden elde edilen kromatogramlar.....212

**Şekil 4. 71.** I. ve II. boyut ayrım analizleri üzerine hareketli faz akış hızı etkisinin ham ayçiçek yağı numuneleri kullanılarak incelendiği analizlerden elde edilen kromatogramlar.....213

**Şekil 4. 72.** I. ve II. boyut ayrım analizleri üzerine valf sistemi pozisyonlarının değiştirilme sürelerinin etkisinin ham ayçiçek yağı numuneleri kullanılarak incelendiği analizlerden elde edilen kromatogramlar.....215

**Şekil 4. 73.** I. ve II. boyut ayrım analizleri üzerine azot gazı akış hızı etkisinin ham ayçiçek yağı numuneleri kullanılarak incelendiği analizlerden elde edilen kromatogramlar.....217

**Şekil 4. 74.** Hareketli faz türünün lipit türlerinin ayrımı üzerine etkisinin, lipit standart maddeleri içeren karışım kullanılarak incelendiği analizlerden elde edilen kromatogramlar.....219

**Şekil 4. 75.** I. boyut ayrım analizleri üzerine hareketli faz türü etkisinin ham ayçiçeği yağı numuneleri kullanılarak incelendiği analizlerden elde edilen kromatogramlar.....219

**Şekil 4. 76.** Hareketli faz türünün lipit türlerinin ayrımı üzerine etkisinin, lipit standart maddeleri içeren karışım kullanılarak incelendiği analizlerden elde edilen kromatogramlar.....220

**Şekil 4. 77.** I. boyut ayrım analizleri üzerine hareketli faz türü etkisinin ham ayçiçeği yağı numuneleri kullanılarak incelendiği analizlerden elde edilen kromatogramlar.....221

**Şekil 4. 78.** Sabit faz türünün lipit türlerinin ayrımı üzerine etkisinin, lipit standart maddeleri içeren karışım kullanılarak incelendiği analizlerden elde edilen kromatogramlar.....222

**Şekil 4. 79.** Sabit faz türünün lipit türlerinin ayrımı üzerine etkisinin, lipit standart maddeleri içeren karışım kullanılarak incelendiği analizlerden elde edilen kromatogramlar .....223

**Şekil 4. 80.** Sabit faz yapısının lipit türlerinin ayrımı üzerine etkisinin, lipit standart maddeleri içeren karışım kullanılarak incelendiği analizlerden elde edilen kromatogramlar .....223

**Şekil 4. 81.** SPE ve NP-HPLC tekniklerinin birleştirilerek uygulandığı I. ve II. boyut ayrım analizleri için tespit edilen optimum şartlarda gerçekleştirilen, lipit standartları karışımını içeren numune analizine ait kromatogram .....225

**Şekil 4. 82.** II. boyut ayrım aşamasından elde edilen fraksiyonların, 10PT/2PS valf sistemi üzerindeki loop sistemlerine ulaşma sürelerini tespiti için sisteminin işleyişine ait şematik gösterim .....228

**Şekil 4. 83.** Şekil 4.82'deki sistem işleyişine göre analiz edilen ham ayçiçeği yağı numunesine ve TG, DG, MG standart maddesine ait kromatogramlar .....229

**Şekil 4. 84.** II. ve III. boyut ayrım tekniğinin birlikte uygulandığı analizlerde 7. dk esas alınarak yapılan programlama analizinden elde edilen kromatogram, 0.1 mg/µL ham ayçiçeği yağı numunesi analizi için eş zamanlı alınan ELSD Sinyali ve RID sinyali .....230

**Şekil 4. 85.** Şekil 4.82'deki sistem işleyişine göre analiz edilen rafine ayçiçeği yağı numunesine ait kromatogram .....232

**Şekil 4. 86.** II. ve III. boyut ayrım tekniğinin birlikte uygulandığı analizlerde 5,5. dk esas alınarak yapılan programlama analizinden elde edilen kromatogram, 0.1 mg/µL ham ayçiçeği yağı numunesi analizi .....233

**Şekil 4. 87.** II. ve III. boyut ayrım tekniğinin birlikte uygulandığı analizler için; 7., 7.5., 8., 8.5 ve 9. dakikalar esas alınarak yapılan programlama analizlerinden elde edilen kromatogramlar .....235

**Şekil 4. 88.** Şekil 4.82'deki sistem işleyişine göre analiz edilen rafine mısır yağı numunesine ait kromatogram .....237

**Şekil 4. 89.** Şekil 4.82'deki sistem işleyişine göre analiz edilen rafine kanola yağı numunesine ait kromatogram .....238

**Şekil 4. 90.** Şekil 4.82'deki sistem işleyişine göre analiz edilen riviera zeytinyağı numunesine ait kromatogram .....238

**Şekil 4. 91.** NP-HPLC, FIA ve $Ag^{+}$-HPLC tekniklerinin birleştirilerek uygulandığı II. ve III. boyut ayrım analizleri için tespit edilen optimum şartlarda gerçekleştirilen, rafine ayçiçek yağı analizine ait kromatogram .....240

**Şekil 4. 92.** II. ve III. boyut ayrım tekniğinin birlikte uygulandığı analizler için; 7.5., 8., 8.5 ve 9. dakikalar esas alınarak gerçekleştirilen rafine mısır yağı analizlerinden elde edilen kromatogramlar .....241

**Şekil 4. 93.** II. ve III. boyut ayrım tekniğinin birlikte uygulandığı analizler için; 6.5., 7., 7.5 ve 8. dakikalar esas alınarak gerçekleştirilen rafine kanola yağı analizlerinden elde edilen kromatogramlar .....242

**Şekil 4. 94.** II. ve III. boyut ayrım tekniğinin birlikte uygulandığı analizler için; 7.5., 8., 8.5 dakikalar esas alınarak gerçekleştirilen rafine ayçiçek yağı analizlerinden elde edilen kromatogramlar .....243

**Şekil 4. 95.** II. ve III. boyut ayrım tekniğinin birlikte uygulandığı analizler için; 7.5., 8., 8.5 dakikalar esas alınarak gerçekleştirilen rafine pamuk yağı

analizlerinden elde edilen kromatogramlar .....244

**Şekil 4. 96.** II. ve III. boyut ayrım tekniğinin birlikte uygulandığı analizler için; 7.5., 8., 8.5 dakikalar esas alınarak gerçekleştirilen palm yağı analizlerinden elde edilen kromatogramlar.....245

**Şekil 4. 97.** II. ve III. boyut ayrım tekniğinin birlikte uygulandığı analizler için; 7.5., 8., 8.5 dakikalar esas alınarak gerçekleştirilen mısır yağı analizlerinden elde edilen kromatogramlar.....247

**Şekil 4. 98.** II. ve III. boyut ayrım tekniğinin birlikte uygulandığı analizler için; 7, 7.5., 8., 8.5 dakikalar esas alınarak gerçekleştirilen riviera zeytinyağı analizlerinden elde edilen kromatogramlar .....248

**Şekil 4. 99.** II. ve III. boyut ayrım tekniğinin birlikte uygulandığı analizler için; 7., 7.5., 8., 8.5 dakikalar esas alınarak gerçekleştirilen rafine kanola yağı analizlerinden elde edilen kromatogramlar .....249

**Şekil 4. 100.** II. ve III. boyut ayrım tekniğinin birlikte uygulandığı analizler için; 7.5., 8., 8.5 dakikalar esas alınarak gerçekleştirilen palm yağı analizlerinden elde edilen kromatogramlar.....250

**Şekil 4. 101.** II. ve III. boyut ayrım tekniğinin birlikte uygulandığı analizler için; 7.5., 8., 8.5 dakikalar esas alınarak gerçekleştirilen rafine pamuk yağı analizlerinden elde edilen kromatogramlar .....251

**Şekil 4. 102.** NP-HPLC, FIA ve $Ag^{+}$-HPLC tekniklerinin birleştirilerek uygulandığı II. ve III. boyut ayrım analizleri için tespit edilen optimum şartlarda gerçekleştirilen, rafine ayçiçek yağı analizine ait kromatogram .....252

**Şekil 4. 103.** I. boyut ayrım aşamasından II. boyut ayrım aşamasına TG türlerinin aktarım süresinin tespiti için; Şekil 3.12'deki sistem işleyişine göre analiz edilen rafine mısır yağı numunesine ait kromatogram.....255

**Şekil 4. 104.** II. boyut ayrım aşamasından III. boyut ayrım aşamasına TG türlerinin aktarım süresinin tespiti için; Şekil 3.12'deki sistem işleyişine göre analiz edilen rafine mısır yağı numunesi analizi .....256

**Şekil 4. 105.** I. II. ve III. boyut ayrım tekniğinin birlikte uygulandığı analizler için gerçekleştirilen rafine ayçiçek yağı analizlerinden elde edilen kromatogramlar .....259

**Şekil 4. 106.** I. II. ve III. boyut ayrım tekniğinin birlikte uygulandığı analizler için gerçekleştirilen rafine soya yağı analizlerinden elde edilen kromatogramlar .....261

**Şekil 4. 107.** I. II. ve III. boyut ayrım tekniğinin birlikte uygulandığı analizler için gerçekleştirilen rafine kanola yağı analizlerinden elde edilen kromatogramlar .....262

**Şekil 4. 108.** I. II. ve III. boyut ayrım tekniğinin birlikte uygulandığı analizler için gerçekleştirilen riviera zeytinyağı analizlerinden elde edilen kromatogramlar .....263

**Şekil 4. 109.** I. II. ve III. boyut ayrım tekniğinin birlikte uygulandığı analizler için gerçekleştirilen ham palm yağı analizlerinden elde edilen kromatogramlar .....264

**Şekil 4. 110.** SPE, NP-HPLC, FIA ve Ag+-HPLC tekniklerinin birleştirilerek uygulandığı I., II. ve III. boyut ayrım analizleri için tespit edilen optimum şartlarda gerçekleştirilen, rafine mısır yağı analizine ait kromatogram .....265

**Şekil 4. 111.** Standart AOCS Ce 5b-89 metoduna göre rafine soya yağı kullanılarak gerçekleştirilen trigliserit analizinden elde edilen kromatogram .....267

**Şekil 4. 112.** Standart AOCS Ce 8-89 metoduna göre standart madde kullanılarak gerçekleştirilen tokoferol analizinden elde edilen kromatogram .....270

# ÇİZELGELER DİZİNİ


**Çizelge 1. 1.** Katı ve sıvı yağlarda mevcut minör lipit türleri ve miktarları (O'Brien, 2004).....18

**Çizelge 1. 2.** Lipit türlerinin ayrımlarında etkili olan çözücüler ve polarite derecelendirmesi.....22

**Çizelge 3. 1.** On-line SPE-FIA-HPLC birleştirilmiş yağ analiz sisteminde uygulanan yöntemler için önerilen hareketli faz sistemleri .....53

**Çizelge 3. 2.** On-line SPE-FIA-HPLC birleştirilmiş yağ analiz sisteminin enstrümantasyonu için kullanılan sistem elemanları .....55

**Çizelge 3. 3.** SPE tekniğinin uygulandığı I. boyut ayrım deneylerinde kullanılan deneysel parametreler.....62

**Çizelge 3. 4.** I. boyut ayrım deneylerinde uygulanan farklı metot gradient programları .....64

**Çizelge 3. 5.** NP- HPLC tekniğinin uygulandığı II. boyut ayrım analizlerinde kullanılan deneysel parametreler.....69

**Çizelge 3. 6.** ELSD optimizasyon çalışması için hazırlanan deneysel tasarım şeması.....72

**Çizelge 3. 7.** NP-HPLC tekniğinin uygulandığı III. boyut ayrım analizlerinde kullanılan deneysel parametreler.....76

**Çizelge 3. 8.** RP-HPLC tekniğinin uygulandığı III. boyut ayrım analizlerinde kullanılan deneysel parametreler.....77

**Çizelge 3. 9.** $Ag^{+}$-HPLC tekniğinin uygulandığı III. boyut ayrım analizlerinde kullanılan deneysel parametreler.....78

**Çizelge 3. 10.** $Ag^{+}$-HPLC tekniğinin uygulandığı III. boyut ayrım analizleri optimizasyon çalışmaları için merkezi kompozit deneysel tasarım şeması.....79

**Çizelge 3. 11.** SPE ve NP-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı I. ve II. boyut ayrım (çok boyutlu ayrım) analizleri için kullanılan deneysel parametreler.....83

**Çizelge 3. 12.** SPE ve NP-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı I. ve II. boyut ayrım analizleri için hareketli ve sabit faz etkisine ait deneysel parametreler.....88

**Çizelge 3. 13.** NP-HPLC, FIA ve RP-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı II. ve III. boyut ayrım (çok boyutlu ayrım) analizleri için kullanılan parametreler.....91

**Çizelge 3. 14.** NP-HPLC, FIA ve $Ag^{+}$-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı II. ve III. boyut ayrım (çok boyutlu ayrım) analizleri için kullanılan parametreler.....92

**Çizelge 3. 15.** SPE, NP-HPLC, FIA ve Ag+-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı I.,II. ve III. boyut ayrım analizleri için kullanılan parametreler.....102

**Çizelge 3. 16.** Trigliserit analizlerinde kullanılan standart metoda ait deneysel parametreler.....106

**Çizelge 3. 17.** Tokol analizlerinde kullanılan standart metoda ait deneysel parametreler .....106

**Çizelge 4. 1.** SPE tekniğinin uygulandığı I. boyut ayrım yöntemi ile gerçekleştirilen bitkisel yağ numunelerine ait sonuçları.....118

**Çizelge 4. 2.** ELSD deneysel tasarım çalışmasına ait analizlerden elde edilen veriler .....138

**Çizelge 4. 3.** ELSD sistemi optimizasyonu için uygulanan faktörlerin, cevap değerleri (S/N oranı ve pik alanı) üzerine olan etki derecelerinin ANOVA testi ile değerlendirilmesi .....145

**Çizelge 4. 4.** Cevap değeri S/N alındığında, ELSD sistemi optimizasyonu için uygulanan deneysel tasarım modelinin uygunluğunun ANOVA testi ile değerlendirilmesi .....146

**Çizelge 4. 5.** Triolein standardı için gerçekleştirilen konsantrasyon çalışmalarına ait analiz verileri .....149

**Çizelge 4. 6.** 1,3 Diolein standardı için gerçekleştirilen konsantrasyon çalışmalarına ait analiz verileri .....150

**Çizelge 4. 7.** 1,2 Diolein standardı için gerçekleştirilen konsantrasyon çalışmalarına ait analiz verileri .....151

**Çizelge 4. 8.** Monolein standardı için gerçekleştirilen konsantrasyon çalışmalarına ait analiz verileri .....152

**Çizelge 4. 9.** Triolein standardı için gerçekleştirilen konsantrasyon çalışmalarına ait analiz verileri .....154

**Çizelge 4. 10.** 1,3- ve 1,2-Diolein standardı için gerçekleştirilen konsantrasyon çalışmalarına ait analiz verileri .....155

**Çizelge 4. 11.** Monoolein standardı için gerçekleştirilen konsantrasyon çalışmalarına ait analiz verileri .....156

**Çizelge 4. 12.** Tristearin standardı için gerçekleştirilen konsantrasyon çalışmalarına ait analiz verileri .....158

**Çizelge 4. 13.** Oleik asit standardı için gerçekleştirilen konsantrasyon çalışmalarına ait analiz verileri .....160

**Çizelge 4. 14.** Stearik asit standardı için gerçekleştirilen konsantrasyon çalışmalarına ait analiz verileri .....162

**Çizelge 4. 15.** Alfa (α-) tokoferol standardı için gerçekleştirilen konsantrasyon çalışmalarına ait analiz verileri .....165

**Çizelge 4. 16.** Beta (β) tokoferol standardı için gerçekleştirilen konsantrasyon çalışmalarına ait analiz verileri .....167

**Çizelge 4. 17.** Gama (ɣ) tokoferol standardı için gerçekleştirilen konsantrasyon çalışmalarına ait analiz verileri .....169

**Çizelge 4. 18.** Sigma (***δ***) tokoferol standardı için gerçekleştirilen konsantrasyon çalışmalarına ait analiz verileri .....171

**Çizelge 4. 19.** Stigma sterol standardı için gerçekleştirilen konsantrasyon çalışmalarına ait analiz verileri .....173

**Çizelge 4. 20.** Stearyl stearate standardı için gerçekleştirilen konsantrasyon çalışmalarına ait analiz verileri .....175

**Çizelge 4. 21.** Standartların tümünü içeren karışımda, stearyl stearate standardı için gerçekleştirilen konsantrasyon çalışmalarına ait analiz verileri .....180

**Çizelge 4. 22.** Standartların tümünü içeren karışımda, triolein standardı için gerçekleştirilen konsantrasyon çalışmalarına ait analiz verileri .....181

**Çizelge 4. 23.** Standartların tümünü içeren karışımda, oleik asit standardı için gerçekleştirilen konsantrasyon çalışmalarına ait analiz verileri .....182

**Çizelge 4. 24.** Standartların tümünü içeren karışımda, alfa tokoferol standardı için gerçekleştirilen konsantrasyon çalışmalarına ait analiz verileri .....183

**Çizelge 4. 25.** Standartların tümünü içeren karışımda, diolein stigma sterol ve tokoferol standardları için gerçekleştirilen konsantrasyon çalışmalarına ait analiz verileri .....184

**Çizelge 4. 26.** Standartların tümünü içeren karışımda, sigma tokoferol standardı için gerçekleştirilen konsantrasyon çalışmalarına ait analiz verileri .....185

**Çizelge 4. 27.** Standartların tümünü içeren karışımda, monoolein standardı için gerçekleştirilen konsantrasyon çalışmalarına ait analiz verileri .....186

**Çizelge 4. 28.** Lipit türlerinin tümünü içeren standart karışım analizine ait istatistik verileri .....187

**Çizelge 4. 29.** NP-HPLC tekniğinin uygulandığı II. boyut ayrım analizleri ile gerçekleştirilen farklı bitkisel yağ numunelerine ait sonuçlar.....189

**Çizelge 4. 30.** III. boyut ayrım metot şartları kullanılarak farklı bitkisel yağlar için gerçekleştirilen tokol analizlerine ait sonuçlar (mg/kg yağ) .....196

**Çizelge 4. 31.** III. boyut ayrım metot şartları kullanılarak farklı bitkisel yağ numuneleri için gerçekleştirilen trigliserit tayini sonuçları.....199

**Çizelge 4. 32.** Farklı bitkisel yağ numuneleri için Ag+-HPLC tekniği ile gerçekleştirilen trigliserit tayini sonuçları .....208

**Çizelge 4. 33.** Standart AOCS Ce 5b-89 metodu kullanılarak farklı bitkisel yağ numuneleri için gerçekleştirilen trigliserit tayini sonuçları.....268

**Çizelge 4. 34.** Standart AOCS Ce 8-89 metot şartları kullanılarak farklı bitkisel yağlar için gerçekleştirilen tokol analizlerine ait sonuçlar .....271

**Çizelge 4. 35.** SPE, NP-HPLC, FIA ve Ag+-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı I.,II. ve III. boyut ayrım analizleri için kullanılan parametreler.....280

**Çizelge 4. 36.** SPE,NP-HPLC, FIA ve $Ag^{+}$-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı I.,II. ve III. boyut ayrım analizleri için kullanılan parametreler.....281

# SİMGELER VE KISALTMALAR

## Simgeler

| | |
|---|---|
| ***%*** | : yüzde |
| ***µg*** | : mikrogram |
| ***µL*** | : mikrolitre |
| ***dk*** | : dakika |
| ***H*** | : tabaka yüksekliği |
| ***k'*** | : kapasite faktörü |
| ***N*** | : tabaka sayısı |
| ***Rs*** | : ayırma gücü |
| ***-T*** | : tokoferol |
| ***-TT*** | : tokotrienol |
| ***v/v*** | : hacim/ hacim |
| ***α-*** | : alfa |
| ***β-*** | : beta |
| ***γ-*** | : gama |
| ***δ-*** | : sigma |
| $\lambda_{Em}$ | : emisyon dalga boyu |
| $\lambda_{Ext}$ | : uyarma dalga boyu |
| Є° | : elüsyon kuvveti |

## Kısaltmalar

| | |
|---|---|
| **$1^{st}$-D** | : birinci boyut ayrım |
| **$2^{nd}$-D** | : ikinci boyut ayrım |
| **$3^{rd}$-D** | : üçüncü boyut ayrım |
| **ACN** | : asetonitril |
| **$Ag^{+}$-HPLC** | : gümüş iyon- yüksek performanslı sıvı kromatografi |
| **AOAC** | : association of official analytical chemists |
| **AOCS** | : american oil chemical society |
| **BSI** | : british standards ınstitution |
| **DG** | : digliserit |
| **DHA** | : dokosahekzaenoik asit |
| **ELSD** | : buharlaştırmalı ışık saçılım dedektörü |
| **EPA** | : eikosapentaenoik asit |
| **FFA** | : serbest yağ asidi |

**FIA** : akış enjeksiyon analiz

**FLD** : floresans dedektör

**GC** : gaz kromatografisi

**GC-MS** : gaz kromatografisi- kütle spektrometresi

**HAc** : asetik asit

**HPLC** : yüksek performanslı sıvı kromatografi

**ISO** : ınternational organisation for standardisation

**IUPAC** : ınternational union of pure and applied chemists

**İTK** : ince tabaka kromatografi

**MD-HPLC** : çok boyutlu- yüksek performanslı sıvı kromatografi

**MG** : monogliserit

**MKT** : merkezi kompozit tasarım

**MUFA** : tekli doymamış yağ asidi

**mV** : milivolt

**NP-HPLC** : normal faz- yüksek performanslı sıvı kromatografi

**nFLU** : floresans unit

**nRIU** : refractive indeks unit

**OLL** : oleik, linoleik, linoleik asit

**OLLn** : oleik, linoleik, linolenik asit

**OOL** : oleik, oleik, linolenik asit

**OOLn** : oleik, oleik, linolenik asit

**OOO** : oleik, oleik, oleik asit

**PA** : fosfatidik asit

**PC** : fosfatidilkolin

**PE** : fosfatidiletanolamin

**PLL** : palmitik, linoleik, linoleik asit

**PLLn** : palmitik, linoleik, linolenik asit

**PLSt** : palmitik, linoleik, stearik asit

**POO** : palmitik, oleik, oleik asit

**POP** : palmitik, oleik, palmitik asit

**POSt** : palmitik, oleik, stearik asit

**PPL** : palmitik, palmitik, linoleik asit

**ppm** : parts per million

**PS** : fosfatidilserin

**PUFA** : çoklu doymamış yağ asidi

**RID** : kırılma indisi dedektörü

**RP-HPLC** : ters faz- yüksek performanslı sıvı kromatografi

**RSM** : tepki yüzeyleri metodolojisi

**SPE** : katı faz ekstraksiyon

**TG** : trigliserit

**TLC** : ince tabaka kromatografisi

**UV** : ultraviyoye

# 1. GİRİŞ

Yağ numunelerinde mevcut lipit bileşenlerinin kalitatif ve kantitatif tayinleri için; uygulamadaki standart yöntemlerin iyileştirilmesine ve yeni analitik yöntemlerin geliştirilmesine yönelik pek çok çalışma bulunmaktadır. Geleneksel prosedürlerin uygulandığı yöntemler; kimyasal reaktiflerin/çözücülerin ve numunenin yüksek miktarda kullanımını gerektiren, zahmetli ve zaman alıcı prosedürler olarak bilinmektedir. Standart yöntemler olarak ifade edilen bu yöntemler araştırma ve sanayi laboratuarlarında yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Standart yöntemlere alternatif olabilecek modern analiz sistemlerinin ve birleştirilmiş analiz yöntemlerin geliştirilmesine yönelik çalışmalar önem kazanmaya başlamıştır.

Son yıllarda gerçekleştirilen modern analiz sistemi uygulamalarında; tek bir sistem üzerinde kolon değiştirme/geçiş esaslı yada analit/pik seçimli analizlere imkân veren *on-line, çok boyutlu ayrım uygulamaları/ birleştirilmiş analiz sistemi uygulamaları*, oldukça başarılı ve etkili çözümler sunmaktadır. Birleştirilmiş analiz sistemleri; farklı kimyasal özelliğe sahip bileşenlerin çok boyutlu ayrımı ve tayini için, en az iki farklı tekniğinin tek bir sistem üzerinde eş zamanlı/ardışık uygulandığı, modern analiz sistemleri olarak tanımlanmaktadır. Birden fazla gradient çözücü programı ve yönlendirme valfinin, tek sistem üzerinde kullanımına imkân veren bu tür sistemlerin oluşturulmasına /geliştirilmesine yönelik çalışmalar, modern cihaz üreticileri tarafından da yoğun bir şekilde yürütülmektedir. On-line birleştirilmiş analiz sistemleri üzerinde farklı kimyasal yapıya sahip numuneler için geliştirilen yöntemlerin; standart yöntemlere kıyasla, numune ve reaktiflerin az miktarda kullanımını gerektiren, kesinliği yüksek sonuçların elde edilebildiği, hızlı ve zahmetsiz yöntemler olduğu, pek çok çalışma ile kanıtlanmıştır (Gunstone, 2008).

Yağların eldesinde uygulanan işlemlere dair kalitenin, yağın kaynağının ve tağşişinin tespiti için; yağlarda bulunan bileşenlerin çeşitli analitik yöntemler uygulanarak tayin edilmesi gerekmektedir. Bu tayinler genellikle standart metotlar olarak bilinen metotlar kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Yağların kalite-kontrolünde kullanılan standart metotların uygulamaları ve gerektirdiği ön işlemler; oldukça maliyetli, zaman alan, zahmetli ve çevre açısından tehlike oluşturan çözücülerin fazla miktarda kullanımını gerektirmektedir. Bu nedenle; uygulanmakta olan standart metotlara alternatif olabilecek, çevre dostu yeni yağ analiz metotlarının geliştirilmesi gerekmektedir.

Sunulan tez çalışması ile; birçok yağ analizinin ön işlem basamağında yer alan katı faz ekstraksiyon (SPE) tekniğinin, akış enjeksiyon analiz (FIA) ve yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) sistemlerine entegrasyonu ile, bitkisel yağlarda mevcut türlerin tek bir enjeksiyon ile 3 boyutlu kromatografik tayinleri için, numune ön işlemlerinin on-line gerçekleştirilebildiği ve analizci müdahalesinin en aza indirildiği *"On-line SPE-FIA-HPLC yağ analiz sistemi"* oluşturulmuş ve sistem üzerinde yeni yağ analiz metotlarının geliştirilip/ uygulanabilirlik kazanması sağlanmıştır.

## 1.1. Yağın Tanımı ve Önemi

Yağlar; insan vücudu için yaşamsal değeri olan, yüksek oranda enerji sağlayan ve beslenmede büyük öneme sahip temel ihtiyaç maddelerinden biridir. Hücre, doku ve organların yapılarında yer alan temel bileşenlerden olması nedeniyle; hayati fonksiyonların sürdürülebilmesi ve vücuttaki değişik işlevlerin sağlıklı bir şekilde yerine getirebilmesi için alınması gerekli mutlak besin öğeleridir (Güler, 2009).

Yağların temel kimyasal bileşeni; üç değerlikli bir alkol olan gliserin ($C_3H_5(OH)_3$) ile çift karbon sayılı yağ asitlerinin esterleşmesinden meydana gelen trigliserit molekülleridir. Gliserin ile yağ asitlerinin esterleşmesi sonucu oluşan trigliserit yapılar, katı ve sıvı yağların yaklaşık ~95-98%'lik kısmını oluşturmaktadır (Demirci, 2001). Yağların yapısında trigliserit bileşenlerinin yanında; digliseritler, monogliseritler, steroller, fosfatidler, vakslar, serbest yağ asitleri, vitaminler, pigmentler, pestisitler, iz metaller gibi ikincil bileşen olarak tanımlanan minör bileşenler yer almaktadır (Aluyor ve ark., 2009).

Yağların insanların tüketimine uygun özellikler kazanması için, çeşitli faktörler sebebiyle ham yağda bulunan safsızlıkların dikkatli bir şekilde uzaklaştırılması yani rafine edilmesi gerekmektedir. Rafinasyon işlemi; yağın doğal haldeki trigliserit yapısını bozmadan ve antioksidan özellik gösteren E vitamininin sentezleyicisi tokol türlerine zarar vermeden, sadece tüketime engel olan safsızlıkların uzaklaştırılmasıdır. Yağlarda rafinasyon işlemi; kimyasal, fiziksel ve enzimatik rafinasyon olmak üzere üç farklı yöntemle gerçekleştirilebilmektedir (Arslan, 2009).

Yağlar; sağlıklı beslenme, büyüme, yaşlanma, fizyolojik tüm faaliyetlerin normal gelişimi, hastalıklardan korunma gibi hayati konularda etkili olduğu bilinen önemli temel besin maddelerinin başında gelmektedir. Yağların belirtilen bu temel işlevleri yanında;

- canlıların anatomik yapısının oluşumu ve korunması,
- vücut sıcaklığının ve su dengesinin korunması,
- alınan fazla enerjinin depolanması,
- diğer besin öğelerine kıyasla daha uzun sürede sindirilmeleri nedeniyle uzun süreli tokluk hissinin oluşumu,
- yağda çözünen pro-vitaminler ve vitaminler, steroitler, bazı enzimler, antioksidan etkideki terpen, glikozit ve alkolit yapısındaki aktif maddeler, bazı metaller ve bunların metaloitleri için taşıyıcı görev alma,
- yağda çözünen vitaminler (A, D, E ve K) için taşıyıcı fonksiyona sahip olma,
- vücutta sentezlenemeyen esansiyel yağ asitleri gibi elzem bileşiklerin kaynağı olma,
- içerdikleri yağ asitlerinin zincir uzunluğuna bağlı olarak ~9,1-9,7 kcal/g'lık enerji içerikleri nedeniyle, yakıldıklarında vücut ısısı için önemli bir enerji kaynağı oluşturma,
- yemeklere lezzet ve tat kazandırma, bunun yanında beslenme açısından iştah açıcı etkiye sahip olma gibi sayısız işleve ve öneme sahip oldukları yapılan pek çok araştırma ile kanıtlanmıştır (Kara, 2013).

Pek çok gıda maddesinde olduğu gibi, doğal halinde yada teknolojik işlemler uygulandıktan sonra tüketilen yağlardan vücudun yeterince yararlanabilmesini sağlamak, çoğu zaman önemli bir sorun olarak ortaya çıkmaktadır. Yağlardan beklenen bu yararların sağlanması, üretimden tüketime dek her bir aşamada gereken uygun koşulların sağlanması ile mümkün olmaktadır (Okur, 2008).

## 1.2. Yağların Sınıflandırılması

Yağlar; elde edildikleri kaynaklara, yağ asit içeriklerine, iyot sayılarına ve yağ asit kompozisyonlarına göre dört farklı sınıfta incelenmektedir ;

Elde edildikleri kaynağa göre;
- hayvansal yağlar
- bitkisel yağlar
- balık yağları

Yağ asit kompozisyonlarına göre;
- oleik- linoleik asit grubu yağlar
- erüsik asit grubu yağlar
- linolenik asit grubu yağlar

- laurik asit grubu yağlar
- konjuge asit grubu yağlar
- bitkisel yağ grubu yağlar
- süt yağı grubu yağlar
- hayvansal yağ grubu yağlar
- hidroksi asit grubu yağlar ve
- marina yağı grubu yağlar

Yağ asidi içeriklerine göre;
- doymuş yağlar
- doymamış yağlar
- trans yağlar

İyot sayılarına göre;
- kuruyan yağlar
- yarı kuruyan yağlar
- kurumayan yağlar (Arslan, 2009).

Yağlar elde edildikleri kaynağa göre; hayvansal, bitkisel ve balık yağları olmak üzere üç grupta incelenmektedir. Hayvansal yağ kaynakları; kara hayvanlarının iç yağları, deniz hayvanlarından elde edilen yağlar ve kara hayvanlarının sütünden elde edilen yağlar olmak üzere sınıflandırılmaktadır. Hayvansal yağlar; esas olarak doymuş yağ asitlerinden oluştuklarından katı formdaki yağlardır ve sindirimleri oldukça zordur. Bitkisel yağlar; bitkilerin tohumlarından (pamuk, ayçiçeği, susam, kolza, palm çekirdeği, soya fasulyesi) yada meyvelerinden (zeytin, badem, fındık, palm meyvesi) elde edilir. Oda sıcaklığında sıvı halde bulunan, doymamış yağ asidi içeriği oldukça yüksek olan ve kolesterol içermeyen yağlardır. Bitkisel yağların yağ asidi kompozisyonu; bitkinin genetik çeşitliliği, yetiştirildiği mevsim, iklim şartları, toprak tipi gibi koşullara bağlı olarak değişmektedir. Bileşimlerinde doymamış yağ asitlerini yüksek oranda ihtiva eden bitkisel yağlar, sağlık açısından daha faydalı oldukları için yemeklerde ve salatalarda özellikle tercih edilmektedir. Balık yağı, vücut için son derece önem taşıyan bu yağ asitleri açısından en zengin yağ grubu olarak bilinmektedir. Balık yağında sağlığımız için önemli olan iki farklı doymamış yağ asidi türü olan EPA ve DHA bulunmaktadır. İnsan vücudu tarafından üretilemeyen elzem/esansiyel yağ asitlerinin, besinlerle alınmaları gerekmektedir (Nas ve ark., 2001).

Yağ asit içeriklerine göre yapılan sınıflandırmada yağlar; doymuş, doymamış ve trans yağlar olmak üzere üç grupta sınıflandırılmaktadır. Genel olarak oda sıcaklığında katı halde bulunan ve hayvansal gıdalarda mevcut olan yağlar doymuş yağ olarak tanımlanmaktadır. Oda sıcaklığında sıvı halde ve genellikle bitkisel kaynaklı olan

yağlar, doymamış yağlar olarak tanımlanmaktadır. Doymamış yağlar, vücudun gereksinim duyduğu esansiyel yağ asitlerinin en iyi kaynağı olarak tanımlanmaktadır. Doymamış yağlar tekli (MUFA) ve çoklu (PUFA) doymamış yağlar olmak üzere iki grupta sınıflandırılmaktadır. Yağ içeriğine göre yapılan sınıflandırmada diğer bir grup trans yağlar olarak tanımlanmaktadır. Trans yağlar genellikle; sıvı formdaki bitkisel yağlarının hidrojenizasyonu ile oluşan trans yağ asidi içeriği yüksek olan yağlardır. Trans yağ asitleri, besinlerde doğal olarak bulunmakla birlikte büyük bölümü hidrojene yağlardan gelmektedir. Trans doymamış yağ asitlerinin LDL-kolesterolünü arttırması, HDL-kolesterolünü azaltması nedeniyle; kızartmalarda, hazır yemeklerin ve gıdaların yapımında tüketimlerinin en aza indirilmesi önerilmektedir (Arslan, 2007).

İyot sayılarına göre yapılan sınıflandırmada yağlar; teknik özelliklerine göre kuruyan yağlar (iyot indisi 130'un üzerinde olanlar), yarı kuruyan yağlar (iyot indisi 90-130 olanlar), kurumayan yağlar (iyot indisi 90'ın altında olanlar) olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır. İyot indisi; yağın doymamışlık özelliğinin bir belirtisi, kuruma ise; yağın oksijen tutma kabiliyeti olarak ifade edilmektedir (Nas ve ark., 2001).

Yağ asit kompozisyonu için yapılan sınıflandırmada ise; yağların fiziksel ve kimyasal özelliklerini belirleyen en önemli faktör olan yağ asit bileşimi dikkate alınmaktadır. Yapılan sınıflandırmada; oleik-linoleik asit grubu, linolenik asit grubu, laurik asit grubu, süt yağı grubu, bitkisel tereyağı grubu, hayvansal yağ grubu, erusik asit grubu, konjuge asit grubu, deniz hayvanları yağı grubu ve hidroksi asit grubu olmak üzere on ana grupta sınıflandırma yapılmaktadır (Nas ve ark., 2001). İnsan sağlığı için faydalı yağ asitlerini içeren yağlar '*yenilebilir özellikteki yağlar*' olarak nitelendirilirken; erusik asit, konjuge olmuş yağ asitleri gibi bileşenleri içerenler ise; '*yemeklik olarak kullanılamayan, endüstriyel özellikteki yağlar*' olarak tanımlanmaktadır (Karahasan, 2012).

### 1.3. Yağların Karakterizasyonu ve Lipit Türlerinin Özellikleri

Yağlar esas olarak, trigliserit molekülleri ve kimyasal yapıları farklı bileşiklerin oluşturduğu kompleks bir karışım olan minör bileşenlerden oluşmaktadır. Trigliserit molekülleri, yağın bünyesinde yüksek miktarda (~95-98%) bulunmaları nedeniyle yağın *temel bileşenler*; yağların doğal yapısında bulunan ve karakteristik özelliklerini belirleyen minör bileşenler (~2-5%) ise *ikincil bileşenler* olarak adlandırılmaktadır.

Yağların karakteristik özelliğini belirleyen ve temel bileşenleri olan trigliseritler; bir mol gliserol ve üç mol karboksilik asidin esterleşmesi sonucu oluşan yapılardır. Minör bileşenler ise; yağın doğal yapısında mevcut bileşenler olup, yağ alkolleri (steroller, uzun zincirli alifatik ve triterpenik alkoller, metilsteroller), vakslar, hidrokarbonlar, uçucu bileşenler, fenolik bileşikler, triterpenik asitler, pigmentler, minör gliserik bileşikler, tokoller, iz metaller ve fosfolipitler olmak üzere farklı lipit gruplarında sınıflandırılmaktadır. Yağlarda bulunan trigliseritlerin ve minör bileşenlerin içerikleri; yağın elde edildiği tohum yada meyvenin yetiştirilme şartlarına ve kalitesine, kullanılan ekstraksiyon sistemlerine, rafinasyon işlemlerine ve yağın depolanması süresince meydana gelen reaksiyonlara göre farklılıklar göstermektedir (Cert ve ark., 2000; Aluyor ve ark., 2009).

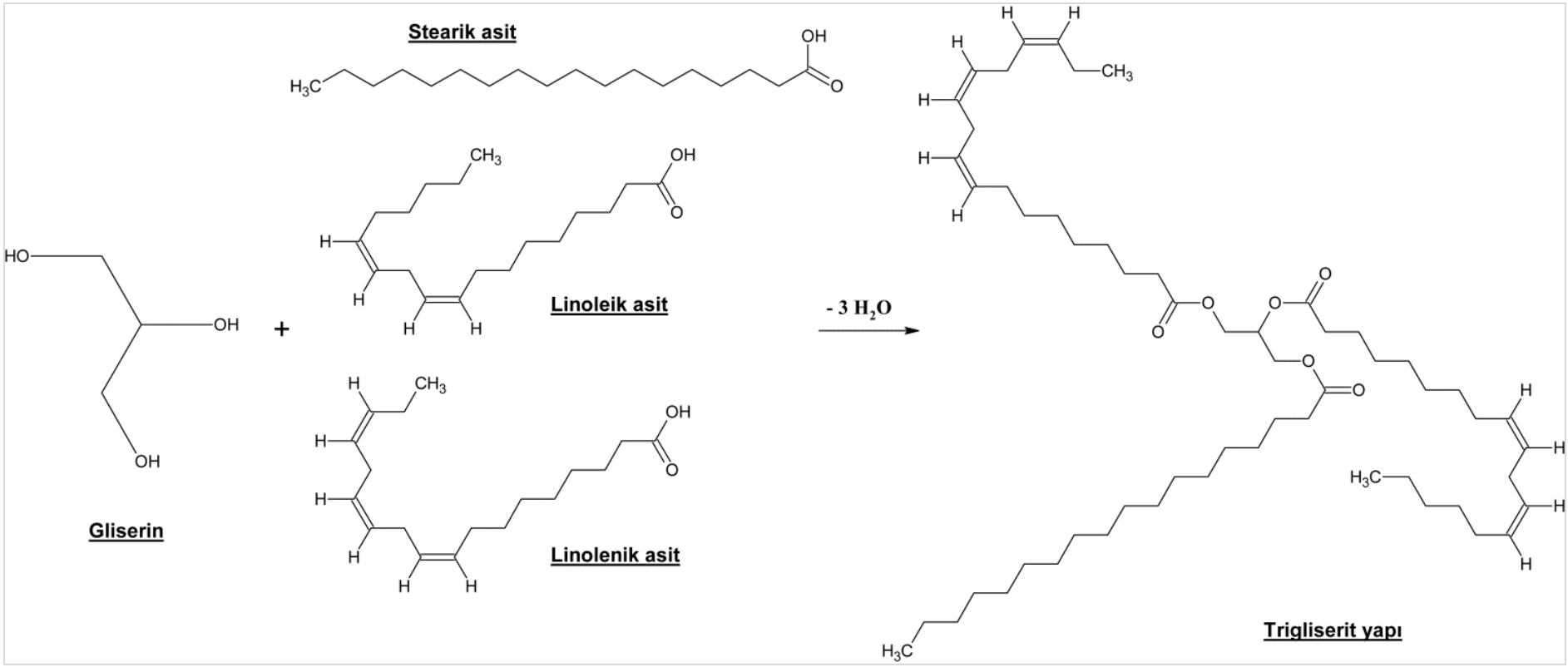
Yağlarda farklı fizikokiyasal özelliklere sahip temel ve ikincil bileşenlerin tümünü ifade etmek için, *lipit* terimi kullanılmaktadır (Cert ve ark., 2000). Yağlarda mevcut lipit bileşenleri; biyolojik aktivite ve kimyasal kompozisyon bakımından farklılık gösteren geniş bir lipit grubunu ifade etmektedir. Lipitler; biyolojik aktivite, kimyasal kompozisyon ve fiziksel özellikleri esas alınarak, 3 farklı grupta sınıflandırılmaktadır. Yapılan diğer bir sınıflandırmada ise; fizikokimyasal özelliklerindeki farklılıkları esas alarak, *nötral* ve *polar lipitler* olmak üzere iki temel grupta sınıflandırmaktadır (Sikorski ve ark., 2003; Christie ve ark., 2010).

### 1.3.1. Nötral lipitler

Nötral lipitler; nötral çözücü sistemlerinde kimyasal yapılarına bağlı olarak çözünme özelliği ve polaritelerine göre farklı mobilite özelliği gösteren lipit bileşenleri olarak tanımlanmaktadır. Nötral lipitler; fizikokimyasal farklılıkları esas alınarak daha nötral özellik gösteren lipitler (*trigliserit, vaks esteri, steril esterler, eter lipitleri*) ve hidroksil veya karbonil gibi grupların varlığı nedeniyle daha polar özellik gösteren lipitler (*serbest yağ asidi, yağ alkolleri, tokoferol, tokotrienol, diaçilgliserol, monoaçilgliserol, serbest sterol*) olmak üzere iki temel grupta incelenmektedir (Sikorski ve ark., 2003).

- **Trigliseritler.**

Trigliseritler; bir mol gliserolün üç mol yağ asidi ile esterleşmesi sonucu meydana gelen gliserit yapılar olup yağların temel bileşeni olarak tanımlanmaktadır (Şekil 1.1). Trigliserit molekülünde; sn-1, sn-2 ve sn-3 pozisyonlarında aynı tür yağ asitleri bağlı ise yapı *"basit trigliserit"*, farklı tür yağ asitleri bağlı olduğunda ise *"karışık trigliserit"* olarak tanımlanmaktadır. Doymuş yağ asitleri genel olarak sn-1 ya da sn-3 pozisyonlarında yer alırken, doymamış yağ asitleri sn-2 pozisyonunda yer alma eğilimi göstermektedir. Trigliseritlerin yapısında yer alan yağ asitlerinin türü ve gliserine bağlı bulundukları pozisyon; yağların kimyasal ve fiziksel karakteristiklerini belirleyen en temel faktör olarak ifade edilmektedir (O'Brien, 2004).

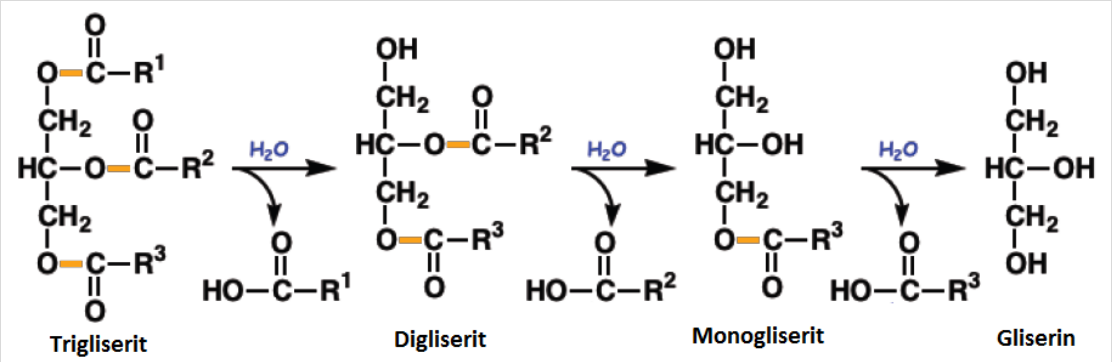



**Şekil 1. 1.** Stearik, linoleik ve linolenik asitten oluşan trigliserit molekülünün oluşum reaksiyonu

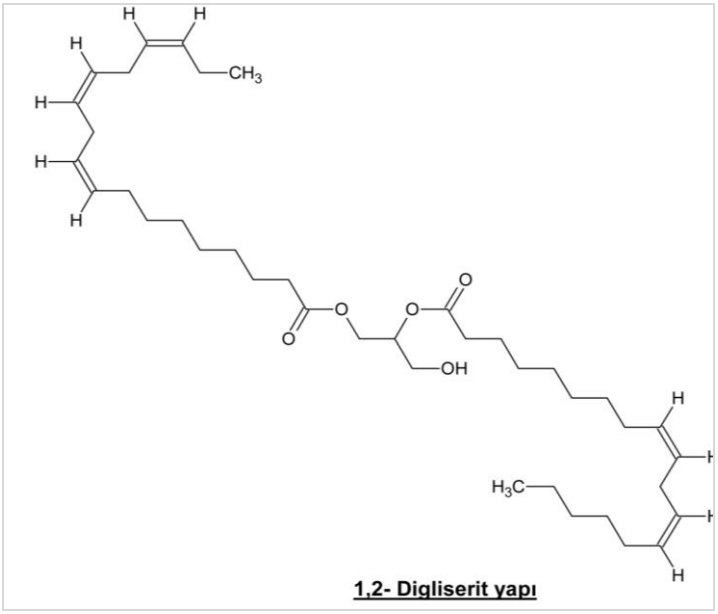
- **Digliserit ve monogliseritler.**

Digliseritler; gliserinin aynı yada farklı iki yağ asidi ile esterleşmesi sonucu meydana gelen gliserit yapılardır (Şekil 1.2 ve 1.3). Gliserin molekülüne sn-1 ve sn-2 pozisyonlarında yağ asitlerinin bağlanması ile oluşan yapılar *"1,2-digliserit"* olarak adlandırılırken, sn-1 ve sn-3 pozisyonlarında yağ asitlerinin yer alması ile oluşan yapılar ise *"1,3-digliserit"* olarak adlandırılmaktadır. Digliserit molekülleri; trigliseritlerin hidrolizi sonucu doğal yöntemler ile yada sentetik olarak özel amaçlar için üretilmektedir.

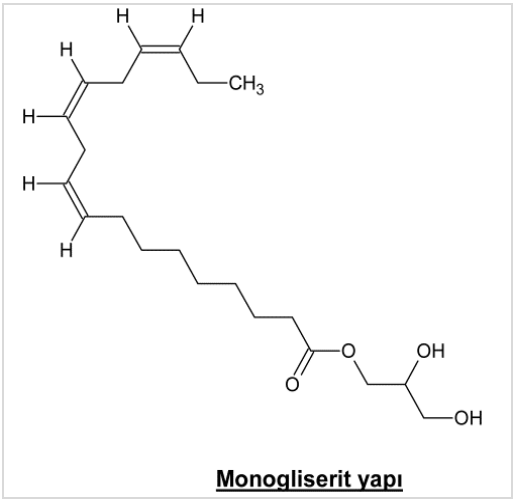
Monogliseritler; gliserinin tek bir yağ asidi ile esterleşmesi sonucu meydana gelen gliserit yapılar olarak tanımlanmaktadır (Şekil 1.4). Monogliserit yapılar, trigliserit yada digliserit moleküllerinin hidrolizi sonucu doğal olarak oluşabildikleri gibi, özel kullanım amaçları için de sentezlenebilmektedirler. Yenilebilir yağlarda, mono ve digliserit yapıların miktarının düşük olması kalite açısından istenen bir özellik olmakla birlikte, yağın rafinasyon prosesinde işlem kolaylığını sağlamaktadır (Arslan, 2009).




**Şekil 1. 2.** Trigliserit, digliserit ve monogliserit bileşenlerine ait kimyasal yapılar




**Şekil 1. 3.** Linoleik ve linolenik asitten oluşan 1,2-digliserit molekülüne ait kimyasal yapı




**Şekil 1. 4.** Linolenik asitten oluşan monogliserit molekülüne ait kimyasal yapı

Digliserit ve monogliseritler polar ve apolar özellikteki grupların her ikisini de içermesi nedeniyle; hem suda hem de yağda çözünebilme özelliği gösteren yapılardır. Bu özellikleri nedeniyle yüzey aktif madde olarak tanımlanmakta ve gıda sanayinde emülgatör (kıvamlaştırıcı) olarak geniş bir kullanım alanına sahiptirler. Bunun yanında, yağ-su emülsiyonu içeren gıda maddelerinde yapısal bozunmayı önledikleri için tercih edilmektedirler. Monogliseritlerin yağdaki su emülsiyonlarının oluşumu ve dayanıklılığı üzerine olan etkileri ve kristalizasyon işlemini hızlandırmaları nedeniyle; yemeklik yağ üreticileri tarafından özellikle tercih edilmektedirler. Margarin üretiminde monogliseritler kullanılarak, mikrokristallerden oluşan homojen yapının oluşumu

sağlamaktadır. Digliserit yapılar, monogliseritlere kıyasla daha az polar özellik göstermekte ve trigliserit yapılara benzer davranışlar göstermektedirler (Çiftçi, 2006).

- **Serbest yağ asitleri.**

Katı ve sıvı yağlarda, gliserine bağlı olmayan ve yağda serbest halde bulunan yağ asitleri olarak tanımlanmaktadır. Yağlarda bulunan serbest yağ asitleri (FFA) toplamı; 1 g yağın nötralleşmesi için gerekli olan KOH`un mg ağırlığı olarak belirtilmekte ve yüzde oleik asit cinsinden ifade edilmektedir. Serbest yağ asidi içeriği, yenilebilir yağların kalite durumunu gösteren önemli bir indeks kabul edilmektedir. Serbest yağ asidi içeriğinin artması ya da yağın doğal yapısı itibariyle yüksek miktarda bulunması; belirtilen yağın oksidasyona karşı kararlılığının azalması ya da acılaşması anlamına gelmektedir (Pehlivan, 2009).

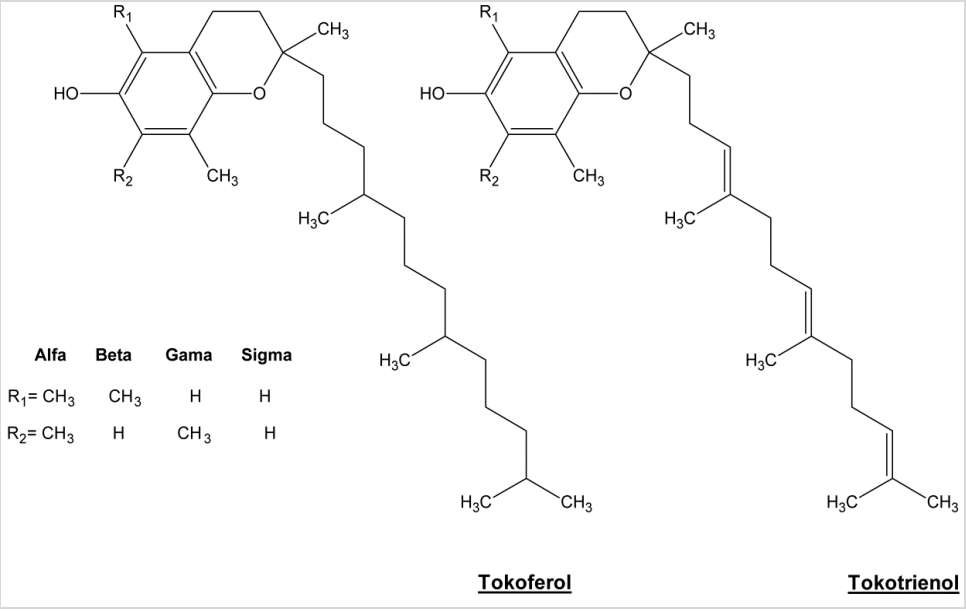
Serbest yağ asidi içeriği özellikle ham yağlarda yüksek miktarda tespit edilmekte, bu nedenle ham yağlarda serbest yağ asidi içeriğinin tespiti kalite-kontrol için önem arz etmektedir. Yağın rafinasyon işlemine tabi tutulmasıyla, bu miktar yenilebilir yağlara ait tebliğlerdeki kritik değerlere indirilmektedir. Sonuç olarak; yağların üretim prosesleri süresince serbest yağ asidi içeriğindeki değişimlerin sürekli olarak takibi, kalite-kontrol açısından önem arz etmektedir (Çiftçi, 2006). Serbest yağ asidi değerinin; rafine yağlarda en çok 0,6 mg KOH/g yağ, soğuk press ve natürel yağlarda en çok 4,0 mg KOH/g yağ olması istenirken; sadece natürel palm yağında 10,0 mg KOH/g yağ değeri maksimum kabul sınırı belirlenmiştir (Türk gıda kodeksi tebliği, 2011).

- **Tokoller (tokoferol ve tokotrienoller).**

Tokoller (tokoferol ve tokotrienoller); bitkisel kaynaklı yağlarda mevcut antioksidanların ve vitaminlerin sentezleyicisi olan doğal bileşenlerdir. Bu doğal antioksidanlar; hidroperoksitleri ve diğer serbest radikalleri stabil hale getirerek yada kendileri oksitlenerek yağ içerisindeki diğer bileşenlerin oksidasyonunu önlemektedir (Berien, 2004; Gunstone, 2008).

Yağlarda doğal antioksidan madde olarak tanımlanan tokoller; metil tokoferoller ve metil tokotrienoller olmak üzere iki grupta incelenmektedir (Şekil 1.5). Tokoferol molekülleri doymuş zincir yapısına sahipken, tokotrienoller doymamış zincir yapısına

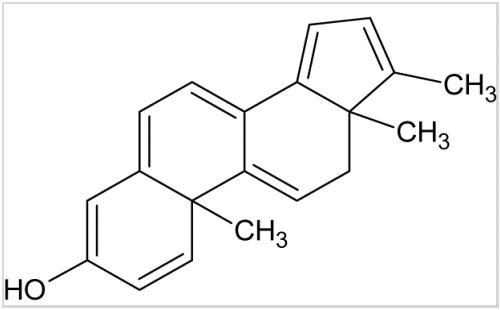
sahip moleküllerdir. Bu iki grubun temel farklılığı; tokotrienol molekülündeki 3'−4', 7'−8' ve 11'−12' karbonlar arasındaki çift bağların varlığıdır. Tokoferol ve tokotrienol bileşenlerinin her ikisinin de; alfa (α), beta (β), gama (ɣ) ve sigma (δ) olmak üzere dörder adet izomer yapısı bulunmaktadır. Bu yapılardan alfa izomerinin biyolojik olarak en aktif tür olduğu, gama izomerinin ise en iyi antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirtilmektedir (Sikorski ve ark., 2003; Konuşkan, 2008). Tokoller, yağların oksidasyonunun ilk aşamalarında oksidasyon reaksiyonlarına karşı gösterdikleri etki bakımından fenolik bileşiklerle yarış halindedir. Tokoller, tekli doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunda, çoklu doymamış yağ asitlerine oranla daha az kayıp göstermektedirler. Tokolerin antioksidan etkileri; ortam sıcaklığına ve fenolik maddeler ile yarışmalı reaksiyonlarındaki kaybolan/azalan miktarlarına bağlı olarak değişmektedir. Yapılan çalışmalarda; yağların içerdikleri yağ asit kompozisyonları ve tokol madde miktarı ve çeşidi arasında, belirgin bir ilişki olduğu belirtilmektedir. Tokollerin yağ türleri için gösterdiği bu farklılıktan yararlanarak, yağlardaki tağşişin varlığı kolaylıkla tespit edilebilmektedir (Konuşkan, 2008). Yağlardaki doğal antioksidan miktarı, rafinasyon prosesinin her bir basamağında kademeli olarak azalmakta ve en fazla azalma deodorizasyon işlemi süresince gerçekleşmektedir. Rafinasyon prosesinin nötralizasyon basamağında, tokol içeriğinde yaklaşık 10-20% oranında azalma meydana gelirken, deodorizasyon kademesinde 30-60% oranında azalma tespit edilmektedir (Kara, 2013).




**Şekil 1. 5.** Tokoferol ve tokotrienol izomerlerine ait kimyasal yapılar

- **Steroller.**

Steroller; steran halkası içeren polisiklik alkoller olup, serbest ya da yağ asitleri ile esterleşmiş olarak (bağlı formda) bulunabilen esansiyel minör bileşenlerdir. Sterol molekülü; siklopentanopenantren halkasına yani steroid çekirdeğine sahip hidroksillenmiş polisiklik izopentanoitten meydana gelen ve 30 karbon atomu içeren yapılardır (Şekil 1.6). Doğal sterollerin pek çoğu, iki halkanın birleştiği yerde köşeli pozisyonda bir veya daha fazla sayıda metilen grubuna sahip moleküllerdir. Sterollerin yapıları; yan zincir çeşidine, halka yapısının modifikasyon miktarına ve uzunluğuna bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Yan zincir büyüdükçe sterol daha hidrofobik bir yapı gösterir, bunun sonucunda serbest steroller ve steril esterler; apolar çözücülerde çözünme özelliği göstermektedir (Sikorski ve ark., 2003; Konuşkan, 2008).

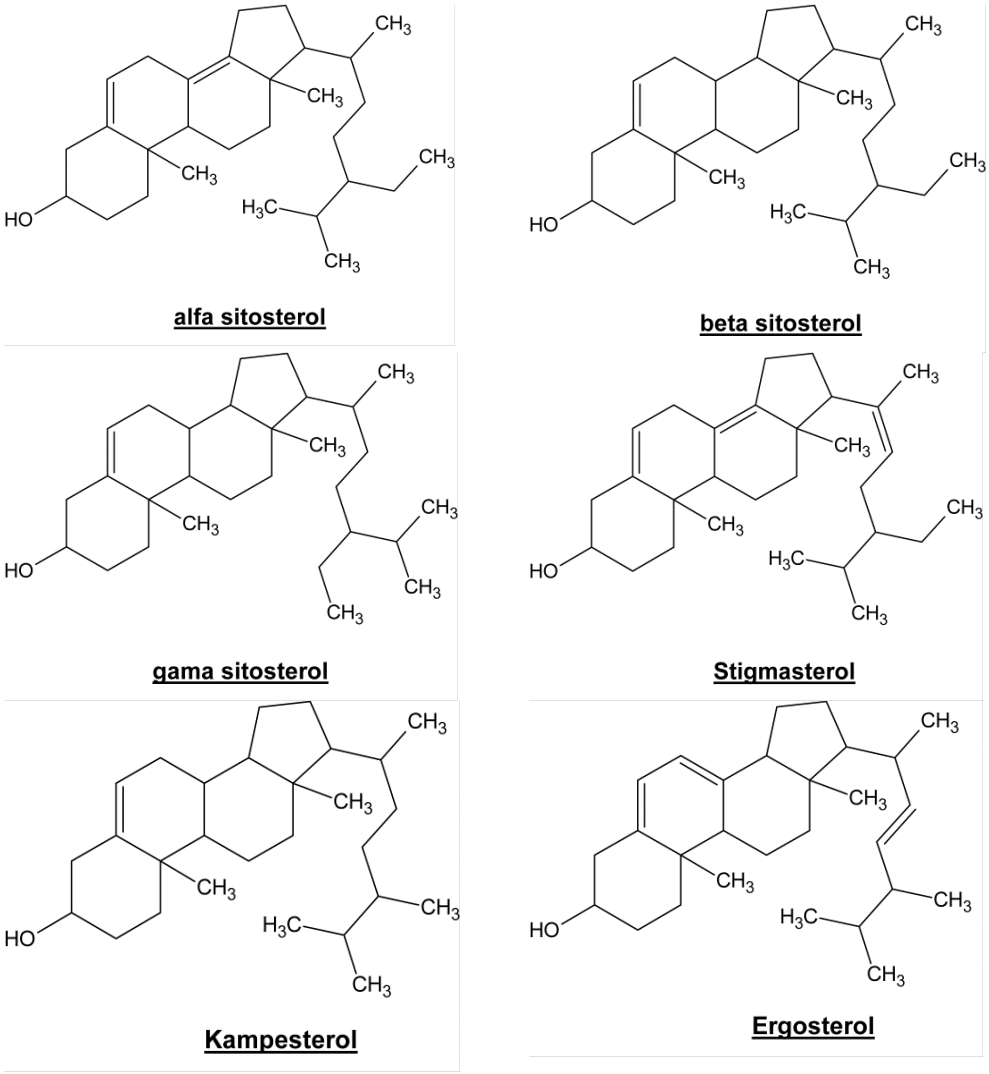



**Şekil 1. 6.** Siklopentanopentanentren (steran) halkasına ait kimyasal yapı

Steroller sentezlendikleri kaynağa göre; zoosteroller (hayvansal kaynaklı steroller) ve fitosteroller (bitkisel kaynaklı steroller) olmak üzere iki temel grupta sınıflandırılmaktadır. Bitkilerde serbest alkol, yağ asitleriyle esterleşmiş, glikozitler ya da açilglikozitler şeklinde bulunurken, yemeklik yağlarda serbest ya da esterleşmiş halde bulunmaktadır. Bitkisel yağlarda doğal olarak bulunan steroller, fitosteroller olarak tanımlanırken; başlıca yer alan türleri sitosterol, stigmasterol, kampesterol ve ergosterol molekülleridir (Şekil 1.7) (Konuşkan, 2008).

Sterol bileşiklerinin geniş bir biyolojik aktiviteye ve fiziksel özelliklere sahip oldukları bilinmektedir. Bitkisel yağlarda mevcut fitosteroller, yağlara karakteristik özellik kazandırmakta, bu nedenle yağların tanımlanması ve tağşişinin tespitinde sıklıkla kullanılmaktadır. Bunun yanında, sterollerin yüksek ısıl işlemlere tabi tutulan yağlarda polimerleşmeye karşı bir reaktif olarak davrandıkları ve oksidatif bozulmayı önledikleri bilinmektedir. Düşük sıcaklıklarda etkisiz gibi görünen steroller, yüksek

sıcaklıklarda daha aktif durumda bulunmaktadır. Ayrıca fitosteroller ve esterleri kolesterol düşürücü etkileri nedeniyle, diyette sıklıkla önerilmektedir (Konuşkan, 2008).




**Şekil 1. 7.** Bitkisel yağlarda mevcut bazı sterol türlerine ait kimyasal yapılar

- **Vakslar.**

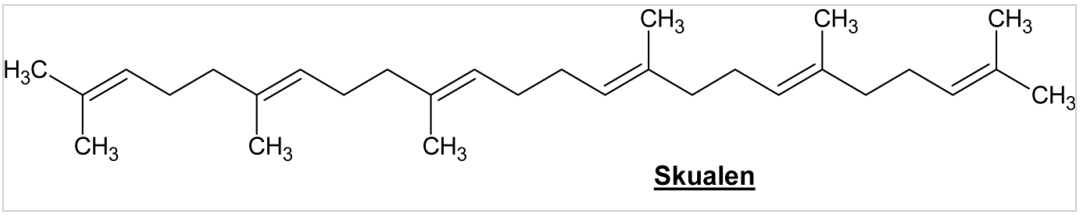
Vakslar (mumsu maddeler); uzun zincirli yağ asitlerinin yüksek molekül ağırlıklı doymuş mono alkoller ile oluşturdukları esterler olarak tanımlanmaktadır. Vakslar, ester formunda bulunan bileşikler olmaları nedeniyle; oluşumlarındaki alkol ve asitlerin zincir uzunluklarına bağlı olarak farklı fizikokimyasal özellikler göstermektedir. Vakslar; kimyasal olarak kararlı, pek çok organik çözücüde ve suda çözünme özelliği göstermeyen bileşiklerdir. Genellikle; yağlık ham maddelerin işlenmeleri esnasında eriyerek ham yağa karışmaktadırlar. Yağlarda istenmeyen bulanık bir görüntü

oluşturmaları, besleyici özelliklerinin olmaması ve sindirimlerinin zorluğu nedeniyle; rafinasyonda, vinterizasyon prosesi ile etkin bir şekilde uzaklaştırılmaları istenmektedir (Kayahan, 2003; Sikorski ve ark., 2003).

- **Skualen.**

Skualen, yağlarda mevcut doğal terpenoid hidrokarbonlardır (Şekil 1.8). Yağların sabunlaşmayan kısmının yaklaşık olarak 40%'ını oluşturan önemli minör bileşenler olarak ifade edilmektedir. Tohum yağlarında ve zeytinyağında önemli miktarda bulunduğu yapılan çalışmalarda belirtilmektedir (Konuşkan, 2008).

Skualen bileşiği; yağlarda doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu geciktirmekte ve yağlarda polimerizasyon reaksiyonunu sınırlamaktadır (Manzi ve ark., 1998; Moreda ve ark., 2001). Bunun yanında, yağların ısıl işlemlere karşı kararlılığını arttırdıkları ve sterol, tokoferol gibi bileşenlerle birlikte yağın kararlılığının artmasında katkı sağladıkları bilinmektedir. Antioksidanların bulunmadığı durumlarda, karanlık ortamlarda ve düşük sıcaklıklarda skulaen bileşiğinin antioksidan etki gösterdiği yapılan çalışmalarda belirtilmektedir. Skualen bileşiği, vücuda alındıktan sonra genellikle deri altında depo edilmekte ve karaciğerde kolestrole dönüşmektedir (Velasco ve ark., 2002).




**Şekil 1. 8.** Skualen bileşiğine ait kimyasal yapı

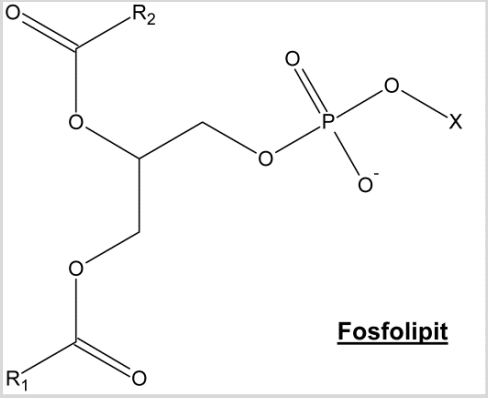
### 1.3.2. Polar lipitler

Polar lipitler; nötral çözücü sistemlerinde çözünme özelliği göstermeyen ve oldukça polar özellikteki gruplara sahip lipit bileşenleri olarak tanımlanmaktadır. Polar lipitler; fosfolipitler ve glikolipitler olmak üzere iki temel lipit grubu içerisinde yer alan pek çok lipit türünü kapsamaktadır (Sikorski ve ark., 2003).

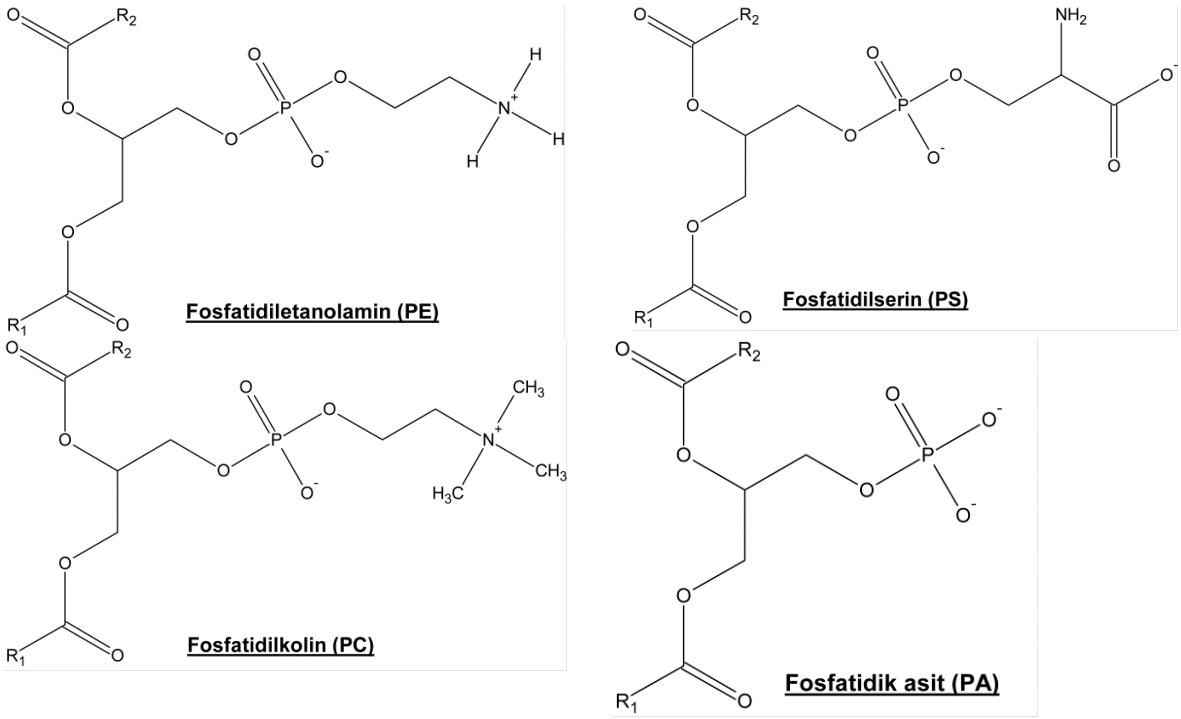
- **Fosfolipitler.**

Fosfolipitler; trigliserit molekülüne bağlı yağ asitlerinin birinin yerine fosfor grubunun bağlı olduğu lipit bileşenlerini ifade etmektedir. Gliserin molekülünün sn-1 ve sn-2 pozisyonundaki hidroksil grubu yağ asitleri ile esterleşirken, sn-3 pozisyonundaki hidroksil grubu fosfolipitin türüne göre farklılık gösteren bir "x" grubu ile birlikte bulunan $H_3PO_4$ ile esterleşmiş yapıya sahiptir (Şekil 1.9).

Ham yağlarda bulunan fosfolipidler; hidratlaşabilen ve hidratlaşmayan fosfolipitler olmak üzere iki grupta sınıflandırılmaktadır. Yağlarda bulunan fosfatidilkolin (PC), fosfatidilserin (PS) ve fosfatidiletanolamin (PE) bileşenleri oldukça yüksek hidratlaşma özelliğine sahip fosfolipit türleridir. Bunun yanında; fosfatidil etanolamin (PE) ve fosfatidik asit (PA)'in kalsiyum ve magnezyum tuzları ise hidratlaşmayan türler olarak bilinmektedir (Şekil 1.10) (Karahasan, 2012).




**Şekil 1. 9.** Fosfolipit bileşiğine ait genel kimyasal yapı




**Şekil 1. 10.** Bitkisel yağlarda mevcut bazı fosfolipit türlerine ait kimyasal yapılar

Fosfolipitler, doğal yağların yapısında oldukça yüksek miktarda bulunmalarına karşın, trigliserit içeriği ile kıyaslandıklarında oldukça düşük miktarlarda (0,02−3,5%) bulunan minör bileşen olarak ifade edilmektedir (Çizelge 1.1). Fosfolipid türleri ve içerikleri; yağlı tohum ya da meyvelerin yetişme & depolanma şartlarına, kalitesine ve ham yağ eldesi için uygulanan ekstraksiyon şartlarına göre farklılık gösterdiği bilinmektedir. Fosfolipitlerin; rafinasyon prosesinde yağ-su fazlarının ayrımını ve ağartma işlemini engelledikleri ve katalizör zehri olan kısa ömürlü lipit türleri oldukları tespit edilmiştir. Fosfolipidlerin yağların kalitesine ve rafinasyon verimine olumsuz yönde etki oluşturmaları nedeniyle, rafinasyon prosesinin ilk basamağında yani degumming prosesi ile uzaklaştırılmaları gerekmektedir. Gam olarak da ifade edilen fosfolipit türleri; sulu degumming prosesi ile ayrılmakta, daha sonra lesitin eldesi için kurutulmaktadır. Lesitin olarak geri dönüşümü sağlanan fosfolipidler, endüstriyel işlemlerde emülgatör ajanı olarak kullanılmaktadır (Cert ve ark., 2000; Karahasan, 2012).

**Çizelge 1. 1.** Katı ve sıvı yağlarda mevcut minör lipit türleri ve miktarları (O'Brien, 2004)

| | **Katı ve sıvı yağların minör lipit kompozisyonu (O'Brien, 2004)** | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | **Fosfatit (%)** | **Sterol (ppm)** | **Kolestrol (ppm)** | **Tokoferol (ppm)** | **Tokotrienol (ppm)** |
| **Soya yağı** | 2.2 | 2965 | 28 | 1293 | 86 |
| **Kanola yağı** | 2.0 | 8050 | 53 | 692 | - |
| **Mısır yağı** | 1.25 | 15050 | 57 | 1477 | 355 |
| **Pamuk yağı** | 0.8 | 4560 | 68 | 865 | 30 |
| **Ayçiçek yağı** | 0.7 | 3495 | 26 | 738 | 270 |
| **Aspir yağı** | 0.5 | 2373 | 7 | 460 | 15 |
| **Fıstık yağı** | 0.35 | 1878 | 54 | 482 | 256 |
| **Zeytinyağı** | <0.1 | 100 | <0.5 | 110 | 89 |
| **Palm** | 0.075 | 2250 | 16 | 240 | 560 |
| **H. cevizi yağı** | <0.07 | 805 | 15 | - | 49 |
| **Palm kernel** | <0.07 | 1100 | 25 | 6 | 30 |

## 1.4. Yağ Analizleri için Uygulanan Analitik Yöntemler

Yağ numunelerinde mevcut lipit türlerinin kalitatif ve kantitatif tayinleri için; uygulamadaki standart yöntemlerin iyileştirilmesine ve yeni yöntemlerin geliştirilmesine yönelik pek çok çalışma bulunmaktadır. Geleneksel prosedürlerin uygulandığı analitik yöntemler; kimyasal reaktif, çözücü ve numunenin yüksek miktarda kullanımını gerektiren, zahmetli ve zaman alıcı prosedürler olarak bilinmektedir. Standart yöntemler olarak tanımlanan bu yöntemler; yoğun bir şekilde kullanılmakla birlikte, alternatif modern analiz sistemlerinin ve yöntemlerin geliştirilmesine yönelik çalışmalar önem kazanmaya başlamıştır. Geliştirilen yöntemler; numune ve reaktiflerin az miktarda kullanımını gerektiren, kesinliği yüksek sonuçların elde edilebildiği, hızlı ve zahmetsiz yöntemlerdir. Bu yöntemlerin uygulamaları için kullanılan ekipman ve sistemler, pahalı ve karmaşık sistemlerdir. Lipit türlerinin ayrımı ve tayininde uygulanmakta olan yöntemler;

- klasik analitik yöntemler
- modern analitik yöntemler ve
- birleştirilmiş analitik yöntemler olmak üzere başlıca üç temel grupta sınıflandırılmaktadır (Gunstone, 2008).

### 1.4.1. Klasik analitik yöntemler

Katı ve sıvı yağların kalitatif ve kantitatif analizleri için uygulanan klasik analitik yöntemler, araştırma laboratuarlarında ve endüstride yoğun bir şekilde tercih edilmektedir. Endüstriyel olarak üretilen yağlar; kodekste yer alan değerler doğrultusunda uygun bir prosedüre göre kalite-kontrol analizlerine tabi tutulmaktadır. Ürünlerin kalite-kontrol analizler için uygulanan bu prosedürlerin; yüksek kesinlikte ve güvenilirlikte sonuçların eldesine imkân veren ve uygulanabilirliğinin kabul edilmiş yöntemler olması önem arz etmektedir.

AOAC (The Association of Official Analytical Chemists), AOCS (The American Oil Chemists' Society), BSI (The British Standards Institution), ISO (The International Organisation for Standardisation) ve IUPAC (The International Union of Pure and Applied Chemists) gibi çeşitli resmi kuruluşlar tarafından lipit türlerinin

tayinine ilişkin önerilen çok sayıda klasik analitik prosedür bulunmaktadır. Klasik analitik prosedürlerde; gravimetrik ve volumetrik analiz teknikleri yoğun bir şekilde uygulanmakta ve klasik laboratuar ekipmanları kullanılmaktadır. Yağlarda; *ekstraksiyon (yağ içeriği), doymamışlık (iyot değeri), asidite, sabunlaşma (serbest yağ asidi değeri), sabunlaşmayan madde içeriği, oksidatif bozunma miktarı (peroksit sayısı, anisidin değeri, stabilite)* ve *oksidatif stabilite tayini* gibi pek çok analiz belirtilen resmi kuruluşlar tarafından onaylı standart metotlar uygulanarak gerçekleştirilmektedir.

### 1.4.2. Modern analitik yöntemler

Bitkisel yağlarda mevcut lipit bileşenlerinin tayini için günümüzde yaygın olarak kullanılan pek çok modern analiz sistemi ve prosedürü bulunmaktadır. Modern analitik yöntemlerin uygulamaları için kullanılan bu sistemler, oldukça pahalı ve karmaşık sistemlerdir. Modern sistemler üzerinde uygulanan/geliştirilen yağ analiz metotlarının; numune ve reaktiflerin az miktarda kullanımını gerektiren, kesinliği yüksek sonuçların elde edilebildiği, hızlı ve zahmetsiz yöntemler olduğu bilinmektedir. Modern analitik yöntemler;

- spektroskopik analiz teknikleri
- elektrokimyasal analiz teknikleri
- katı-faz ekstraksiyon analiz teknikleri
- kromatografik analiz teknikleri ve
- akış enjeksiyon analiz teknikleri olmak üzere farklı yöntem ve analiz sistemleri kullanılarak gerçekleştirilmektedir.

Sunulan tez çalışma konusu kapsamında yer alması bakımından; katı faz ekstraksiyon (SPE), yüksek performanslı kromatografi (HPLC) ve akış enjeksiyon analiz (FIA) tekniklerine ait teorik bilgi ve yağ analizleri için uygulamalarına kapsamlı olarak yer verilmeye çalışılmış, diğer modern analitik yöntemler hakkında ise fazla detaya girmeden yağ analizlerine ait uygulamalarından bahsedilmeye çalışılmıştır.

### 1.4.2.1. Katı faz ekstraksiyon (SPE) tekniği

SPE tekniği; çevre, ilaç ve gıda gibi pek çok alanda uygulanabilen hızlı ve etkin bir ayırma ve ön-deriştirme (zenginleştirme) tekniği olarak tanımlanmaktadır. Sıvı-sıvı ekstraksiyon tekniğine alternatif olarak 1970'li yıllarda yeni bir teknik olarak katı faz ekstraksiyon metodu kullanılmaya başlanmış, daha sonrasında teknik etkili bir örnek hazırlama yöntemi olarak geniş bir kullanım alanı bulmuştur. Klasik sıvı-sıvı ekstraksiyon tekniği ile karşılaştırıldığında; daha hızlı, az çözücüye ihtiyaç duyulan ve ucuz bir teknik olduğu, bunun yanında yüksek saflıkta ve geri kazanımda fraksiyonların elde edilebildiği pek çok çalışma ile kanıtlanmıştır (Çallı Altun, 2007).

SPE tekniğinde; numune ticari olarak temin edilebilen tek kullanımlık katı faz kartuşuna yada kolonuna adsorplanmakta, hedef analit saflaştırılmakta yani girişim yapma ihtimali olan bileşenlerden temizlenmekte ve derişik hale getirilmektedir. Daha sonra analit, uygun bir çözücü ile katı faz materyalinden elüe edilerek, herhangi bir enstrümantal analize uygun hale getirilmektedir (Demirkan, 2007).

Günümüzde, yenilebilir katı ve sıvı yağların karakteristik özelliklerini belirleyen ve ön-zenginleştirme gerektiren düşük konsantrasyondaki lipit türlerinin tayinlerinde; daha hızlı, az çözücüye ihtiyaç duyulan ve çok daha ucuz bir yöntem olan SPE tekniğinin kullanımı ile ilgili pek çok çalışma yürütülmektedir. Yağlarda minör lipit türlerin tayininde; türlerin yağın ~2-5%'lik kısmını oluşturması, farklı polarite değerlerine sahip olmaları ve yağın temel bileşenleri olan trigliseritlerden izole edilmeleri gerektiğinden, numune ön zenginleştirme işlemleri büyük önem arz etmektedir (Cert ve ark., 2000).

Yağlarda bulunan yağ alkolleri, uçucu bileşenler, pigmentler, fenolik bileşikler, vakslar, minör gliserik bileşikler, hidrokarbonlar, triterpenik asitler, tokoller ve fosfolipidler gibi minör lipit türleri; tek kullanımlık mini ekstraksiyon kolonlarında adsorban içerisinde tutulmakta ve ayrımı hedeflenen lipit türüne göre farklı çözücü sistemleri ile tayinleri gerçekleştirilmektedir (Aluyor ve ark., 2009). Belirtilen minör türlerin kalitatif ve kantitatif tayinlerinde; daha önce de belirtildiği üzere, öncelikle trigliseritlerden izole edilmeleri, deriştirmeleri, sonrasında farklı analitik teknikler ile analiz edilmeleri gerekmektedir (Çizelge 1.2) (Sikorski, 2003).

**Çizelge 1. 2.** Lipit türlerinin ayrımlarında etkili olan çözücüler ve polarite derecelendirmesi

| ***Lipit Türleri ve Ayrımlarında Etkili olan Organik Çözücüler Arasındaki Genel Derecelendirme (Sikorski, 2003)*** | | |
|---|---|---|
| **Lipit türleri** | | **Çözücüler** |
| Hidrokarbonlar | ***Az polar*** | Hekzan |
| Vaks esterleri | | Siklohekzan |
| Aldehitler | ⇩ | Dietileter |
| Trigliseritler | | Kloroform |
| Yağ alkolleri | | Aseton |
| Yağ asitleri | ***Daha polar*** | Asetonitril |
| Steroller | | Etanol |
| Digliseritler | | Metanol |
| Monogliseritler | | |
| Fosfolipitler | | |

SPE uygulamalarında lipit türleri ve adsorban arasında meydana gelen etkileşimlere göre; $C_{18}$, $C_8$ ve $C_2$ yapılı adsorbanlar nötral lipitlerin ayrımında kullanılırken; siyano (CN), amino ($NH_2$), diol veya silika (Si) yapılı adsorbanlar ise polar lipitlerin ayrımında kullanımı uygun katı destek maddeleri olarak ifade edilmektedir (Mc Donald ve ark., 1995; Ruiz-Gutierrez ve ark., 2000). Bu destek maddeleri arasında, nötral ve polar lipit türlerinin ayrımında en geniş kullanım alanı bulan katı destek materyali silikajel'dir. Çözücü seçiminde ise; geniş bir aralıkta çözücü seçeneği söz konusudur. Hekzan, siklohekzan, dietileter, koroform, aseton, asetonitril, etanol ve metanol gibi çözücülerin uygun karışımlarının; nötral ve polar türlerin ayrımında yaygın olarak tercih edilen çözücü sistemleri olduğu görülmektedir (Hopia ve ark., 1992; Marquez-Ruiz, 1997).

### 1.4.2.2. Kromatografi tekniği

Kromatografi; bir karışımı oluşturan bileşenlerin hareketli bir faz yardımıyla sabit bir faz üzerinden, fiziksel ve kimyasal özelliklerindeki farklılıklarından faydalanılarak değişik hızlarla hareket etmeleri esasına dayanan; etkin bir ayırma ve saflaştırma metodudur (Skoog ve ark., 1996). Kromatografi; günümüzde birçok alanda yaygın bir şekilde kullanılan etkili ve seçiciliği yüksek bir yöntem olup, farklı amaçlar için geliştirilen çok sayıda uygulaması bulunmaktadır (Gezici, 2010).

Kromatografik ayırmalarda numune; gaz, sıvı yada süper kritik akışkan olan bir hareketli faz ile sisteminde taşınır. Hareketli faz, bir kolonda veya bir katı yüzeyde sabitleştirilmiş, kendisi ile karışmayan sabit faz içerisinden geçmeye zorlanır. Bu iki faz, numunedeki bileşenlerin hareketli ve sabit fazlarda farklı oranlarda dağılacağı şekilde seçilmektedir. Numunedeki bileşenler ile sabit faz arasında, kimyasal ve fiziksel etkileşimler söz konusudur. Numunenin sabit faz üzerindeki/içerisindeki göçü; hareketli ve sabit faz arasındaki fiziksel ve kimyasal dengelerin dağılımına bağlı olarak değişmektedir (Skoog ve ark., 1999).

Kromatografik teknikler genel olarak;

- hareketli ve sabit fazlarının yapısına göre
- hareketli ve sabit fazın fiziksel olarak temasa getirilme şekline göre
- kullanım amacına göre ve
- bileşenlerin ayrılmasında rol alan fiziksel / kimyasal mekanizmaların türüne göre

4 temel başlık altında sınıflandırmak mümkündür.

Hareketli ve sabit fazların yapısına göre yapılan sınıflandırmada; sırasıyla hareketli ve sabit fazın fiziksel durumu belirtilerek sınıflandırma yapılmaktadır. Yapılan bu sınıflandırmada kromatografi; sıvı-sıvı kromatografisi, sıvı-bağlı faz kromatografisi, sıvı-katı kromatografisi, gaz-sıvı kromatografisi ve süperkritik akışkan kromatografisi olmak üzere beş farklı kategoride gruplandırılmaktadır.

Hareketli ve sabit fazın fiziksel olarak temas ettirilme şekline göre yapılan sınıflandırmada; kolon ve düzlemsel kromatografi tekniği olmak üzere iki grupta sınıflandırılmaktadır.

Analiz edilen numunedeki bileşenlerin ayrılmasında rol alan fiziksel/kimyasal mekanizmaların türüne göre yapılan sınıflandırmada; adsorpsiyon, dağılma, iyon-değiştirme, gümüş iyon, boyut eleme, zone elektroforez, afinite ve kiral kromatografi tekniği olmak üzere sekiz farklı yöntem şeklinde gruplandırılabilmektedir.

Kullanım amacına göre yapılan sınıflandırmada ise; analitik kromatografi (kalitatif ve kantitatif kromatografi) ve preparatif kromatografi (karışımlardan saf madde eldesi) tekniği olmak üzere iki grupta sınıflandırılmaktadır.

Kromatografik tekniklere olan bakış açıları doğru ve güvenilir şekilde yayınlandığı takdirde; ayırma, belirleme ve miktar tayini için oldukça güvenilir tekniklerdir.

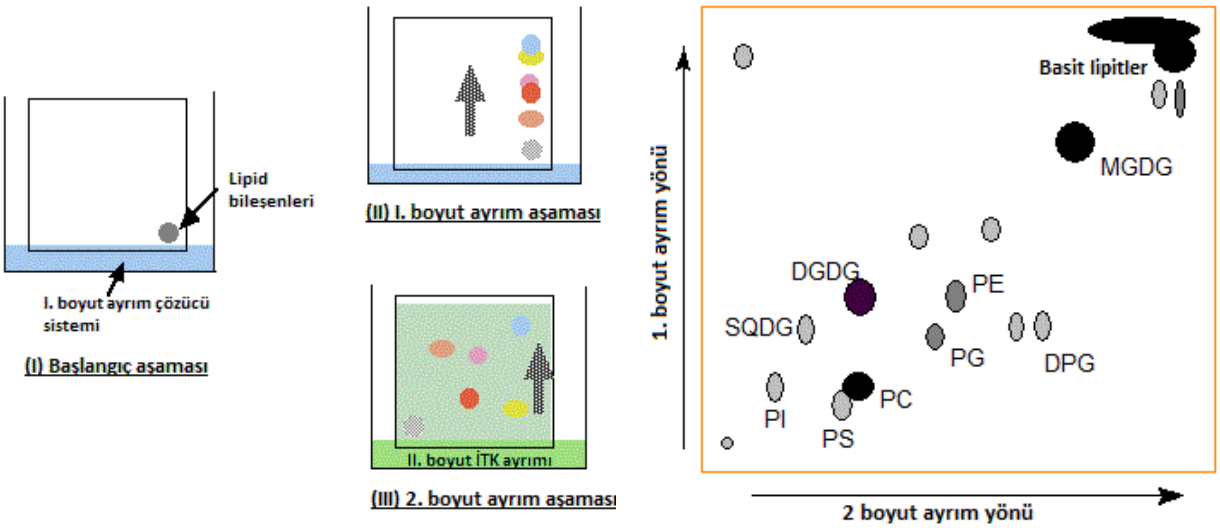
Kromatografik yöntemler, yüzlerce maddeden oluşan karışımların analizine dahi imkân sağlayabilmektedir. Bu analizler; güçlü ayırma kabiliyetine sahip yüksek performanslı sıvı kromatografi cihazı (HPLC), gaz kromatografi cihazı (GC) gibi modern ve pahalı analitik enstrümanların kullanımını gerektirmektedir. Ön ayırma/deriştirme işlemleri için ise; ince tabaka (İTK) ya da kolon kromatografi (CC) sistemlerinin kullanıldığı kromatografik tekniklerin uygulamaları tercih edilmektedir (Skoog ve ark., 1999).

Bu uygulamalardan ve teorik bilgilerden, tez konusu kapsamında yer alması bakımından kısaca bilgi verilmeye çalışılmıştır.

#### 1.4.2.2.1. İnce tabaka kromatografi (İTK) tekniği

İnce tabaka kromatografi (İTK) tekniği; genellikle analitik yöntemlerin ön işlem basamağında hedef türlerin izole edilmesi yada numunedeki türlerin direkt olarak ayrımı ve tayini için uygulaması bulunan bir yöntemdir. İnce tabaka metotları ile yüksek verimlilikte ayırma etkinliği sağlanabilmekte ve benzer lipit sınıfları içerisinde türlerinin ayrımı için sıklıkla kullanılmaktadır. Örneğin; polar lipit fraksiyonu içerisinde fosfolipit türlerinin ayrımı ve tayini, yağ asitlerinin farklı zincir uzunlukları ve doymamışlık derecelerine göre ayrımları sağlanabilmektedir.

İTK tekniğinde; sabit faz olarak genellikle cam ya da alüminyum plaka yüzeyine tek bir formda bağlanmasını sağlayan, farklı türler ile yüzeye bağlanmış silika kullanılmaktadır. Numunenin plakanın başlangıç noktasına uygulanmasının ardından, hareketli fazın içerisinde bulunduğu tank içerisine yerleştirilir. Bu durum, işlem tamamlanana kadar devam eder ve kapiler etki ile sabit faz yüzeyinde türlerin ayrımı gerçekleşir. Numune bileşenleri, hareketli fazın ilerleme doğrultusunda polarite değerlerine bağlı olarak ayrılmaktadır. İTK tekniğinde numunede ayrımı hedeflenen bileşenlerin fraksiyonlar halinde değil, sabit faz üzerinde yerleşmiş bir şekilde ayrımı sağlanmaktadır. Bu durum, kolon kromatografisi ile kıyaslandığında iki önemli avantaj ve bir dezavantaj sunmaktadır. İlk avantajı; aynı yada farklı hareketli faz içerisinde İTK plakasını tekrar şartlandırma durumu söz konusudur. Böylece bileşenlerin ayrımının iyileştirilmesi sağlanabilmektedir. Bu işlem, aynı boyutta yada ikinci boyutta gerçekleşebilmektedir (Şekil 1.11.) (Christie ve ark., 2010). İki boyutlu İTK tekniği; oldukça kompleks lipit türlerinin ayrımı veya benzer polarite değerlerindeki lipit türlerinin ayrımı için oldukça yararlı bir teknik olarak bilinmektedir.




**Şekil 1. 11.** Lipit türlerinin tek ve iki boyutlu İTK ayrımına ait şematik gösterim

İkinci avantajı; plaka üzerinde dikkatlice tespit edilen bölgelere göre bileşenlerin tanınmasına imkan sağlamasıdır. Bu durum, her bir bileşenin başlangıç noktasından bileşenin ilerlediği noktaya kadarki mesafenin tespiti anlamına gelmekte ve $R_f$ değeri olarak ifade edilmektedir. Ayrılan bileşenlerin tanınması için, lipit türlerinin boya kullanılarak görünür hale getirilmesi gerekmektedir. Lipit bileşenleri, İTK plaka üzerinde rhodamine-6G, iodine buharı veya 2',7'-dichlorofluorescene gibi reaktifler kullanılarak zarar vermeden görünür forma getirilmektedir.

İTK tekniğinin dezavantajı ise; sabit faz üzerinde lipit bileşenlerinin kurutulmasına imkân verildiğinde bazı bileşenlerin oksidasyona uğrama meylinin arttırılmasıdır. Kullanılan boyar maddelerden pek çoğu, bileşenlerin belirlenmesi için faydalı olmakla birlikte, boyamayla birlikte numunenin bozulmasına da sebep olmaktadır. Bozunmaya sebep olamayan boyalar kullanıldığında, lipit türlerinin oluşturduğu spotlar plaka yüzeyinden kazınarak alınmakta ve lipitler sabit fazdan ekstrakte edilerek kantitatif olarak tayin edilebilmektedir.

#### 1.4.2.2.2. Kolon kromatografi (CC) tekniği

Kolon kromatografi (CC) tekniği; lipit fraksiyonlarının direk belirlenmesi, izole edilen türlerin kantitatif tayini veya lipit bileşenlerinin türevlendirilmesi gibi pek çok ön prosedür için oldukça elverişli bir yöntemdir. Kolon kromatografisi; hedef analitin herhangi bir sabit faz üzerinde adsorpsiyonu yada dağılımının sağlanması, sonrasında artan polariteleri ve hareketli fazın gücüne bağlı olarak sabit fazdan elue edilmeleri olarak da ifade edilmektedir.

Sabit faz, silindirik bir kolona sıkı bir şekilde doldurulmakta ve başlangıç hareketli fazı ile şartlandırılmaktadır. Lipit türlerini içeren numune kolon girişine katı faz yüzeyine ilave edilmekte, hareketli fazın sürekli olarak kolona gönderilmesi ile; analitin her iki faz arasındaki dağılımı neticesinde farklı oranlarda ayrımları gerçekleştirilmektedir. Bu teknik için yaygın olarak kullanılan sabit faz sistemleri; silika, alümina ve iyon değiştirici reçineler olarak ifade edilmekte, türlerin ayrımı için uygun pek çok hareketli faz/çözücü sistemi bulunmaktadır (Sikorski, 2003; Christie ve ark., 2010).

#### 1.4.2.2.3. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)

Yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) tekniği; sıvı haldeki hareketli faz/çözücü sistemlerinin kolonda yer alan sabit faz üzerinden yüksek akış hızlarında geçirilebilmesine imkân sağlayan, özel analiz sistemlerinde uygulanan modern bir teknik olup, hem analitik hem de preparatif amaçla yaygın olarak kullanılmaktadır (Gezici, 2010).

Lipit türlerinin tayini için; HPLC tekniği kullanılarak uygulanan pek çok yöntem olmakla birlikte, yaygın kullanılan bazı yöntemler kısaca açıklanmaya çalışılmıştır.

- **Adsorpsiyon kromatografisi.** Adsorpsiyon kromatografisi, sıvı-katı yada gaz-katı kromatografi tekniği olarak tanımlanmaktadır. Sabit faz olarak; alümina, silikajel, kalsiyum karbonat, magnezyum sülfat, magnezyum karbonat, potasyum karbonat, sodyum karbonat, nişasta, selüloz yada aktif karbondan oluşan yapılar kullanılmaktadır. Hareketli faz sistemi olarak ise; izokrotik yada gradient programlamanın uygulandığı farklı polarite değerlerine sahip çözücü sistemleri kullanılmaktadır. Adsorpsiyon tekniği; ince tabaka ve kolon kromatografi uygulamalarında yaygın olarak

kullanılmakla birlikte, HPLC uygulamalarında da sayısız uygulaması mevcuttur. Lipit türlerinin tayinde, hedef türdeki polar (ester bağları, fosfat, hidroksil ve amin... gibi) yada fonksiyonel grupların varlığı/ sayısı/ farklılığı, ayırmalarda etkili rol oynamaktadır. Polar maddelerin ayrılmasında polar sabit fazlar, apolar maddelerin ayrılmasında ise apolar sabit fazlar kullanılmaktadır. Ayrıca sabit fazların polaritelerinin asidik ve bazik yapıda olması, asidik ve bazik maddelerin ayırımında önemlidir. Sabit fazın tanecik çapı, tanecik yüzey alanı ve tanecik özellikleri ayırım gücüne etki eden önemli faktörlerdir (Christie ve ark., 2010).

- **Dağılma kromatografisi.** Sıvı-sıvı yada gaz-sıvı kromatografi tekniği olarak da bilinen dağılma kromatografisi, birbiri ile karışmayan iki faz arasında maddelerin dağılması temeline dayanmaktadır. Sıvı-sıvı dağılma kromatografisi uygulamaları, sabit ve hareketli fazların polarite değerlerine bağlı olarak "*normal-faz dağılma*" ve "*ters-faz dağılma kromatografi"* tekniği olarak iki temel grupta değerlendirilmektedir. Normal-faz sıvı dağılma kromatografide; sabit faz polaritesi, hareketli faz polaritesinden daha yüksektir. Sabit faz olarak polar yapılı türler, hareketli faz bileşiminde ise genel olarak hegzan, metilen klorür, kloroform, dietil eter ve çeşitli çözücü karışımları kullanılmaktadır. En çok uygulaması bulunan sabit fazlar, silika ve alümina yapılardır. Ters-faz sıvı kromatografi; sabit faz polaritesinin hareketli faz polaritesinden daha düşük olduğu uygulamalardır. Sabit faz olarak kimyasal bağlı fonksiyonel grup taşıyan sabit fazlardan ODS en fazla tercih edilen yapı iken, kısa alkil zincirli (C8, C2 gibi), fenil ve siyano (CN) bağlanmış sabit fazlar da sıklıkla kullanılmaktadır. Ters-faz sıvı kromatografisinde genel olarak apolar türlerin ayrımı ve tayini sağlanmaktadır. Kısa alkil zincirleri içeren sabit fazlar (C2, C8) daha polar bileşenlerin tayini için kullanılırken, uzun alkil zincirli sabit fazlar (C18) daha apolar türlerin tayininde kullanılmaktadır. Buna bağlı olarak apolar maddeler kısa alkil zinciri içeren sabit fazlardan daha çabuk uzaklaştırılırken, polar maddelerde uzun alkil zincirli sabit fazlardan daha kolay ayrılmaktadır. Ters-faz dağılma tekniğinde kullanılan hareketli faz sistemlerinin türünün, gerçekleştirilen ayırmaların verimliliğini önemli derecede etkilediği bilinmektedir. Çünkü kullanılan çözücü molekülleri bağlı yapılara difüzlenerek, konformasyonu ve yapıyı etkilemektedir (Christie ve ark., 2010).

- **İyon değiştirme kromatografisi.** İyonik yada iyonize olabilen türlerin tayini için geliştirilen/uygulanan bir teknikdir. Teknik ile; iyonik yapılar yada belirli pH

değerlerinde iyon veya iyonik yapı verebilen moleküllerin (organik asit veya organik bazlar) tayinleri gerçekleştirilmektedir. Sulu tuz çözeltileri ve alkol türü bileşenler içeren polar hareketli faz çözeltileri ile asidik veya bazik gruplar bağlanmış yapılar sabit faz olarak kullanılmaktadır. İyon kromatografi tekniğinde gerçekleştirilen ayırımlarda, analiz edilecek maddenin iyonik yapısı yani pKa değeri oldukça önemli bir faktördür (Christie ve ark., 2010).

- **Jel-geçirgenlik veya boyut eleme kromatografisi.** Boyut eleme kromatografi tekniğinde gerçekleştirilen ayırmalar, çözünen moleküllerin boyut ve şekilleri esas alınarak gerçekleştirilmektedir. Diğer yöntemlerin tersine analitle sabit faz arasında kimyasal bir etkileşim yoktur ve tamamen fiziksel bir eleme işlemi gerçekleşmektedir. Analitlerin alıkonma süreleri sadece molekül büyüklüğü ve gözenek yapısı ile ilgilidir. Bu teknikte; seçilen hareketli fazın bileşimi ile numune etkileşimi ve çözücü viskozitesinin çalışma sıcaklığında düşük olacak şekilde seçimi ayırmalara önemli derecede etki etmektedir. Dolgu materyali olarak; çözücü ve çözünenin içerisine difüzlenebileceği modispers, farklı boyuttaki gözeneklere sahip silika veya polimerik partiküller kullanılmaktadır. Gözeneklerdeki alıkonma süresi, analiz edilen molekülün büyüklüğüne bağlıdır. Gözeneklere göre daha küçük çapta olan moleküller gözenekler içerisine doğru difüzlendikleri için, kolon içinde daha düşük bir ortalama hıza sahiptirler. Ortalama gözenek büyüklüğünden daha büyük olan moleküller ise gözenek içerisine girmemektedirler. Dolayısıyla bu moleküllerin kolondaki alıkonma süresi daha az olmakta ve daha önce detektörde tespit edilmektedir (Ünsal, 2006).

- **Gümüş iyon kromatografisi ($Ag^+$-TLC, $Ag^+$-HPLC, … ).** Lipit türlerinin tayini için özel olarak geliştirilen ve kompleks oluşum mekanizması esas alınarak ayrımların gerçekleştirildiği kromatografi tekniğidir. Kompleksler; çift bağ içeren doymamış türlerin elektron verici olarak, gümüş iyonların ise elektron alıcı olarak davrandığı yük transferi ile meydana gelmektedir. Sabit faza bağlı olan gümüş iyonları, çözünen türlerin çift bağlarının pi elektronları ile tersinir olarak reaksiyon vermektedir. Basit lipit molekülleri için oldukça kullanışlı bir teknik olmakla birlikte, ters faz kromatografi ile lipit ayrımlarının tamamlayıcısı olarak kullanılmaktadır. Gümüş iyon kromatografi tekniği ile lipit bileşenlerinin ayrımında; doymamışlık derecesi, çift bağ sayısı ve pozisyonu esas alınarak etkin ayırmalar sağlamaktadır. Yağ numunelerinde yağ asit metil ester, triaçilgliserol, kolestrol ester tayini gibi uygulamalar sıklıkla

gerçekleştirilmektedir. Teknik; kolon kromatografi, TLC ve HPLC ayırmalarına kolaylıkla uygulanabilmektedir (Christie ve ark., 2010).

### 1.4.2.3. Akış enjeksiyon analiz (FIA) tekniği

Akış enjeksiyon analiz (FIA) tekniği, 1970'li yılların ortalarında Danimarka'lı bilim adamları Ruzicka ve Hansen ile Amerika'lı Stewart tarafından geliştirilen modern bir analitik tekniktir. Kan ve idrardaki türlerin tayinleri için klinik laboratuarlarda yaygın bir şekilde kullanılan kesikli akış işlemlerinden faydalanılarak geliştirilen bu teknik; hassasiyet, seçicilik, ekonomi ve uygulanabilirlik bakımından önemli üstünlüklere sahiptir (Kuşcu, 2008).

FIA tekniği, numune ve reaktifin uygun bir akış sistemi içerisinde ve termodinamik şartlar altında karışmasıyla yürütülmektedir. Sıvı formdaki numune, uygun akış ortamına sürekli akış şeklinde enjekte edilmektedir. Enjeksiyonla birlikte akış ortamında sıvı bir alan oluşmakta ve sürekli olarak detektöre ulaşan bu alanın; absorbans değeri, potansiyeli yada fiziksel parametrelerinin ölçümü yapılmaktadır. FIA sistemleri ile çevresel ve biyolojik numunelerde çok sayıda araştırma gerçekleştirilmiştir.

Gerçekleştirilen çalışmalarda; FIA sistemlerinin atomik absorpsiyon, indüktif-eşleşmiş plazma, sıvı ve gaz kromatogrofisi gibi sistemler ile birleştirilmesi üzerine farklı metotlar geliştirilmiştir. FIA yöntemlerinin yüksek hassasiyet, basitlik, taşınabilirlik, düşük maliyetli ve yüksek numune hacmi gibi avantajlara sahip olmasına rağmen, katı ve sıvı yağ analizleri için az sayıda uygulaması bulunmaktadır. Bu durumun iki temel nedenden kaynaklandığı kabul edilmektedir; (*i*) susuz ortam analizleri için kullanılan analiz sistemlerinin uygun olmaması ve (*ii*) hızlı reaksiyon oluşumunun gerçekleştiği tayinler için elverişli yöntemler olmasıdır (Kuşcu, 2008). Şimdiye kadar yağ numuneleri üzerinde yapılan çalışmalarda; serbest yağ asidi, birincil ve ikincil oksidasyon ürünleri, antioksidan madde miktarı tayini… gibi temel bazı analizlerin başarılı bir şekilde uygulanabildiği görülmektedir (Thomaidis, 1999).

### 1.4.2.4. Diğer analiz teknikleri

Lipit türlerinin tayini için; spektroskopik, kromatografik ve elektrokimyasal teknikler bulunmaktadır. Spektropik analiz tekniklerinin, katı ve sıvı yağların analizleri

için geliştirilen mevcut çok sayıda uygulaması bulunmaktadır. UV-Vis spektroskopi, infrared spektroskopi, kütle spektrometri, elektron spin rezonans spektroskopi ve nükleer manyetik spektroskopi, yağlarda mevcut farklı lipit bileşenlerinin tayinleri için uygulaması bulunan spektroskopik tekniklerdir. Bu tekniklerin son yıllarda yoğun bir şekilde tercih edilme nedeni; diğer modern tekniklere kıyasla kimyasal kullanımı gerektirmeyen, yüksek kesinlikte sonuçların elde edilebildiği, hızlı, seçiciliği yüksek, zahmetsiz ve pahalı olmayan yöntem olmaları şeklinde ifade edilmektedir. Katı ve sıvı yağlarda; doymamışlık derecesi, trans yağ asidi içeriği, sabunlaşma sayısı, serbest yağ asidi içeriği, peroksit sayısı, anisidin sayısı ve yağ asit kompozisyonu tayini gibi metotlarının optimizasyonu ve validasyonu üzerine çalışmalar bulunmaktadır (Taş, 2008; Christie ve ark., 2010).

Diğer bir teknik olan elektrokimyasal teknikler; pek çok kimya ve biyokimya araştırma laboratuarlarında uygulama alanı bulan ve modern analiz sistemleri ile uygulanabilen tekniklerin başında gelmektedir. Elektrokimya; gıdaların kalite-kontrol analizleri için güçlü ve çok yönlü analiz yapma imkânı sunan bir teknik olmakla birlikte, çok düşük konsantrasyonlardaki pek çok organik ve inorganik tür eş zamanlı olarak tayin edilebilmektedir. Gıda uygulamalarında yaygın tercih edilen elektrokimyasal tekniğin pologrefi ve voltametri tekniği olduğu belirtilmektedir (Shalliker, 2012). Gaz kromatografi tekniği, lipit analizleri için yaygın olarak kullanılan modern analitik tekniklerden bir diğeridir. Teknik, lipit analizlerinde genellikle metil ester formlarına dönüştürülen türlerin ayrımı ve miktarının tayinine ilişkin yapılan çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Yöntem dağılma kromatografi prensibine dayanmakta ve sabit faz olarak genellikle 10-100 m uzunluğunda kapiler kolonlar kullanılmaktadır. Gaz fazı olarak inert azot, helyum veya hidrojen gazı kullanılmaktadır. Ayrımlar sabit bir sıcaklıkta yada gradient şekilde oluşturulan bir sıcaklık programına göre gerçekleştirilmektedir. Lipit bileşikleri farklı dedektör sistemlerinde incelenebilmekte yada GC sistemi kütle spektrometresine bağlanarak dedeksiyon ayrıntılı şekilde yapılabilmektedir (Taş, 2008; Christie ve ark., 2010).

## 1.5. Birleştirilmiş Analitik Yöntemler: Teorik Temelleri, Enstrümantasyonu ve Uygulamaları

### 1.5.1. Çok boyutlu ayırma yöntemleri

Çok boyutlu ayırma yöntemleri; kompleks bir karışım içerisindeki bileşenlerin tayini için uygulanan farklı ayırma mekanizmalarının/tekniklerinin (ekstraksiyon, kromatografi, spektroskopi,…gibi) birleştirilmesiyle oluşturulan hibrit yöntemleri ifade etmektedir. Çok boyutlu ayırma yöntemleri ile, kompleks yapılı bileşenlerden oluşan numuneler için farklı ayırma mekanizmaları uygulanarak kısa sürede, yüksek oranda iyileştirilmiş ayrımların elde edilebildiği analizler gerçekleştirilebilmektedir (UKEssays, 2015).

Çok boyutlu ayrım analizleri; en az iki farklı tekniğinin tek bir sistem üzerinde eş zamanlı uygulandığı modern analiz sistemleri ile gerçekleştirilmektedir. Çok boyutlu (MD) sıvı kromatografi-kütle spektroskopisi (LC-MS), kapiler elektroforez-kütle spektroskopisi (CE-MS), sıvı kromatografi-nükleer manyetik rezonans spektroskopisi (LC-NMR) gibi tekniklerin birleştirilmesi sonucu oluşturulan modern analiz sistemleri, özgün analitik yöntemlerin geliştirilmesi bakımından önem arz etmektedir. Örneğin, yaygın uygulaması bulunan HPLC-MS birleştirilmiş sisteminde kromatografi tekniği ile bileşenlerin farklı fizikokimyasal özellikleri esas alınarak güçlü bir ayırma gerçekleştirilirken, kütle spektroskopisi ile kompleks yapılı bileşenlerin belirlenmesi ve tayini için üstün bir dedeksiyon sağlanmaktadır. Çok boyutlu ayrım yöntemlerinin uygulandığı HPLC-MS sistemleri; *kolon geçişli HPLC-MS*, *birleştirilmiş HPLC-MS* yada *off-line çok boyutlu HPLC-MS* gibi farklı dizaynlara sahiptir.

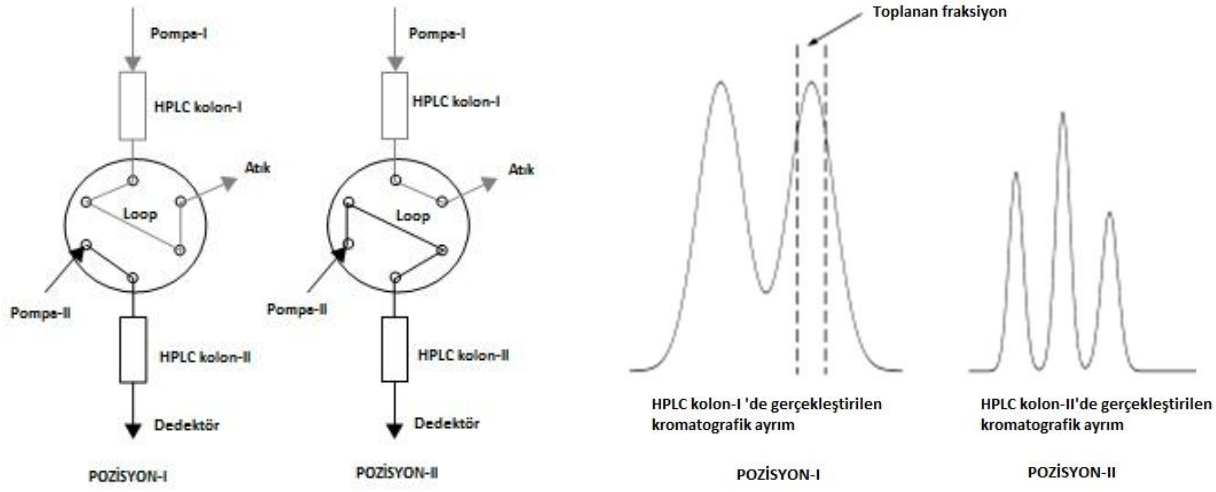
*Kolon geçişli MD-HPLC tekniği*; en az iki farklı kolon sistemi ve yönlendirme valfi kullanılarak oluşturulan tek bir sistem üzerinde; ters-faz, iyon değiştirme, boyut eleme gibi farklı sıvı kromatografi şartlarında eş zamanlı tayin yapabilme imkânı sunmaktadır. *Birleştirilmiş MD-HPLC tekniğinde;* farklı türdeki kolon sistemleri ardışık bağlanarak yada farklı tür sabit faz yapıları aynı kolon içerisine yüklenerek ayrımlar gerçekleştirilmektedir. *Off-line MD-HPLC tekniğinde* ise, bileşenler seçici türler şeklinde manuel olarak fraksiyonlanmakta, daha sonra bu fraksiyonlar uygun analiz sistemleri kullanılarak analiz edilmektedir (Shalliker, 2012; UKEssays, 2015). Birleştirilmiş analiz sistemlerinde geliştirilen çok boyutlu ayırma yöntemleri ile ilgili

olarak; HPLC sistemi üzerindeki uygulamalarından ve teorik bilgilerinden tez konusu kapsamında yer alması bakımından detaylı şekilde bilgi verilmeye çalışılmıştır.

HPLC uygulamalarının neredeyse tümünde, tek bir boyutta/kolonda uygulanan kromatografik ayrımlara dayalı tayinler gerçekleştirilmektedir. Numunenin kompleks yapıda olması durumunda yada seçilen kolonun bileşenlerin tümünü tek seferde ayırma kabiliyetinin düşük olması halinde; ya off-line numune hazırlama tekniğinin (ön zenginleştirme, sıvı-sıvı ya da katı faz ekstraksiyon, …gibi) optimizasyonu yada ayrı bir off-line kromatografik ayırmanın uygulamaya konulması söz konusudur. Off-line numune hazırlama işlemlerinde numune toplanmakta, daha sonra filtrasyon, türevlendirme, kurutma, …gibi teknik bazı işlemlere tabi tutulmaktadır. Bu işlemlerin tamamlanması oldukça zaman almakta ve kromatografik analizlerden daha zahmetli olmaktadır. Manuel yada yarı otomatik numune hazırlama prodesürlerine alternatif olarak; seçilen fraksiyon/fraksiyonların ikinci ayırma kolonuna direk gönderilebileceği on-line yöntemler geliştirilmeye başlanmıştır. Son yıllarda gerçekleştirilen bu uygulamalarda; tek bir analiz sistemi üzerinde kolon değiştirme/geçiş esaslı analizlere imkân veren on-line uygulamalar oldukça başarılı ve etkili çözümler sunmaktadır. Bununla birlikte, birden fazla sistem elemanının ve yönlendirme valfinin tek sistem üzerinde kullanımına imkân veren sistemlerin oluşturulmasına/geliştirilmesine yönelik çalışmalar, modern HPLC üreticileri tarafından da yoğun bir şekilde yürütülmektedir (Shalliker, 2012).

HPLC analiz sistemi üzerinde geliştirilen çok boyutlu kromatografi uygulamaları genellikle; kapsamlı (comprehensive), pik seçimli (heart-cutting), on-line tuzaklama/geri yıkama ve ardışık kolon rejenerasyonu şeklindedir. Bu uygulamaların tümü; çok boyutlu kromatografi yani "*birinci kolondan elde edilen hedef analitin, yönlendirme valfleri aracılığıyla ikinci bir kolona seçimli transferi*" şeklinde tanımlanmaktadır. Tekniğin, tek-boyutlu kromatografik ayrımlara kıyasla; yüksek çözünürlük, seçicilik ve pik kapasitesi gibi pekçok üstün özelliği bulunmaktadır (Stoll ve ark., 2007). MD-HPLC sistemlerinde loop sistemleri ve yönlendirme valfleri kullanılarak; birinci boyut ayrımın gerçekleştirildiği kolondan belirli hacimde alınan fraksiyonlar ardışık olarak uygun kolon/kolonlara gönderilmekte ve fraksiyon içerisindeki bileşenlerin ikinci boyut ayrımları gerçekleştirilmektedir. Teknik; birinci kolonda ayrımı gerçekleştirilen bileşenlerden ilgilenilen hedef türe ait fraksiyonun, uygun bir kolona yönlendirilerek tayin edildiği "*pik seçimli (heart-cutting) MD-HPLC*" yada türlerin her birinin sırayla uygun kolonlara yönlendirilerek ayrımının/tayininin

sağlandığı "*kapsamlı (comprehensive) MD-HPLC*" şeklinde uygulanmaktadır (Şekil 1.12) (Stroll, 2007; Cohen ve ark., 2008).




**Şekil 1. 12.** Modern analiz sistemlerinde, pik seçimli (heart-cutting) MD-HPLC tekniğinin uygulandığı sisteme ait şematik gösterim

Pik seçimli MD-HPLC tekniği; sıvı kromatografi cihazlarında, fraksiyon toplayıcı sistemlerle birlikte kolaylıkla uygulanabilmektedir. Toplanan hedef bileşenin diğer boyut ayrımı için uygun kolon seçilmekte ve seçilen hareketli faz sistemleri yardımıyla analizler gerçekleştirilmektedir. Bu yöntemin ilk uygulamaları, 1943'de Manning ve Strain tarafından adsorpsiyon kolonlarında bitki kolorofil ekstraklarının izolasyonu için gerçekleştirdikleri çalışma ile gerçekleştirilmiştir. Modern analiz sistemlerinin geliştirilmesiyle birlikte, 1973 yılında Huber ve arkadaşları tarafından altı-port/iki-pozisyon (6PT/2PS) valf sistemi kullanılarak ilk modern pik seçimli MD-HPLC uygulaması gerçekleştirilmiştir. Kapsamlı MD-HPLC tekniği ile gerçekleştirilen analizlerde ise, birinci boyut kolondan elde edilen fraksiyonların tümü sırayla ikinci boyut ayırma kolonlarına yönlendirilerek tayinler gerçekleştirilmektedir. Otomatikleştirilmiş sistemlerde uygulanan analizler için; uygun sekiz-port yada on-port valf sistemleri ve loop sistemleri kullanılmaktadır (Cohen ve ark., 2008).

### 1.5.2. Birleştirilmiş analiz sistemleri

Birleştirilmiş analiz sistemleri; fraksiyon toplama, toplanan fraksiyonların tekrar enjeksiyonu, kolon rejenerasyonu, türlerin ön-deriştirilmesi, kolon değiştirme, hareketli faz değişimi gibi zahmetli prosedürlerin bertaraf edilmesini sağlarken, analizlerin amacına uygun olarak geliştirilen özel bir sistem dizaynı ve enstrümantasyonu gerektirmektedir. Sistemin dizaynı için genel olarak;

- modern kromatografi cihazlarına entegre edilebilen yönlendirme valfleri,
- fraksiyonların toplandığı belirli hacimlerdeki loop sistemleri,
- farklı ayırma mekanizmalarının gerçekleştirilebildiği kolonlar,
- dedektör sistemleri,
- bağlantı elemanları ve
- farklı boyutlardaki ayırmalar için uygun hareketli fazları sisteme gönderebilen pompa sistemleri kullanılmaktadır.

#### 1.5.2.1. Valf sistemleri

Çok yollu yönlendirme valf sistemleri; hareketli faz akışına yön vererek, farklı boyutlarda gerçekleştirilen ayrımların birbirinden bağımsız olarak yürütülebilmesini sağlayan ve on-line olarak kontrol edilebilen sistemlerdir. Valf sitemleri; ayrımlardan elde edilen fraksiyonların toplanması, fraksiyonların diğer boyut ayrım için enjeksiyonu, tek sistem üzerinde birden fazla kolonun eş zamanlı kullanımı ve analiz esnasında akışa istenilen yönün verilmesini sağlaması bakımından, birleştirilmiş sistem analizleri için önem arz eden sistem elemanlarıdır (Cohen ve ark., 2008).

Ticari olarak üretilen valf sistemleri; sahip oldukları port (PT) ve pozisyon (PS) sayısına göre farklı özellikler göstermekte ve farklı amaçlar için kullanılmaktadır (Şekil 1.13). Örneğin, iki pozisyonlu valf sistemleri; 4PT/2PS, 6PT/2PS, 8PT/2PS, 10PT/2PS şeklinde analizlerdeki kullanım amacına uygun olarak temin edilebilmektedir. Yönlendirme valfleri; HPLC sistemlerine adapte edilmekte ve rutin analizler için kullanılan HPLC cihazları kolaylıkla birleştirilmiş analiz sistemlerine dönüştürülebilmektedir. Böylece; tek sistem üzerinde daha az maliyetli sistem elemanları ile çok boyutlu ayrımlar on-line olarak gerçekleştirilebilmektedir.




**Şekil 1. 13.** Farklı port ve pozisyon sayısına sahip yönlendirme valf sistemleri

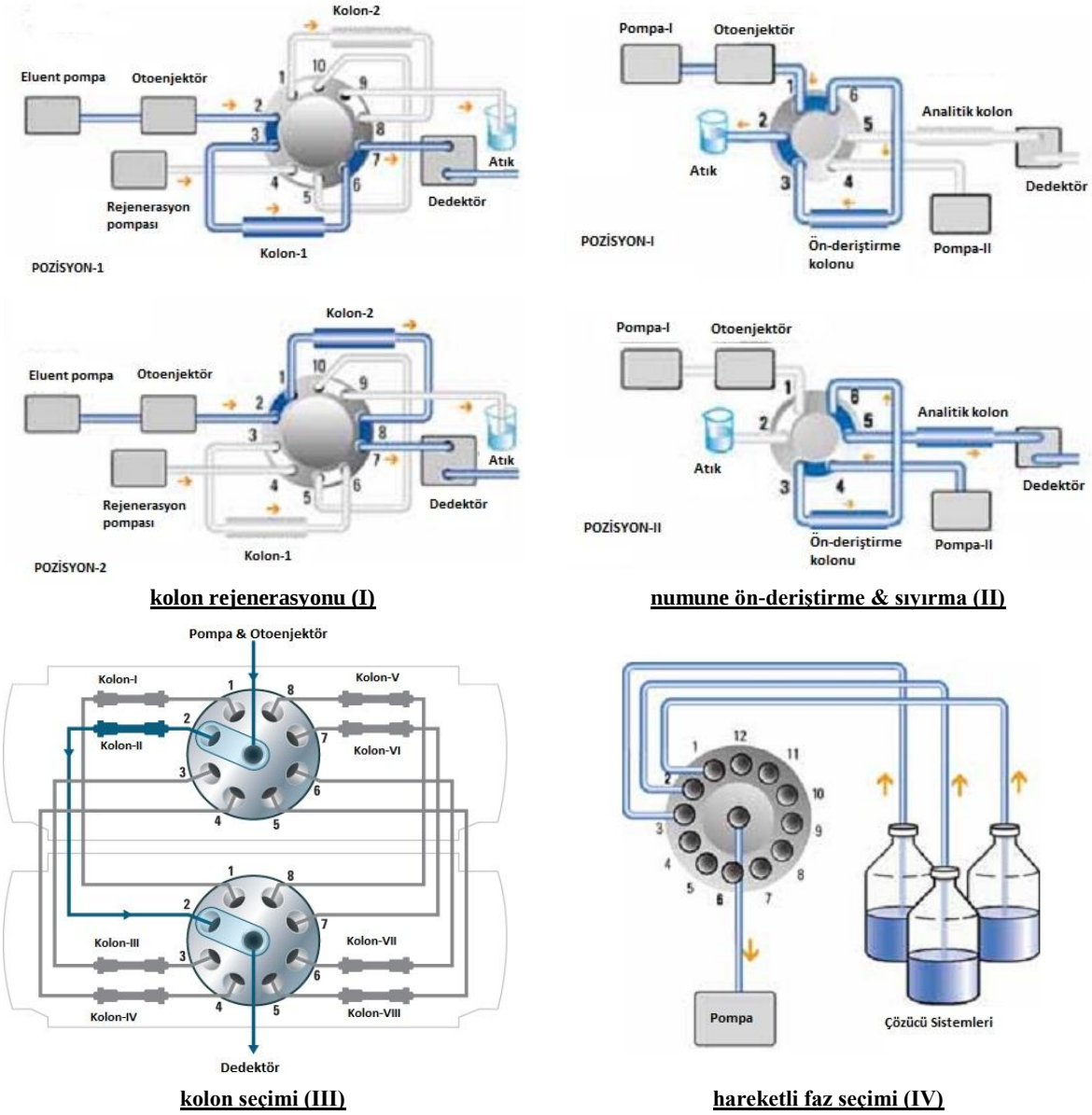
Sonuç olarak; çok yollu yönlendirme valf sistemleri,

- kolon rejenerasyonu,
- analitlerin ön-deriştirilmesi ve sıyrılarak geri alınması,
- kolonların seçimi ve
- hareketli faz sistemlerinin değiştirilmesi gibi zahmetli prosedürlerin bertaraf edilmesini ve on-line sistemler üzerinde kolaylıkla gerçekleştirilebilmesini mümkün kılmaktadır (Şekil 1.14).

### 1.5.3. Birleştirilmiş analiz sistemi uygulamaları

Birleştirilmiş analitik yöntemlerin modern analiz sistemleri/cihazları kullanılarak gerçekleştirilen ilk uygulaması; Erni ve Frei tarafından kompleks bitki ekstraklarının kalitatif ve kantitatif tayini için gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen bu yöntemde; yönlendirme valf sistemi kullanılarak iki boyutlu ayrım için analiz sistemi oluşturulmuş ve sistem üzerinde boyut eleme kromatografi kolonu ilk boyut ayrımlar için, ters-faz kolonu ise ikinci boyut ayrımlar için kullanılmıştır.

Son yirmi yılda modern HPLC sistemi üzerinde geliştirilen birleştirilmiş analiz yöntemleri; başta proteinler ve peptitler olmak üzere polimerler, antioksidanlar, lipitler, bioaktif bileşenler ve farmakolojik bileşenler gibi pek çok numune için uygulanmaktadır. Kompleks bileşenlerin kalitatif ve kantitatif tayinleri için uygulanan birleştirilmiş analitik yöntemler; özellikle gıda numunelerinde lipit türleri, proteinler, vitaminler, antioksidan maddeler ve minerallerin tayini için büyük önem arz etmektedir (UKEssays, 2015).




**Şekil 1. 14.** Valf sistemlerinin farklı işlevlerine ait şematik gösterim

# 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Bitkisel yağlar temelde; trigliserit molekülleri ve farklı kimyasal yapıdaki bileşiklerin oluşturduğu kompleks bir karışım olan minör bileşenlerden oluşmaktadır. Trigliserit molekülleri, yüksek miktarda bulunmaları nedeniyle (~95-98%) yağın *temel bileşenleri*, minör bileşenler (~2-5%) ise *ikincil bileşenleri* olarak adlandırılmaktadır (Cert ve ark., 2000). Yağların karakteristik özelliğini belirleyen trigliserit molekülleri, gliserol ve karboksilik asitlerin oluşturduğu esterlerdir. Minör bileşenler; yağ alkolleri (*steroller, uzun zincirli alifatik ve triterpenik alkoller, metilsteroller, tritepenik dialkoller*), uçucu bileşenler, pigmentler, fenolik bileşikler, vakslar, gliserik bileşikler, hidrokarbonlar, tokoller ve fosfolipit türlerinden oluşan lipit grubunu ifade etmektedir (Cert ve ark., 2000; Aluyor ve ark., 2009).

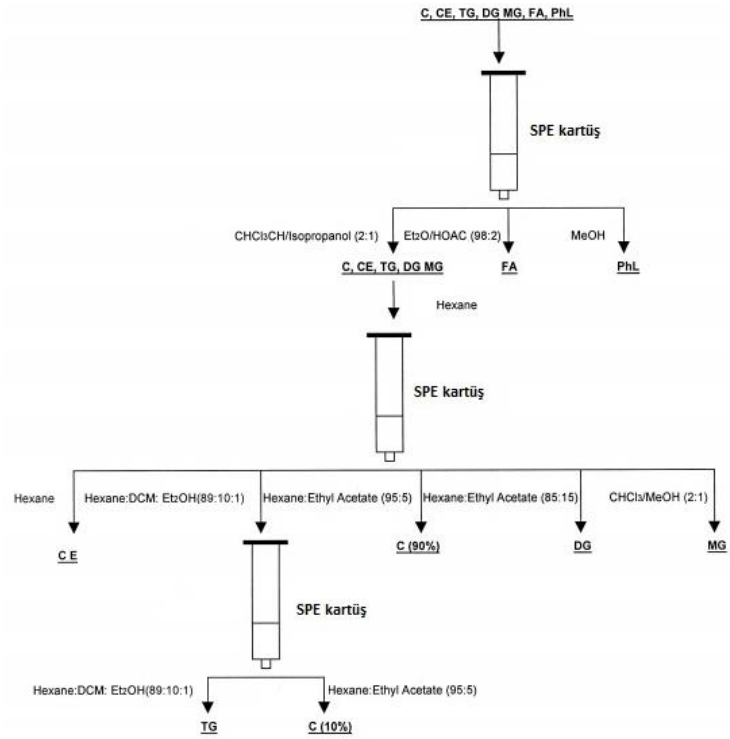
Trigliserit molekülleri apolar yapıları nedeniyle *nötral lipitler*; minör bileşenler ise farklı polarite değerine sahip lipitlerin oluşturduğu karışım olmaları nedeniyle *polar lipitler* olarak sınıflandırılmaktadır. Bu bileşenlerinin yapıları ve miktarları, yağların elde edildiği tohum veya meyvenin türüne ve yetiştirilme şartlarına göre farklılık göstermektedir. Ayrıca yağın depolanması süresince meydana gelen çeşitli reaksiyonlar, minör bileşenlerin yapılarının ve miktarlarının değişmesine neden olmaktadır. Bu nedenle; yağların kalitesinin, kaynağın, rafinasyon işlemi kalitesinin ve muhtemel tağşişin tespiti için; mevcut lipit bileşenlerinin çeşitli analitik yöntemler uygulanarak tayin edilmeleri gerekmektedir (Cert ve ark., 2000; Panagiotopoulou ve ark., 2002; Aluyor ve ark., 2009).

Nötral ve polar lipit bileşenlerin kalitatif ve kantitatif tayinleri amacıyla çok sayıda analitik yöntem/teknik kullanılmaktadır. Uygulanan bu yöntemler, genellikle numune ön işlemleri gerektiren yöntemlerdir. Minör bileşenlerin yağların yaklaşık olarak 2-5%'lik kısmını oluşturması nedeniyle; yüksek seçicilik ve hassasiyet ile tayin edilebilmeleri zorlaşmaktadır. Bu nedenle; farklı polarite değerlerine sahip kompleks karışım halinde bulunan bu bileşenlerin, trigliseritlerden izole edilerek tayin edilebilmesini sağlayan numune ön işlemi uygulaması büyük önem arz etmektedir (Cert ve ark., 2000). Minör bileşenlerin tayin edilebilmesi için öncelikle yağın temel bileşenleri olan trigliserit moleküllerinden yani nötral lipitlerden; *sabunlaştırma, kromatografi (İTK veya CC) yada katı faz ekstraksiyon (SPE) tekniği* gibi yöntemler kullanılarak izole edilmeleri ve ön deriştirme/zenginleştirme işlemine tabi tutulmaları gerekmektedir.

Juaneda ve Rocquelin (1985); katı faz ekstraksiyon tekniği kullanarak, biyolojik materyallerde nötral ve polar özellikteki lipit bileşenlerin tayinlerini gerçekleştirmiştir. Silika esaslı SPE kartüşleri kullanılarak gerçekleştirilen analizlerde; nötral lipitlerin izolasyonu için 20 mL kloroform kullanılırken, polar lipitlerin izolasyonu için 30 mL metanol çözücü olarak kullanılmıştır. Geliştirilen prosedür klasik kolon kromatografi tekniği ile karşılaştırıldığında; veriler arasında kayda değer bir farkın olmadığı ve tekniğin hız ve işlem kolaylığı bakımından üstünlüklerinin bulunduğu belirtilmiştir.

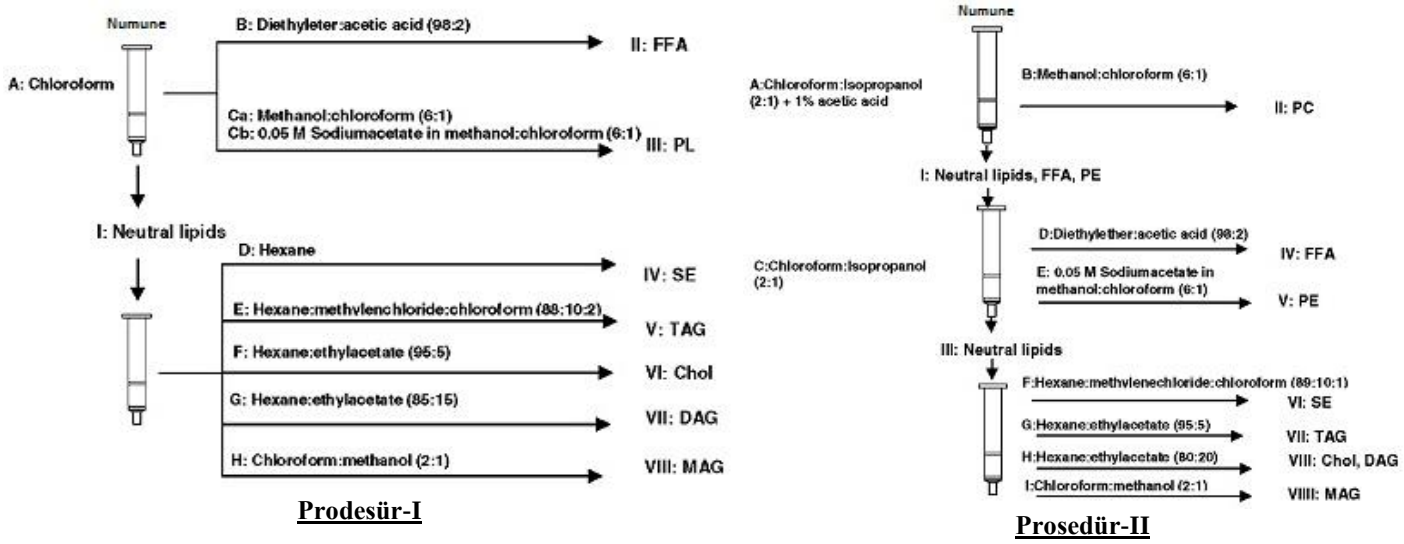
Bateman ve Jenkins (1997); mikrobiyal numunelerden nötral ve polar lipit türleri, amin yapılı SPE kartüşleri ile izole ederek tayinlerini gerçekleştirmiştir. Çalışmada lipit bileşenlerinin tümü; heptan:izopropanol (1:4) çözücü sistemi ile ekstrakte edilmiş, daha sonra elde edilen fraksiyonlar SPE tekniği ile bileşenlerine ayrılmak üzere kartüşlere yüklenmiştir. Nötral lipitlerin izole edilmesi için 4 mL kloroform:2-propanol çözücü karışımı kullanılırken, polar lipitlerin izolasyonu için metanol kullanılmıştır. Aynı numunede FFA lipit bileşenleri; 8 mL dietil eter:asetik asit (98:2, v/v) çözücü sistemi ile elue edilerek tayin edilmiştir. Elde edilen veriler, lipit bileşenlerinin ayrımı için seçilen hareketli faz ve sabit faz yapılarının uygun ve tercih edilebilir olduğunu göstermektedir.

Kaluzny ve ark. (1985) tarafından yapılan çalışmada; farklı özellikteki lipit bileşenleri SPE tekniği ile izole edilerek tayin edilmiş ve sunulan çalışma, pek çok araştırmacı için yol gösterici olmuştur (Şekil 2.1). Aminopropil bağlı faz içeren SPE katüşlerinin kullanıldığı çalışmada; TG, DG, MG, C, CE, FA ve PL lipit bileşenleri farklı çözücü sistemleri ile fraksiyonlar halinde başarılı bir şekilde izole edilerek tayin edilmiştir.




**Şekil 2. 1.** SPE tekniği ile farklı lipit türlerinin ayrımı

Dybvik ve ark. (2008); balık yumurtası yağında mevcut lipit bileşenlerinin, fosfolipit türlerinin izolasyonu ve tayini için farklı SPE prosedürleri uygulayarak detaylı bir optimizasyon çalışması gerçekleştirmiştir (Şekil 2.2). Gerçekleştirilen çalışmada, trigliseritler ve stearil esterleri için 97-99%, iki temel fosfolipit türü için ise 95-100% oranında yüksek verimle saf fraksiyonlar elde edilebilmiştir.




**Şekil 2. 2.** SPE tekniği ile lipit türlerinin ayrımına dair şematik gösterim

Farklı SPE sabit faz yapıları ile yüksek saflıkta ve konsantre/zenginleştirilmiş halde izole edilen lipit fraksiyonlarının mevcut bileşenlerine ayrımı için, ileri ve modern ayırma tekniklerine gereksinim duyulmaktadır. Bu amaçla yaygın olarak tercih edilen yöntemlerden bir tanesi, yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) tekniğinin SPE ile birleştirilerek kullanımıdır.

Siversand ve Haux (1997); HPLC-ELSD sistemi kullanarak balık karaciğeri ve yumurta yağında nötral ve polar lipit bileşenlerinin ayrımı ve kantitatif tayini için metot optimizasyonu gerçekleştirmiştir. Çalışmada, diol yapılı sabit faz içeren HPLC kolonu ile polar türlerin (fosfatidik asit, difosfatidilgliserol, fosfatidiletanolamin, fosfatidilkolin, sfingomiyelin, fosfatidilserin, fosfatidillinositol ve lisofosfatidilkolin) ve nötral lipit türlerin (TG, FFA, DG, C ve MG) tayini için iki farklı gradient çözücü programı oluşturulmuştur. Elde edilen veriler, önerilen yöntem ile hedeflenen lipit bileşenlerin ayrımının istenilen düzeyde gerçekleştirilebildiği ve yüksek tekrarlanabilirlikte sonuçların elde edilebildiği görülmüştür.

Genge ve ark. (2003); yaptıkları çalışma ile biyolojik materyallerdeki membran lipitlerinin tayini için yeni bir HPLC-ELSD yöntemi önermiştir. Çalışmada, silika yapılı HPLC kolonu ve uygun hareketli faz gradient programı kullanılarak, polar ve nötral lipit türlerinin tayini gerçekleştirilmiştir. Tayin edilen lipit türlerine ait standart maddeler ile bileşenlerin kalitatif ve kantitatif olarak tayinleri detaylı olarak irdelenmiştir.

Torres ve ark. (2005); ayçiçek yağı distilatı ve köpekbalığı karaciğer yağında nötral lipitlerin ve alkilgliserollerin tayini için yeni bir HPLC-ELSD metodu oluşturup/ valide etmiştir. Önerilen yöntem, silika esaslı HPLC kolon ve izooktan, metil terbütil eter ve 2-propanol'ün farklı oranlardaki karışımlarının gradient programı ile gerçekleştirilmiştir. 18 farklı lipit türünün tek bir kolon ile yüksek verimle ayrımına ve tayinine imkân sağlayan yöntemin, geniş bir konsantrasyon aralığında lipit tayini için kullanışlı olduğu görülmektedir.

Foglia ve Jones (1997); katı ve sıvı yağların lipaz-kataliz transesterifikasyonu ile elde edilen karışımdaki lipit türlerinin kantitatif tayini için; yeni bir HPLC-ELSD yöntemi önermiştir. Alkil ester, FFA, TG, DG ve MG türlerini içeren nötral lipit fraksiyonu analiz edilmiş, ayrımlar için hekzan:metil terbütil eter hareketli faz sistemi ve siyanopropil (CN) sabit fazı içeren HPLC kolonu kullanılmıştır. Elde edilen veriler; ELS dedektör sisteminin ve seçilen deneysel parametrelerin bileşenlerin tayini için uygun olduğunu göstermektedir.

Rodríguez-Alcalá ve Fontecha (2010); süt yağında nötral lipitlerin (CE, TG, C, DG, FFA, MG) ve polar lipitlerin (glukosilseramid, laktosilseramid, fosfatidil etanolamin, fosfatidilinositol, fosfatidilserin, fosfatidilkaolin, sfingomielin ve lisofosfatidilkolin) herhangi bir ön işlem gerektirmeden, HPLC kolonu ile direk tayin edilmesine imkân sağlayan yeni bir HPLC-ELDS yöntemi önermiştir. Geniş bir aralıkta konsantrasyon çalışması yapılan deneylerde; silika esaslı HPLC kolon ve farklı çözücü karışımları ile gradient bir program önerilmiş ve metot valide edilmiştir.

McLaren ve ark. (2011); UF-HPLC sisteminde nötral çözücü sistemleri, silika kolon ve ELS detektör kullanarak yeni bir yöntem önermiştir. Önerilen metot ile; plazma ve doku örneklerindeki 7 farklı lipit türünün, 11 dakika gibi kısa bir sürede tayin edilebildiği gözlemlenmiştir. Valide edilen yöntemin üstünlüğü; fare plazması, karaciğer ve kalp dokusundaki lipit türlerinin ayrımı ve kantitatif tayini ile kanıtlanmıştır.

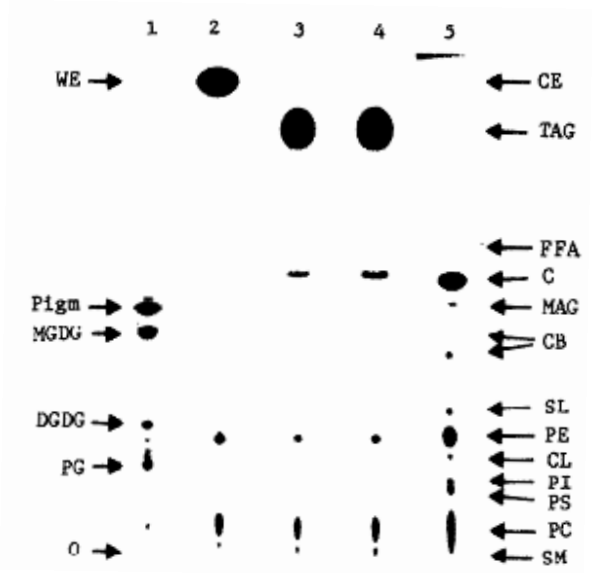
Olsson ve ark. (2012); nötral ve polar lipit türlerinin tek aşamada ayrımı ve tayini için, siyano (CN) kolon ve normal-faz çözücü sisteminin kullanıldığı yeni bir metot önermiştir. Uygulanan yöntemde; hekzan, heptan ve izooktan çözücülerinin lipit türlerin alıkonma sürelerine olan etkileri irdelenerek, metot optimizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Persson ve ark. (2007); silika ve $C_{18}$ esaslı materyal içeren SPE kartüşleri ile biyolojik materyallerdeki lipit türlerinin izolasyonunu, daha sonra elde edilen fraksiyonlarda mevcut türlerin HPLC tekniği ile tayinini gerçekleştirmiştir. SPE yöntemi ile; fosfolipitler, asit türü bileşenler ve nötral lipitlerin ayrımı için metot optimizasyonu gerçekleştirilmiş ve metotlar valide edilmiştir. Ardından, elde edilen fraksiyonlar üç farklı HPLC-ELSD tekniği ile analiz edilerek, kendi içerisindeki türlerin tayini gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen off-line SPE-HPLC yönteminin, biyolojik materyallerdeki lipit türlerinin tayininde geri kazanımı yüksek sonuçların eldesine imkân sunduğu tespit edilmiştir.

Farklı polarite değerleri nedeniyle ayrımları oldukça güç olan polar ve nötral lipitlerin tayini için, literatürde çok sayıda yöntem önerilmiştir. Önerilen metotlar, kompleks karışım halindeki lipit türlerinin tayini için çeşitli numune ön işlemlerine ihtiyaç duyulan yöntemlerdir. Ekstraksiyon, sabunlaştırma, türevlendirme gibi ön-işlemlerin uygulandığı numuneler, sonraki aşamalarda ileri ayırma işlemleri için modern sistemlerde analiz edilmektedir. Numune ön işlemleri ve modern sistemlerin birleştirilerek yani sırayla uygulandığı bu yöntemler; *off-line birleştirilmiş yöntemler*

olarak tanımlanmaktadır. Off-line yöntemler; oldukça zahmetli, zaman alıcı ve fazla kimyasal tüketimine neden olan yöntemlerdir. Lipitlerin tayini için on-line birleştirilmiş analiz sistemlerin uygulama mantığına yaklaşım sunması ve temel oluşturması bakımından, İTK tekniğinde uygulanan çok boyutlu ayırma uygulamalarına yer verilmiştir.

Olsen ve Henderson (1989); marina lipitlerinin tayini için tek İTK plakası üzerinde, ardışık olarak uygulanan çözücü sistemleri ile iki boyutlu ayrım metodu geliştirmiştir. Silika jel 60 sabit fazı ve uygulanan farklı çözücü sistemleri ile, 14 farklı polar ve nötral özellikteki lipit türünün tayini gerçekleştirilmiştir (Şekil 2.3). Geliştirilen bu yöntem ile; lipit türlerinin tek boyutlu kromatografik ayrımında oldukça başarılı sonuçlar elde edilebilmiştir.

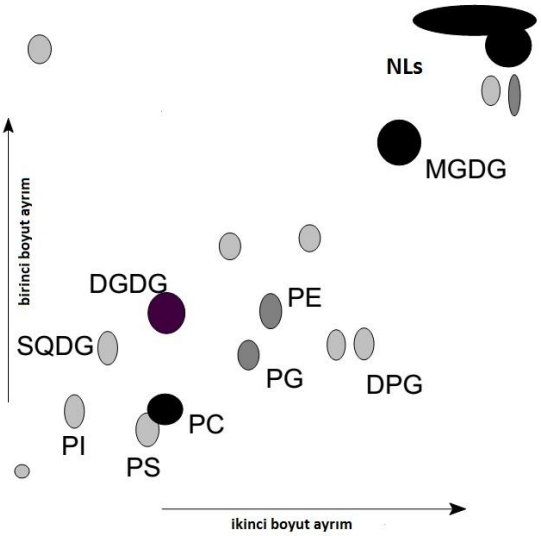



**Şekil 2.3.** İTK tekniği ile lipit türlerinin tek boyutlu kromatografik ayrımının optimizasyonu

Pucsok ve ark. (1988); serum lipitlerinin tek boyutlu kromatografik ayrımı için gerçekleştirdikleri çalışmada altı farklı çözücü sistemini ardışık uygulayarak metot optimizasyonu gerçekleştirmiştir. Kompleks halde bulunan farklı polarite özelliğindeki CE, TG, FFA, C, MG, DG, PC, SP, PE ve LL gibi bileşiklerin ayrımı ve tayini gerçekleştirilmiştir.

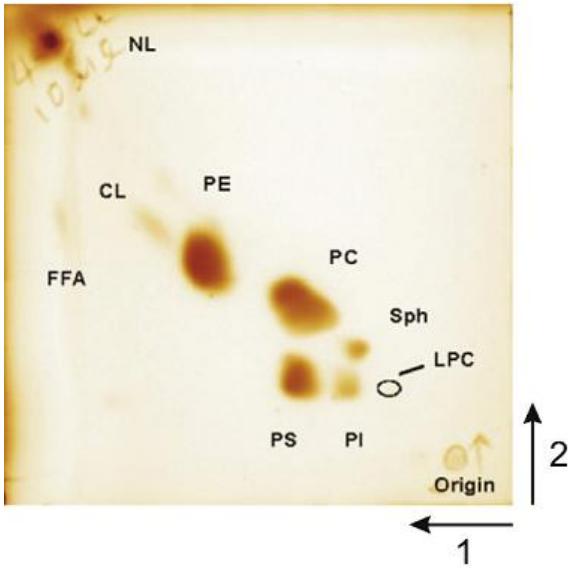
Yu ve Ariga (2000); çok boyutlu İTK kromatografi tekniği ile, bitki ekstraktında mevcut lipit türlerinin tayinini gerçekleştirmiştir. Geliştirilen yöntemde alumina esaslı sabit faz yapısı ve farklı çözücü sistemleri ile başarılı sonuçlar elde edilebilmiştir. Birinci boyut ayrım için kloroform-metanol-su (75:25:2.5; v/v/v) çözücü karışımı, ikinci

boyut ayrım için ise kloroform-metanol-asetik asit-su (80:9:12:2; v/v/v) karışımı kullanılmıştır (Şekil 2.4).




**Şekil 2. 4.** İTK tekniği ile lipit türlerinin iki boyutlu kromatografik ayrımının optimizasyonu

Bayır ve ark. (2007); beyin mitekondrisindeki okside olmuş fosfolipitleri ve diğer türleri, yüksek performanslı İTK (HPTLC) tekniği ile tayin etmiştir. Önerilen yöntemde iki boyutlu 2D-HPTLC tekniği ile kompleks halde bulunan türlerin tayini gerçekleştirilmiştir. Silika esaslı plakanın kullanıldığı deneylede, birinci boyut ayrım için kloroform: metanol: 28% amonyak (65:25:5, v/v/v) kullanılırken, plakanın yönünün değiştirilmesiyle gerçekleştirilen ikinci boyut ayrımda kloroform:aseton:metanol:asetik asit:su (50:20:10:10:5, v/v/v/v/v) çözücü sistemi kullanılmıştır (Şekil 2.5) (Bayır ve ark. 2007).



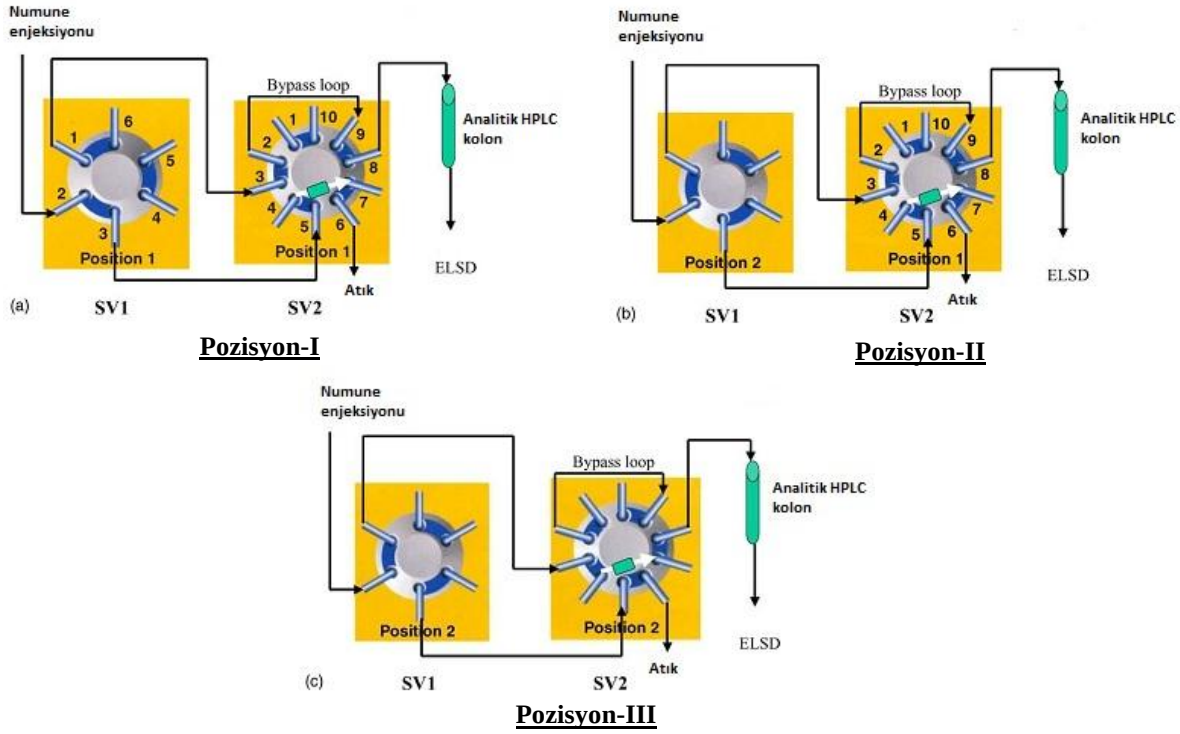

**Şekil 2. 5.** İTK tekniği ile lipit türlerinin iki boyutlu kromatografik ayrımının optimizasyonu

Eichenberger ve ark. (1993) tarafından gerçekleştirilen diğer bir çalışmada ise, iki boyutlu 2D-TLC tekniği kullanılarak alglerde mevcut 100'den fazla farklı lipit türü belirlenmiştir. Silika sabit fazı üzerinde gerçekleştirilen ayrımlarda, birinci boyut ayrım için kloroform:metanol:su (65:25:4, v/v/v) kullanılırken, ikinci boyut kromatografik ayrım için kloroform:metanol:izopropilamin:d-amonyak (130:70:1:10, v/v/v/v) kullanılmıştır. Geliştirilen yöntem, bitki lipitlerinin yanı sıra hayvansal dokulardaki lipitlerin tayini için de uygulanmıştır.

Lipit bileşenlerinin tayini için, farklı metotlarının birleştirilerek uygulandığı off-line yöntemler yerine; kısa sürede, hassasiyeti ve kesinliği yüksek sonuçların elde edilebildiği on-line birleştirilmiş analiz sistemlerine/yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Birleştirilmiş sistemler; hedef türe ait fraksiyonların toplanması, fraksiyonların diğer boyut ayrım için tekrar enjeksiyonu, kolon rejenerasyonu, analitlerin ön-deriştirilmesi, kolonların ve hareketli faz sistemlerinin değiştirilmesi gibi zahmetli prosedürlerin bertaraf edilmesini sağlamaktadır. Bu sistemler; analizlerin amacına uygun olarak özel bir sistem dizaynı ve enstrümantasyonu gerektirmektedir. Bu amaçla yapılan çalışmalarda yaygın kullanılan sistemler, HPLC analiz sistemleridir. Yönlendirme valflerinin ve gerekli sistem parçalarının, HPLC sistemine adapte edilmesiyle oluşturulan on-line analiz sistemleri, işleyişleri ve lipitlerin tayini için önemli olduğu düşünülen bazı uygulamaları kısaca özetlenmeye çalışılmıştır.

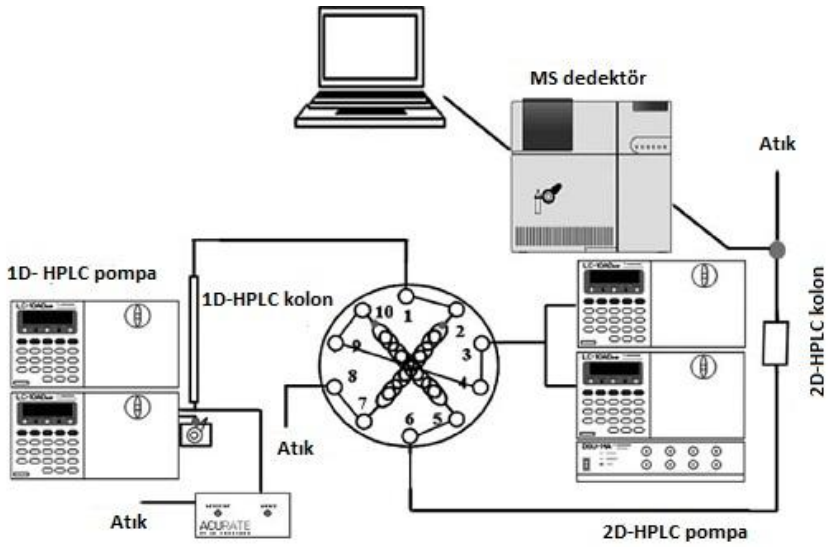
Fagan ve Wijesundera (2004); oluşturdukları on-line birleştirilmiş analiz sistemi üzerinde, süt numunesinde bulunan fosfolipit türlerinin tayini için yöntem geliştirip/ valide etmiştir. Geliştirilen yöntem ile, çok düşük miktarda bulunan fosfolipitlerin ön-

zenginleştirme (deriştirme) prosedüleri bertaraf edilerek, tek analiz sistemi üzerinde ön-deriştirme ve kromatografik tayin işlemi on-line olarak uygulanabilmiştir (Şekil 2.6). HPLC sisteminin modifiye edilmesiyle oluşturulan on-line analiz sisteminde, hareketli faz akışına ve kolon geçişlerine istenilen yönün verilebilmesi amacıyla 6PT/PS, 10PT/2PS valf sistemi, sistem geçişleri için bypass loop sistemi, ön-deriştirme işlemi için 2.3 cm PVA-Sil kolon; analitik ayırmalar için ise 15 cm PVA-Sil HPLC kolonu kullanılmıştır. Şekil 2.6'da yer alan sistem incelendiğinde; fosfolipit türlerinin ön-deriştirilmesi için pozisyon-I, analitik HPLC kolonun şartlandırılması ve direk analitik kolon analizleri için pozisyon-II, ön-deriştirme işlemi yapılıp SPE kolonda bekletilen fosfolipit türlerinin sıyrılması ve analitik kolona yönlendirilebilmesi için ise pozisyon-III kullanılmıştır. Sistem üzerinde geliştirilip/valide edilen çok boyutlu ayrım metotlarının, fosfolipit türlerinin tayininde oldukça başarılı sonuçların eldesine imkân sağladığı tespit edilmiştir.




**Şekil 2. 6.** Fosfolipit türlerinin tayini için geliştirilen on-line birleştirilmiş analiz sistemine ait şematik gösterim

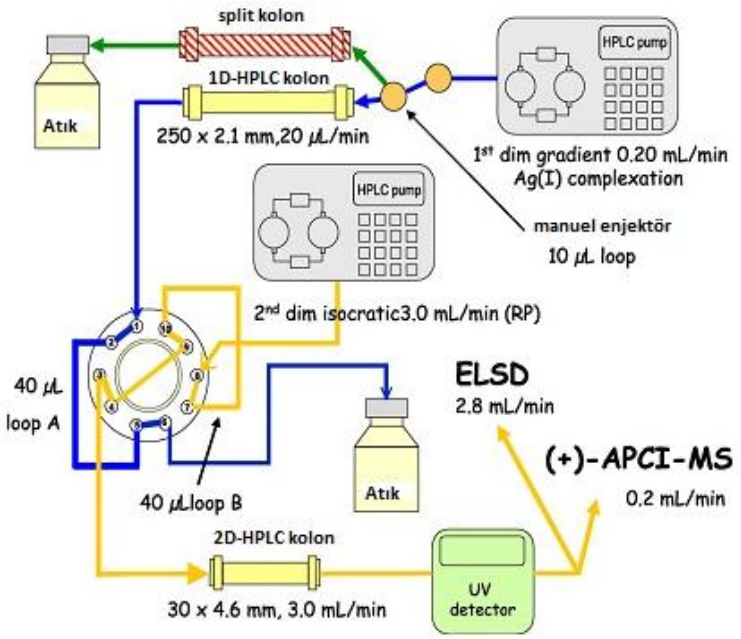
Dugo ve ark. (2006); bitkilerden izole edilen trigliserit türlerinin ayrımı ve tayini için, farklı ayırma mekanizmalarının uygulanabildiği on-line birleştirilmiş analiz sistemini oluşturmuştur (Şekil 2.7). Geliştirilen analiz sisteminde; $Ag^{+}$-HPLC (Nucleosil 100-5 SA, 150 mm×1 mm i.d.) ve RP-HPLC (Chromolith$^{TM}$ Performance RP-18, 100 mm×4.6 mm i.d.) teknikleri, sırasıyla 1D- ve 2D-kromatografik ayrımlarda kullanılmıştır. Önerilen analiz sisteminde, farklı boyut ayrımlar arasında geçişlerin sağlanabilmesi için 10PT/2PS valf sistemi kullanılmış ve valf sistemi üzerine TG fraksiyonlarının toplanabilmesi için 2 adet 20 µL'lik loop sistemi adapte edilmiştir. Loop sistemlerinin işleyişi eş zamanlı olarak programlanarak; 1D-HPLC ayrımından elde edilen TG fraksiyonları toplanmış, daha sonra toplanan fraksiyonların sırayla 2D-HPLC kolona yönlendirilmesi/enjeksiyonu sağlanmıştır. Önerilen çok boyutlu ayrım yöntemi ile; ECN ve çift bağlarının yapısına göre farklı izomerlerden oluşan kompleks yapılı TG türevlerinin ayrımında oldukça başarılı sonuçların eldesine imkan sağlanmıştır.




**Şekil 2. 7.** Trigliserit türlerinin çok boyutlu kromatografi tekniği ile tayini için geliştirilen on-line birleştirilmiş analiz sistemine ait şematik gösterim

Klift ve ark. (2008); mısır yağı numunesinde trigliserit türlerinin tayini için, çok boyutlu kromatografik ayrımın uygulandığı birleştirilmiş analiz sistemini geliştirmiştir (Şekil 2.8). Birinci boyut kromatografik ayrım için $Ag^{+}$-HPLC tekniği uygulanırken, ikinci boyut ayrım için RP-HPLC tekniği uygulanmıştır. Akışa istenilen yönü vererek iki boyutlu ayrım analizlerine imkan sağlayabilen 10PT/2PS valf sistemi, fraksiyonların

toplanarak 2D-HPLC kolonuna enjekte edilmesi için ise 40 µL loop sistemi kullanılmıştır. Gerçekleştirilen ayrımlar; UV (210 nm), ELSD ve (+)-APCI-MS dedektör sistemleri ile gözlemlenmiştir. Geliştirilen yöntem/ analiz sistemi ile; mısır yağında toplam 44 farklı TG türünün ayrımı ve kantitatif tayini gerçekleştirilmiştir. Elde edilen verilerin, FA metil ester analiz sonuçları ve literatür verileri ile karşılaştırması yapılarak TG analizleri için sistemin üstünlüğü kanıtlanmıştır.




**Şekil 2. 8.** Mısır yağındaki trigliserit türlerinin çok boyutlu kromatografi tekniği ile tayini için geliştirilen on-line birleştirilmiş analiz sistemine ait şematik gösterim

Konuyla ilgili literatürde yer alan çalışmalar, genel olarak özetlenecek olursa;

– Literatürde minör yapılı bileşenlerin tayini için, bu bileşenlerin yağın temel bileşenleri olan trigliserit moleküllerinden; sabunlaştırma, kromatografi (İTK, CC, ...gibi) yada SPE tekniği gibi yöntemler kullanılarak izole edilmeleri önerilmekte, bu yöntemler içerisinde en uygun işlemin SPE tekniğinin kullanımı olduğu belirtilmektedir.

– Ön-deriştirme/zenginleştirme yapılmak istenen hedef lipit türlerinin, ayrımlarının sağlanabilmesi amacıyla; farklı polarite indisi ($P'$) ve elüsyon kuvveti ($\epsilon°$)'ne sahip çözücü seçimleri yapılarak farklı metotlar önerilmiştir. Önerilen yöntemlerde; TG, DG, MG, C, CE, FA ve PL lipit bileşenlerinin, farklı çözücü sistemleri ile fraksiyonlar halinde başarılı bir şekilde izole edilerek tayin edilebildiği gözlenmiştir.

– SPE destek materyali olarak literatürde; $C_{18}$, $C_8$ ve $C_2$ adsorbanların nötral lipitlerin ayrımında kullanımının uygun olduğu; siyano (CN), amino ($NH_2$), diol yada silika (Si) adsorbanların ise polar lipitlerin ayrımında kullanımının uygun olduğu ifade edilmektedir. Nötral ve polar lipit türlerinin her ikisinin ayrımına hitap edebilen ve en geniş kullanım alanı bulan katı destek materyali silika jel olarak belirtilmektedir. Geniş bir aralıkta çözücü seçeneği söz konusu olmakla birlikte; hekzan, siklohekzan, dietileter, koroform, aseton, asetonitril, etanol ve metanol gibi çözücülerin uygun karışımlarının yaygın olarak tercih edilen çözücü sistemleri olduğu görülmektedir.

– SPE ön deriştirme/zenginleştirme işlemi sonrasında izole edilen lipitlerin mevcut bileşenlerine ayrımı ve tayini için modern analiz sistemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Literatürde modern analiz sistemleri kullanılarak yapılan çalışmaların büyük bir kısmında, lipit türlerinin eş zamanlı tayinleri için HPLC-ELSD yönteminin önerildiği görülmektedir.

– Analitlerin herhangi bir spesifik özelliğe sahip olmasını gerektirmeyen, sadece genel özelliklerini esas alarak tayinlerine imkan sağlayan ELSD dedektörü ile, lipit bileşenlerinin tümünün eş zamanlı olarak dedeksiyonu sağlanmaktadır. Bu nedenle; farklı kaynaklardan elde edilen lipit karışımlarının, HPLC analiz sistemindeki kalitatif ve kantitatif tayinleri için oldukça verimli sonuçlar elde edilebilmektedir.

– Literatürde; numune ön işlemi ve modern sistem analizlerinin, ayrı analiz sistemlerinde ardışık olarak uygulandığı yöntemler *"off-line birleştirilmiş yöntemler"* olarak tanımlanmış ve bu yöntemlerin; oldukça zahmetli, zaman alıcı ve fazla kimyasal tüketimine neden olan yöntemler olduğu ifade edilmektedir. Off-line yöntemlere alternatif olarak geliştirilen çok az sayıda *"on-line birleştirilmiş analiz yönteminin"* olduğu görülmektedir. Fakat, kompleks karışım halinde bulunan lipit bileşenlerinin tayini için on-line birleştirilmiş analiz sistemi mantığına yaklaşım sunması ve temel oluşturması bakımından İTK tekniğinde uygulanan çok boyutlu ayırma uygulamasının mevcut olduğu görülmektedir.

– On-line birleştirilmiş analiz sistemleri, analizlerin amacına uygun olarak özel bir sistem dizaynı ve enstrümantasyonu gerektirmektedir. Az sayıda literatürde; yönlendirme valflerinin ve gerekli sistem parçasının HPLC sistemine adapte/modifiye edilmesiyle oluşturulan on-line analiz sistemleri, işleyişleri ve geliştirilmeye çalışılan bazı uygulamaları bulunmaktadır. Bu uygulamalar arasında, bitkisel yağların kalite-kontrolünü belirlemede büyük önem arz eden tayinlerin tamamının, numune ön

işlemlerinin on-line gerçekleştirilebildiği tek bir analiz sistemi üzerinde, tek bir enjeksiyon ile yapılabilirliği üzerine yürütülmüş herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

− Sonuç olarak, dünya literatüründe ilk defa önerilen ve kapsamlı bir şekilde inceleme yapılan çalışma için kullanılan metot programlamalarının istenilen analizlere kolaylıkla geçiş sağlanabilecek şekilde tarafımızdan geliştirilmiş olması, çalışmanın özgünlüğünü daha fazla ön plana çıkarmaktadır.

## 2.1. Tez Çalışmasının Amacı

Sunulan tez çalışması ile; birçok yağ analizinin ön işlem basamağında yer alan SPE tekniğinin, FIA ve HPLC sistemlerine entegrasyonu ile, bitkisel yağlarda mevcut türlerin tek bir enjeksiyon ile 3 boyutlu kromatografik tayinleri için, numune ön işlemlerinin otomatik olarak gerçekleştirilebildiği ve analizci müdahalesinin en aza indirildiği "*On-line SPE-FIA-HPLC yağ analiz sistemi*" oluşturulmuş ve sistem üzerinde yeni yağ analiz metotlarının geliştirilip/ uygulanabilirlik kazanması sağlanmıştır. Bu kapsamda yürütülen deneysel çalışmalar, 6 ana başlık altında incelenebilir;

- **Birinci aşamada;** SPE tekniğinin uygulandığı I. boyut ayrım ($1^{st}$-D) analizleri ile, bitkisel yağlarda bulunan nötral ve polar lipit türlerinin iki ana fraksiyon halinde ayrımı ve tayini sağlanmıştır. Analizlerde nötral ve polar lipit içeriği bakımından farklılık gösteren; palm, ayçiçeği, mısır, soya, kanola ve sızma zeytinyağı gibi bitkisel yağların ham ve rafine özellikteki numuneleri incelenmiştir. Analizler için, materyal metot kısmında yer alan "*I. boyut ayrım ($1^{st}$-D) analizlerine ait sistem işleyişi*" ve "*metot programı*" oluşturulmuştur.

- **İkinci aşamada;** NP-HPLC tekniğinin uygulandığı II. boyut ayrım ($2^{nd}$-D) analizleri ile; I. boyut ayrım aşamasında toplu halde SPE kolondan izole edilen nötral lipit fraksiyonun, mevcut bileşenlerine (trigliserit, tokol, FFA, sterol, digliserit ve monogliserit türlerine); SPE kolondan izole edilen polar lipit fraksiyonun ise, fosfolipit türlerine ayrımı ve tayini sağlanmıştır. Yürütülen deneylerde çeşitli parametrelerin (akış hızı, hareketli fazın bileşimi, numune miktarı, sıcaklık, ...vb) kromatografik ayrımlar üzerine etkisi incelenmiş ve optimizasyon çalışması gerçekleştirilmiştir. Optimizasyon çalışmalarında; kemometrik yaklaşım izlenerek 5 seviyeli/3 faktörlü deneysel

tasarımlardan ve tepki yüzeyleri metodolojisinden (RSM) faydalanılmıştır. Analizler için, materyal metot kısmında yer alan "*II. boyut ayrım ($2^{nd}$-D) analizlerine ait sistem işleyişi*" ve "*metot programı*" oluşturulmuştur.

- **Üçüncü aşamada;** NP-HPLC, RP-HPLC ve $Ag^{+}$-HPLC tekniğinin uygulandığı III. boyut ayrım ($3^{rd}$-D) analizleri ile; III. boyut ayrım aşamasına fraksiyonlar halinde aktarılan ve $3^{rd}$-D HPLC kolonda bileşenlerine ayrımı planlanan lipit türlerinin analizleri için; birleştirilmiş sistem uygulamaları öncesinde ayrı ayrı optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bir önceki aşamada olduğu gibi, optimizasyon çalışmaları için kemometrik yaklaşım izlenerek 5 seviyeli/3 faktörlü merkezi kompozit deneysel tasarımdan (MKT) ve RSM'den faydalanılmıştır. Analizler için, materyal metot kısmında yer alan "*III. boyut ayrım ($3^{rd}$-D) analizlerine ait sistem işleyişi*" ve "*metot programı*" oluşturulmuştur.

- **Dördüncü aşamada;** SPE ve NP-HPLC tekniklerinin birleştirilerek uygulandığı I. ve II. boyut ayrım ($1^{st}$-D & $2^{nd}$-D) analizleri gerçekleştirilmiştir. Analizlerde; I. boyut ayrım aşamasında SPE kolondan toplu halde izole edilen nötral lipit fraksiyonun $2^{nd}$-D HPLC kolona yönlendirilmesi, daha sonra bu fraksiyonun mevcut lipit bileşenlerine (trigliserit, tokol, FFA, sterol, digliserit ve monogliserit) ayrılarak fraksiyonlar halinde tayin edilmesi sağlanmıştır. Numune çözücü sistemi, akış hızı, valf pozisyonlarının değiştirilme süresi, azot gazı akış hızı, sabit ve hareketli faz türü gibi deneysel parametrelerin kromatografik ayrımlar üzerine etkisi kapsamlı bir şekilde değerlendirmiştir. Analizler için, materyal metot kısmında yer alan "*birleştirilmiş I. ve II. boyut ayrım ($1^{st}$-D & $2^{nd}$-D) analizlerine ait sistem işleyişi*" ve "*metot programı*" oluşturulmuştur.

- **Beşinci aşamada;** NP-HPLC, FIA ve $Ag^{+}$-HPLC tekniklerinin birleştirilerek uygulandığı II. ve III. boyut ayrım ($2^{nd}$-D & $3^{rd}$-D) analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada yürütülen deneysel çalışmalarda; II. boyut ayrım aşamasında $2^{nd}$-D HPLC kolondan izole edilen nötral lipit türlerinin (trigliserit, tokol, FFA, sterol, digliserit ve monogliserit) fraksiyonlar halinde $3^{rd}$-D HPLC kolona sırayla yönlendirilmesi, bileşenlerine ayrımı ve tayini sağlanmıştır. Analizler için, materyal metot kısmında yer alan "*birleştirilmiş II. ve III. boyut ayrım ($2^{nd}$-D & $3^{rd}$-D) analizlerine ait sistem işleyişi*" ve "*metot programı*" oluşturulmuştur.

- **Altıncı aşamada;** SPE, NP-HPLC, FIA ve $Ag^{+}$-HPLC tekniklerinin birleştirilerek uygulandığı I., II. ve III. boyut ayrım ($1^{st}$-D & $2^{nd}$-D & $3^{rd}$-D) analizlerine ait deneyler yürütülmüştür. I., II. ve III. boyut ayrım aşamalarının her birisi için tamamlanan optimizasyon çalışmaları doğrultusunda; sistem işleyişi, metot parametreleri netleştirilmiş ve belirtilen tekniklerinin tümünün sistem üzerinde birleştirilerek uygulamaya konulması sağlanmıştır. On-line SPE-FIA-HPLC yağ analiz sisteminin, $1^{st}$-D & $2^{nd}$-D & $3^{rd}$-D analizleri için nihai işleyişi ve optimum metot parametreleri kullanılarak, ülkemizde yaygın olarak tüketilen ayçiçek, mısır, pamuk, soya, kanola, palm yağı gibi farklı özellikteki bitkisel yağ numuneleri için analizler gerçekleştirilmiştir. Analizler için, materyal metot kısmında yer alan "*birleştirilmiş I., II. ve III. boyut ayrım ($1^{st}$-D & $2^{nd}$-D & $3^{rd}$-D) analizlerine ait sistem işleyişi*" ve "*metot programı*" oluşturulmuştur.

# 3. MATERYAL VE YÖNTEM

## 3.1. Kullanılan Kimyasallar, Çözeltiler ve Hareketli Faz Sistemleri

Gerçekleştirilen analizlerin tümünde kromatografik ve spektroskopik saflıkta kimyasal maddeler kullanılmıştır. Kimyasallar; VWR International (Poole, UK), Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) ve Merck (Darmstadt, DEU) firmalarından temin edilmiştir. Yüksek saflıktaki lipit standartları; trigliserit kiti, digliserit (1,2 diolein,1,3 diolein), monogliserit (monoolein), serbest yağ asidi (oleik asit, stearik asit), tokoferol (α-T, β-T, γ-T, δ-T), tokotrienol (α-TT, β-TT, γ-TT, δ-TT), sterol (stigma sterol) ve ester (stearyl stearate) standart maddeleri Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) firmasından temin edilmiştir.

Numune olarak; ayçiçeği, mısır, zeytinyağı, soya, kanola, pamuk ve palm yağı gibi ülkemizde yaygın şekilde üretimi/tüketimi gerçekleştirilen bitkisel yağ ve soğuk pres yağ numuneleri kullanılmıştır. Yöntem parametrelerinin belirlenmesi için yürütülen optimizasyon çalışmalarında, belirtilen yağ numunelerine ait ham, rafine yada rafinasyon ara ürünleri (degum, nötralize, ağartılmış, vinterize, deoderize yağ ve distilat numuneleri) tercih edilmiştir.

Hekzan, polar lipit çözücü sistemi [hekzan: izopropanol: asetik asit (50:50:1.0, v/v/v)+0.08% trimetilamin] yada nötral lipit çözücü sistemi [hekzan: asetik asit (99:1.0, v/v)] ile; analizlerde kullanılan numunelere ait uygun konsantrasyon aralıklarında çözeltiler hazırlanmıştır. Standart trigliserit kit, digliserit (1,2 diolein,1,3 diolein), monogliserit (monoolein) için 1,6 μg $\mu L^{-1}$; serbest yağ asidi (oleik asit, stearik asit) için 0,4 μg $\mu L^{-1}$; tokoferol (α-T, β-T, γ-T, δ-T), tokotrienol (α-TT, β-TT, γ-TT, δ-TT), sterol (stigma sterol) ve ester (stearyl stearate) için 1,0 μg $\mu L^{-1}$ şeklinde, hekzan içerisinde stok çözeltiler hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözeltilerden; 0,2 ila 20,0 μL aralığında enjeksiyonlar gerçekleştirilerek analizler yürütülmüştür. Hazırlanan tüm numuneler; analiz öncesinde yaklaşık 20 dakika ultrasonik banyoda bekletilerek, çözeltilerin uygun şekilde hazırlanması sağlanmıştır. Analizlerin tümü, en az üç tekrarlı gerçekleştirilmiştir.

Geliştirilen analiz yöntemlerinin herbirisi için kromatografik saflıkta kimyasallar kullanılarak, farklı özelliklerde hareketli faz ve numune çözücü sistemleri oluşturulmuştur. Analizler için önerilen hareketli faz ve numune çözücü sistemleri ve özellikleri Çizelge 3.1'de detaylı olarak verilmiştir.

**Çizelge 3. 1.** On-line SPE-FIA-HPLC birleştirilmiş yağ analiz sisteminde uygulanan yöntemler için önerilen hareketli faz sistemleri

| Hareketli faz sistemi | ***P'*** **(polarite indisi)** | Kullanıldığı analiz yöntemi |
|---|---|---|
| ▪ **Polar lipit A hareketli fazı** [*hekzan:izopropanol: asetik asit, 82:17:1.0, v/v/v+ 0.08% trimetilamin*] | **0,88** | – SPE tekniğinin uygulandığı I. boyut ayrım analizleri<br>– SPE ve NP-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı I. ve II. boyut ayrım analizleri |
| ▪ **Polar lipit B hareketli fazı** [*izopropanol: su: asetik asit, 85:14:1.0, v/v/v + 0.08% trimetilamin*] | **5,40** | – SPE tekniğinin uygulandığı I. boyut ayrım analizleri<br>– SPE ve NP-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı I. ve II. boyut ayrım analizleri |
| ▪ **Nötral lipit A hareketli fazı** [*hekzan: asetik asit (99:1.0, v/v/v)*] | **0,16** | – NP-HPLC tekniğinin uygulandığı II. boyut ayrım analizleri<br>– NP-HPLC, FIA ve $Ag^+$-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı II. ve III. boyut ayrım analizleri<br>– SPE, NP-HPLC, FIA ve $Ag^+$-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı I., II. ve III. boyut ayrım analizleri |
| ▪ **Nötral lipit B hareketli fazı** [*hekzan: izopropanol: asetik asit (84:15:1.0, v/v/v)*] | **1,30** | – NP-HPLC tekniğinin uygulandığı II. boyut ayrım analizleri<br>– NP-HPLC, FIA ve $Ag^+$-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı II. ve III. boyut ayrım analizleri<br>– SPE, NP-HPLC, FIA ve $Ag^+$-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı I., II. ve III. boyut ayrım analizleri |
| ▪ **Trigliserit $Ag^+$-HPLC tekniği A hareketli fazı** [*hekzan*] | **0,10** | – $Ag^+$-HPLC tekniğinin uygulandığı III. boyut ayrım analizleri<br>– NP-HPLC, FIA ve $Ag^+$-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı II. ve III. boyut ayrım analizleri<br>– SPE, NP-HPLC, FIA ve $Ag^+$-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı I., II. ve III. boyut ayrım analizleri |
| ▪ **Trigliserit $Ag^+$-HPLC tekniği B hareketli fazı** | **1,19** | – $Ag^+$-HPLC tekniğinin uygulandığı III. boyut ayrım |

| | | |
|---|---|---|
| [*hekzan : izopropanol : ACN (75: 22,5: 2,5%, v/v/v)*] | | analizleri<br>– NP-HPLC, FIA ve $Ag^+$-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı II. ve III. boyut ayrım analizleri<br>– SPE, NP-HPLC, FIA ve $Ag^+$-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı I., II. ve III. boyut ayrım analizleri |
| ▪ **Trigliserit RP-HPLC tekniği hareketli fazı**<br>[*aseton: asetonitril (50: 50%, v/v)*] | **5,45** | – RP-HPLC tekniğinin uygulandığı III. boyut ayrım analizleri<br>– NP-HPLC, FIA ve RP-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı II. ve III. boyut ayrım analizleri |
| ▪ **Tokol NP-HPLC tekniği hareketli fazı**<br>[*hekzan:izopropanol(99,4:0,6%, v/v)*] | **0,36** | – NP-HPLC tekniğinin uygulandığı III. boyut ayrım analizleri |

| **Numune çözücü sistemi ve Kimyasallar** | ***P'*<br>(polarite indisi)** |
|---|---|
| ▪ **Polar lipit çözücü sistemi**<br>[*hekzan:izopropanol: asetik asit, 50:50:1 v/v/v+ 0.08% trimetilamin*] | **2,26** |
| ▪ **Nötral lipit çözücü sistemi**<br>[*hekzan: asetik asit (99:1.0, v/v/v)*] | **0,16** |
| ▪ **Hekzan** | **0,10** |
| ▪ **İzopropanol** | **4,30** |
| ▪ **Ultra saf su** | **10,20** |
| ▪ **Asetik asit** | **6,20** |
| ▪ **Trietilamin** | **1,80** |
| ▪ **Aseton** | **5,10** |
| ▪ **Asetonitril** | **5,80** |

## 3.2. Kullanılan Analiz Sistemleri / Cihazlar

Çalışma kapsamında geliştirilen on-line SPE-FIA-HPLC birleştirilmiş yağ analiz sistemi, araştırma laboratuarımızda mevcut Agilent 1200 Series HPLC analiz sisteminin modifiye edilmesi ile oluşturulmuştur. Analiz sisteminin oluşturulmasında kullanılan sistem elemanları ve özellikleri Çizelge 3.2'de yer almaktadır.

**Çizelge 3. 2.** On-line SPE-FIA-HPLC birleştirilmiş yağ analiz sisteminin enstrümantasyonu için kullanılan sistem elemanları

| HPLC sistem elemanı / modeli | | Özelliği/ İşlevi |
|---|---|---|
| ▪ **1 adet bilgisayar sistemi** |  | on-line kontrol sağlayabilen Agilent ChemStation software |
| ▪ **2 adet degazörlü gradient pompa sistemi** (*Agilent 1200 series, G1311A model*) |  | farklı çözücü sistemlerini aynı anda sisteme gönderilmesini sağlama |
| ▪ **1 adet otomatik enjektör sistemi** (*Agilent 1200 series, G1328B model*) |  | numuneleri sisteme otomatik enjekte etme |
| ▪ **3 adet yönlendirme valf sistemi** 1 adet 10PT/2PS valf; 2 adet 6PT/2PS valf |  | Sistem içerisinde numune ve çözücülerin akışına istenilen yönün verilmesini sağlama |
| ▪ **1 adet yüksek sıcaklık kolon fırını** (*Agilent 1200 series, G1316A model*) |  | numunelerin uygun sıcaklıkta analiz edilmesine imkân sağlama |
| ▪ **4 adet dedektör sistemi**<br>Buharlaştırmalı ışık saçılım dedektörü (ELSD) (*Agilent, 385A model*)<br>Diode array dedektör (DAD)(*Agilent 1200 series, G4212B model*)<br>Floresans dedektör (FLD)(*Agilent 1200 series, G1321C model*)<br>Kırma indisi dedektör (RID)(*Agilent 1200 series, G1362A model*) |  | lipit türlerinin dedekte edilebilmesine imkân sağlama |
| ▪ **1 adet SPE kolon** | Inertsil Sil 100 Å kolon (50 x 4.6 mm i.d., 5µm) (*GL SciencesLaboratorySuppliesCo.*)<br>LiChrospher 100 Å Diol kolon (75x4 mm i.d.,5µm) (*Teknokroma*) | |
| ▪ **1 adet NP-HPLC kolon** | LiChrospher 100 Å Diol kolon (75 x 4 mm i.d., 5µm) (*Teknokroma*) gard kolon ve LiChrospher 100 Å Diol kolon (250 x 4 mm i.d., 5µm) (*Teknokroma*) | |

| | |
|---|---|
| ▪ **1 adet RP-HPLC kolon** | ACE 5 C18 kolon (250 x 4 mm i.d., 5 µm) (*Agilent*) |
| ▪ **2 adet $Ag^{+}$-HPLC kolon** | ChromSphere 5 Lipids kolon (250x4.6 mm i.d.,5 µm) (*Agilent*) |
| ▪ **2 adet FIA loop sistemi** | 20, 50 ve 100 µL hacminde |
| ▪ **Farklı uzunluktaki bağlantı elemanları** | 0.17 mm iç çapına sahip metal bağlantılar |

### 3.3. On-line SPE-FIA-HPLC Yağ Analiz Sisteminin İşleyişi

Agilent 1200 Series HPLC sisteminin modifiye edilmesi ile oluşturulan On-line SPE-FIA-HPLC yağ analiz sistemine ait şematik gösterim Şekil 3.1'de yer almaktadır. Önerilen analiz sistemi üzerinde yürütülen deneylere ait veriler/sinyaller, Agilent Chemstation yazılımı ile kaydedilerek değerlendirilmiştir.

On-line SPE-FIA-HPLC yağ analiz sisteminin işleyişi, genel hatlarıyla özetlenecek olursa;

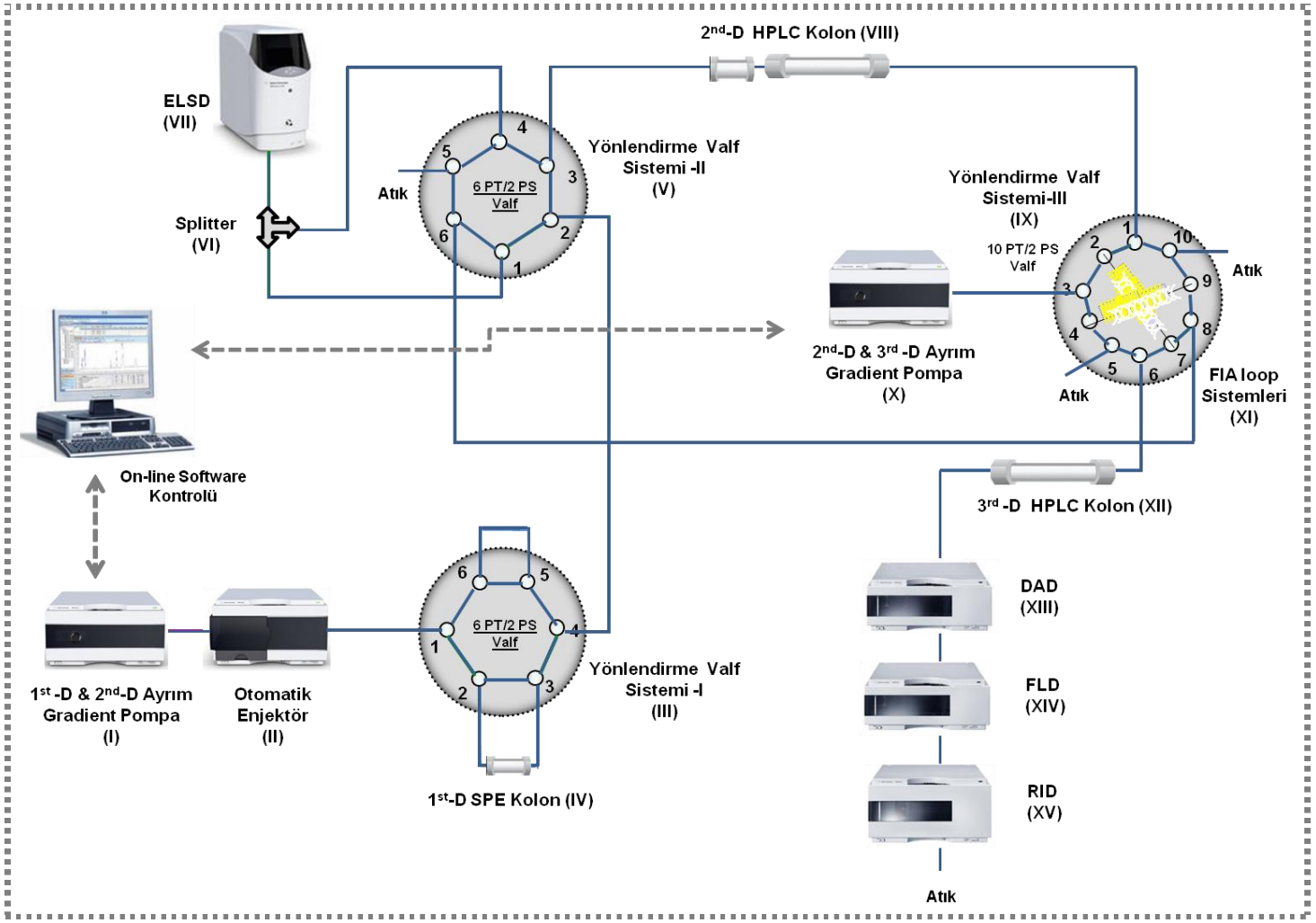
- Uygun bir çözücü ile hazırlanan yağ numunesi, gradient pompa **(I)** ve otomatik enjektör **(II)** vasıtasıyla sisteme enjekte edilir. Enjeksiyon işleminin ardından termostatlı kolon fırınından geçen karışım, seçilen uygun pozisyon ile yönlendirme valfi (6PT/2PS) **(III)** üzerine adapte edilen SPE kolonuna **(IV)** yönlendirilir. Polar lipit çözücü sistemleri kullanılarak oluşturulan gradient program sayesinde, lipit bileşenlerinin SPE kolon **(IV)** üzerinde "***nötral***" ve "***polar lipitler***" şeklinde iki temel fraksiyona ayrımı sağlanır. "***I. boyut ayrım analizleri***" olarak adlandırılan bu aşama ile; yağlarda mevcut nötral (*trigliserit, tokoferol, tokotrienol, FFA, sterol, digliserit, monogliserit, ester bileşikleri*) ve polar lipitlerin (*fosfolipitler*), II. boyut ayrım aşaması öncesinde birbirinden tamamen izole edilerek ayrımları sağlanır.

- SPE kolonu **(IV)** üzerinde izole edilen ilk fraksiyon yani toplu haldeki nötral lipit fraksiyonu, ELS dedektörde **(VII)** gözlemlendiği anda, valf-I (6PT/2PS) **(III)** ve valf-II (6PT/2PS) **(V)** sistemlerinin pozisyonları değiştirilir. Valf pozisyonlarının değişmesi ile; SPE kolon **(IV)** üzerinde devam eden I. boyut ayrım analizinin, nötral lipit fraksiyonun tamamen izole edildiği, polar fraksiyonun ise ileriki aşamada ayrımı sağlanmak üzere kolonda bırakıldığı aşamada kesilmesi/ara verilmesi sağlanır. Bu esnada valf-II (6PT/2PS) **(V)** ve HPLC kolon **(VIII)** arasında kullanılan akış yolunda bulunan nötral lipit fraksiyonu, devam eden akışla birlikte II. boyut ayrım analizlerinin gerçekleştirildiği $2^{nd}$-D HPLC kolonuna **(VIII)** ulaşmış olur. Sistem üzerine adapte edilen manuel splitter **(VI)** yani numune bölücü sistemi ise; I. boyut ayrım aşamasından elde edilen nötral lipit fraksiyonun ikiye bölünerek bir kısmının ELS dedektöre **(VII)**,

diğer kısmının ise II. boyut ayrım analizlerinin gerçekleştirildiği $2^{nd}$-D HPLC kolonuna **(VIII)** yönlendirilmesini sağlar. Yani; in-line kullanımı mümkün olmayan ve numunenin tamamen bozulmasına neden olan ELS dedektörün **(VII)**, sistem üzerinde aktif kullanımına ve fraksiyonların I. boyut ayrım aşamasından, II. boyut ayrım aşamasına aktarılması sağlanır.

- II. boyut ayrım aşamasına aktarılan nötral lipit fraksiyonun, mevcut lipit bileşenlerine ayrımı için $2^{nd}$-D HPLC kolonuna **(VIII)** ulaşmasıyla birlikte; ***"II. boyut ayrım aşaması"***na tamamen geçiş sağlanır. II. boyut ayrım aşamasında; pompa **(I)** üzerinde oluşturulan yeni bir gradient program ile, nötral lipit çözücü sistemi/ hareketli faz karışımı sisteme gönderilir. Valf-I (6PT/2PS) **(III)** ve valf-II (6PT/2PS) **(V)** sistemleri için seçilen uygun pozisyonlarla sağlanan bu işlem ile; $2^{nd}$-D HPLC kolonu **(VIII)** üzerinde nötral lipit fraksiyondaki türlerin ayrımı sağlanmaktadır. II. boyut ayrım aşamasında elde edilen veriler/ kromatogramlar; I. boyut ayrımda olduğu gibi ELS dedektörde **(VII)** gözlenmekte ve alıkonma süreleri tespit edilmektedir. ELSD sisteminde **(VII)**; trigliserit, tokoferol, tokotrienol, FFA, sterol, digliserit, ester ve monogliserit piklerine ait alıkonma sürelerinin tespitinin ardından, bu türlerin her birisinde mevcut izomerlerin/ türlerin ayrım aşamasına yani "***III. boyut ayrım analizleri***"ne geçiş yapılır.

- III. boyut ayrım analizleri için öncelikle; $2^{nd}$-D HPLC kolonu **(VIII)** ile ayrımı sağlanan nötral lipitlerin alıkonma süreleri dikkate alınarak valf-III (10PT/2PS) **(IX)** üzerine adapte edilen FIA loop sistemlerine **(XI)** sırayla yönlendirilmesi ve fraksiyonlar şeklinde toplanması sağlanır. Loop sistemlerine **(XI)** nötral lipit fraksiyonlarının sırayla toplanmaya başlaması ile; valf-III (10PT/2PS) **(IX)** pozisyonu değiştirilir, pompa **(I)** durdurulur ve pompa **(X)**'nın işler hale gelmesi sağlanır. Böylece III. boyut ayrım aşaması başlatılmış olur. En son aşamada ise; loop sistemlerinde toplanan nötral lipit türlerinin, uygun özellikteki kolonlarda türlerine ayrımını sağlayacak uygun hareketli faz sistemleri, gradient pompa **(X)** yardımıyla gönderilir. Toplanan fraksiyonların, devam eden akışa enjeksiyonu (FIA) şeklinde gerçekleştirilen III. boyut analizlerinde; uygun seçilen $3^{rd}$-D HPLC kolonu **(XII)**, DAD **(XIII)**, FL **(XIV)** ve RI **(XV)** dedeksiyon sistemleri devreye konulmaktadır. III. boyut ayrım analizlerinin, lipit türlerin tamamına uygulanmasının ardından; SPE kolon **(IV)** üzerinde bekletilen polar lipit türlerinin bulunduğu fraksiyonun (*fosfolipitlerin*) analizi için sistemin, ilk halindeki programlamaya geçmesi sağlanır.




**Şekil 3. 1.** HPLC sisteminin modifiye edilmesi ile oluşturulan On-line SPE-FIA-HPLC yağ analiz sistemine ait şematik gösterim

Belirtilen sistem işleyişinin tamamlanmasıyla birlikte; yağlarda mevcut türlerin tek bir enjeksiyon ile, 3 boyutlu kromatografik tayinleri için numune ön işlemlerinin otomatik olarak gerçekleştirilebildiği ve analizci müdahalesinin en aza indirilmesi ile daha kısa sürede, tekrarlanabilirliği yüksek sonuçların elde edilebildiği; on-line SPE-FIA-HPLC yağ analiz metotlarının geliştirilip/ uygulanabilirlik kazanması sağlanmıştır.

### 3.4. On-line SPE-FIA-HPLC Yağ Analiz Sisteminde Uygulanan Yöntemler

On-line SPE-FIA-HPLC yağ analiz sisteminin işler hale getirilmesinin ardından, sistem üzerinde yürütülen deneysel çalışmalar;

**i.** SPE tekniğinin uygulandığı I. boyut ayrım ($1^{st}$-D) analizleri

**ii.** NP-HPLC tekniğinin uygulandığı II. boyut ayrım ($2^{nd}$-D) analizleri

**iii.** NP-HPLC, RP-HPLC ve $Ag^{+}$-HPLC tekniğinin uygulandığı III. boyut ayrım ($3^{rd}$-D) analizleri

**iv.** SPE ve NP-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı I. ve II. boyut ayrım ($1^{st}$-D & $2^{nd}$-D) analizleri

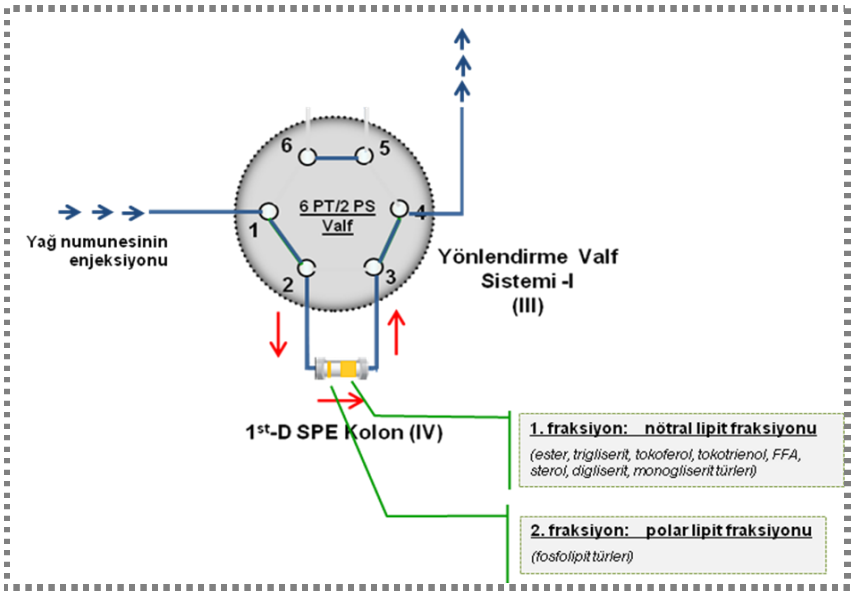
**v.** NP-HPLC, FIA ve $Ag^{+}$-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı II. ve III. boyut ayrım ($2^{nd}$-D & $3^{rd}$-D) analizleri ve

**vi.** SPE, NP-HPLC, FIA ve $Ag^{+}$-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı I., II. ve III. boyut ayrım ($1^{st}$-D & $2^{nd}$-D & $3^{rd}$-D) analizleri

olmak üzere farklı teknik/yöntem uygulamaları ile 6 aşamada tamamlanmıştır. Deneysel çalışmalar aşamalar halinde uygulanırken; Şekil 3.1'de yer alan on-line SPE-FIA-HPLC yağ analiz sistemi üzerinde, her aşamaya özgü farklı akış yolları ve uygun metot parametreleri belirlenmiştir. Sistem üzerinde izlenen akış yolları ve metot optimizasyonu için uygulanan deneysel tasarım çalışmalarına ait bilgiler ilgili başlıklar altında detaylı olarak yer almaktadır.

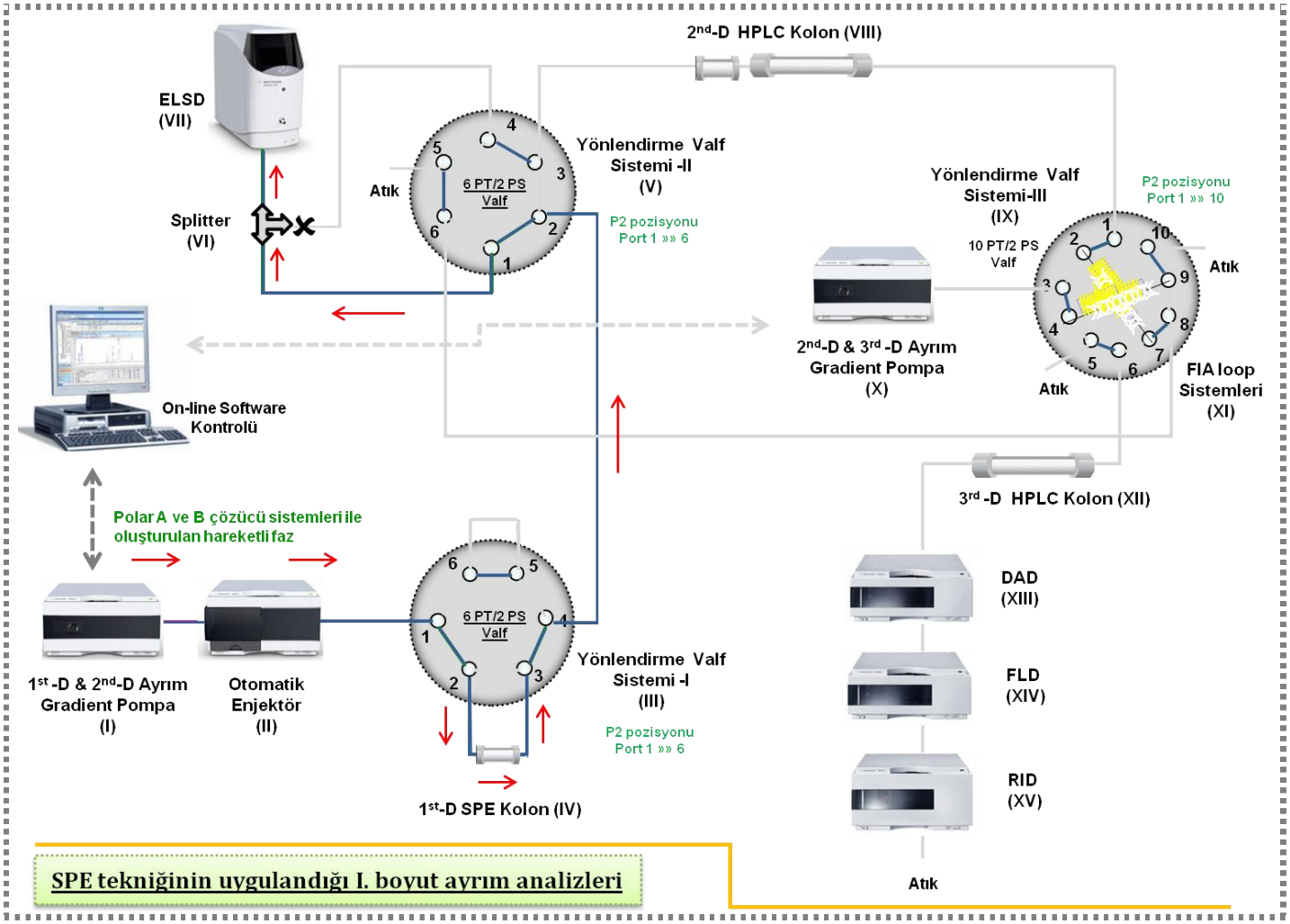
### 3.4.1. SPE tekniğinin uygulandığı I. boyut ayrım (1st-D) analizleri

SPE tekniğinin uygulandığı I. boyut ayrım analizleri; bitkisel yağlarda bulunan nötral ve polar lipit bileşenlerinin iki ana fraksiyon halinde ayrılarak tayin edilmesini kapsamaktadır (Şekil 3.2). I. boyut ayrım analizi uygulamaları için sisteme ait işleyişin ve bu aşamada lipit türlerine ait ayrımın şematik gösterimi Şekil 3.2 ve 3.3'de yer almaktadır.




**Şekil 3. 2.** SPE tekniğinin uygulandığı I. boyut ayrım analizlerine ait şematik gösterim

Uygulanan metot programlaması, Çizelge 3.3'de detaylı olarak yer almaktadır. Analizler için, nötral ve polar lipit içerikleri bakımından farklılıklar gösteren; palm, ayçiçeği, mısır, soya, kanola ve sızma zeytinyağı gibi bitkisel yağların ham ve rafine özellikteki numuneleri kullanılmıştır.




**Şekil 3. 3.** SPE tekniğinin uygulandığı I. boyut ayrım analizleri için On-line SPE-FIA-HPLC yağ analiz sisteminin işleyişine ait şematik gösterim

**Çizelge 3. 3.** SPE tekniğinin uygulandığı I. boyut ayrım deneylerinde kullanılan deneysel parametreler

**SPE tekniğinin uygulandığı I. boyut ayrım deneylerinde kullanılan deneysel parametreler**

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| **NUMUNE** | **Türü** | Ham & rafine özellikte / palm, ayçiçek, mısır, soya, kanola ve sızma zeytinyağı | | |
| | **Miktarı** | 0.05 – 0.1 – 0.15 – 0.2 mg yağ/µL çözücü | | |
| | **Enjeksiyon** | Manuel enjeksiyon için 2 µL/ Otomatik enjeksiyon için 5 µL | | |
| | **Çözücü** | Polar lipit çözücü sistemi [hekzan: izopropanol: asetik asit (50:50:1.0, v/v/v) +0.08% trimetilamin] | | |
| **SABİT FAZ** | **Türü** | SPE kolon | | |
| | **Özelliği** | Inertsil Sil 100Å kolon (5µm 50x4.6mm)<br>Chrospher 100Å Diol kolon (5µm 75x4.6mm) | | |
| **HAREKETLİ FAZ** | **Çözücü sistemi (HPLC saflıkta)** | **Polar lipit hareketli faz A:** | Hekzan: izopropanol: asetik asit, 82:17:1.0, v/v/v + 0.08% trimetilamin | |
| | | **Polar lipit hareketli faz B:** | İzopropanol: su: asetik asit, 85:14:1.0, v/v/v + 0.08% trimetilamin | |
| | **Gradient program** | | **Polar A** | **Polar B** |
| | | 0. dk | % 95 | % 5 |
| | | 23. dk | % 60 | % 40 |
| | | 28. dk | % 0 | % 100 |
| | | 29. dk | % 0 | % 100 |
| | | 39. dk | % 95 | % 5 |
| | | 44. dk | % 95 | % 5 |
| | **Akış Hızı** | 0.50- 0.75- 1.00- 1.25- 1.50 – 2.00 mL/dk | | |
| | **Kolon fırını sıcaklık** | 10- 20- 30- 40- 50- 60 °C | | |
| | **Valf sistemi pozisyonu** | **Valf –I (6 PT/2 PS Valf)**<br>P2 | **Valf -II (6 PT/2 PS Valf)**<br>P2 | **Valf -III (10 PT/2 PS Valf)**<br>P2 |
| **DEDEKSİYON** | **Buharlaştırma sıcaklığı** | 50- 60- 70- 80 °C | | |
| | **Nebülizasyon sıcaklığı** | 60- 70- 80- 90 °C | | |
| | **Gaz akışı** | 1.6 SLM | | |

Silika ve diol yapılı sabit faz içeren SPE kolonları ile gerçekleştirilen tayinlerde; polar lipit çözücü sisteminde hazırlanan bitkisel yağ numuneleri kullanılmış, mikro seviyede numune enjeksiyonu ile optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Atlantik somon balığının karaciğerinden ve yumurtasından ekstrakte edilen yağdaki nötral ve polar lipit fraksiyonların tayin edildiği literatür çalışmasında uygulanan metot şartları esas alınarak, optimizasyon çalışmalarına yön verilmeye çalışılmıştır (Siversand ve Haux, 1997). I. boyut ayrım analizleri için etkili olduğu bilinen ve optimize edilen bazı deneysel parametreler;

- Hareketli faz türü
- Numune miktarı
- Sıcaklık
- Akış hızı
- ELSD dedektör için buharlaştırma & nebülizasyon sıcaklıkları şeklindedir.

#### 3.4.1.1. Hareketli faz türü etkisi

Hareketli faz bileşimi etkisinin incelendiği çalışmalarda, farklı çözücü sistemleri ile oluşturulan gradient sistemlerin uygulandığı metotlar uygulanmıştır. Uygulanan metotlarda; polar lipit A ve B çözücü sistemleri kullanılarak, farklı zaman uygulamaları ile gradient metotlar oluşturulmuştur (Çizelge 3.3 ve 3.4).

#### 3.4.1.2. Numune miktarı etkisi

Numune miktarı etkisinin incelendiği çalışmalarda; yağ numunesinin nötral ve polar fraksiyon olmak üzere iki temel fraksiyon şeklinde ayrılmasında etkin diol ve silika yapılı SPE kolonlar ile analizler gerçekleştirilmiştir. Farklı bitkisel yağ numuneleri için yürütülen çalışmalarda; polar lipit çözücü sisteminde hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki numuneler (0.05– 0.10– 0.15 ve 0.20 mg yağ/µL) ile analizler gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.3).

**Çizelge 3. 4.** I. boyut ayrım deneylerinde uygulanan farklı metot gradient programları

| METOT- 1 | Polar A | Polar B | P'(*) |
|---|---|---|---|
| 0. dk | % 95 | % 5 | 1.6 |
| 23. dk | % 60 | % 40 | 3.0 |
| 28. dk | % 0 | % 100 | 5.4 |
| 29. dk | % 0 | % 100 | 5.4 |
| 39. dk | % 95 | % 5 | 1.6 |
| 44. dk | % 95 | % 5 | 1.6 |
| **METOT- II** | | | |
| 0. dk | % 95 | % 5 | 1.6 |
| 13. dk | % 60 | % 40 | 3.0 |
| 15. dk | % 0 | % 100 | 5.4 |
| 16. dk | % 0 | % 100 | 5.4 |
| 21. dk | % 95 | % 5 | 1.6 |
| 23. dk | % 95 | % 5 | 1.6 |
| **METOT- III** | | | |
| 0. dk | % 95 | % 5 | 1.6 |
| 5. dk | % 60 | % 40 | 3.0 |
| 6. dk | % 0 | % 100 | 5.4 |
| 7. dk | % 0 | % 100 | 5.4 |
| 9. dk | % 95 | % 5 | 1.6 |
| 12. dk | % 95 | % 5 | 1.6 |

### 3.4.1.3. Sıcaklık etkisi

Sıcaklık etkisinin incelendiği çalışmalarda; diol ve silika yapılı SPE kolonlar kullanılarak, polar çözücü ile uygun konsantrasyonlarda hazırlanan numuneler için farklı sıcaklıklarda (10- 20- 30- 40- 50 ve 60°C) analizler gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.3).

### 3.4.1.4. Akış hızı etkisi

Akış hızı etkisinin incelendiği çalışmalarda; sabit faz olarak hem diol hem de silika yapılı SPE kolonlar kullanılarak farklı akış hızları ile analizler gerçekleştirilmiştir. 0.1 mg yağ/µL polar çözücü şeklinde hazırlanan yağı numuneleri kullanılarak, manuel ve otomatik enjeksiyon ile 0.50- 0.75- 1.00- 1.25- 1.50- 1.75 ve 2.00 mL/dk akış hızları için analizler gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.3).

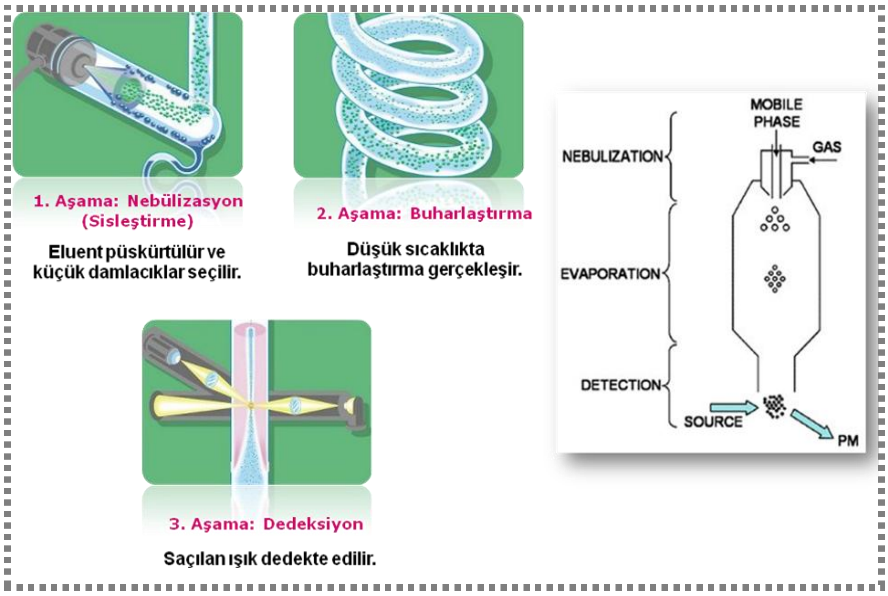
### 3.4.1.5. ELSD sistemi nebülizasyon ve buharlaştırma sıcaklığı etkisi

ELSD (buharlaştırmalı ışık saçılım dedektör) sistemi, lipit türlerinin tayininde son yirmi yılda en yaygın kullanım alanı oluşturan HPLC dedektörü olarak literatürde yer almaktadır. ELSD sistemi ile gerçekleştirilen dedeksiyonlar, analitlerin genel özellikleri esasına dayanarak gerçekleştirilmektedir. Analitin, herhangi bir elektro aktif yada kromofor gruba sahip olma gibi özelliğe sahip olmasını gerektirmemektedir. Dedektör cevabı direk olarak maddelerin kütlesi ile ilgili alınmakta ve temel olarak hareketli fazdan daha az uçucu olan tüm maddeler tespit edilebilmektedir.

Dedektör sistemi, başlıca üç kısımdan oluşmaktadır;

- Nebülizasyon (sisleştirme),
- Buharlaştırma ve
- Saçılan ışının dedeksiyonu olayları meydana gelmektedir (Şekil 3.4).

Buharlaştırma ve nebülizasyon sıcaklıklarının, dedeksiyon kalitesine etkisinin incelendiği çalışmalarda; ham palm yağı numuneleri tercih edilmiş ve diol yapılı sabit faz içeren SPE kolonlar ile analizler gerçekleştirilmiştir. 0.1 mg yağ/µL şeklinde hazırlanan numuneler ile gerçekleştirilen analizler için, farklı dedektör sıcaklıklarında (N60;E50- N70;E60- N80;E70 ve N90;E80°C) programlamalar yapılmıştır (Çizelge 3.3).



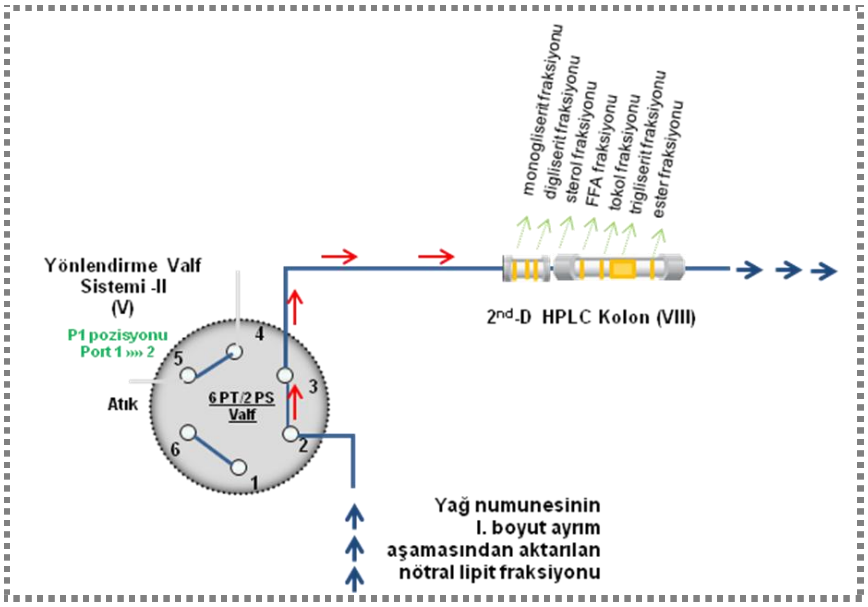

**Şekil 3. 4.** ELSD sisteminin işleyişine ait şematik gösterim

### 3.4.2. NP-HPLC tekniğinin uygulandığı II. boyut ayrım ($2^{nd}$-D) analizleri

NP-HPLC tekniğinin uygulandığı II. boyut ayrım analizleri; I. boyut ayrım aşamasında iki ana fraksiyon halinde ayrılan nötral ve polar lipitlerin $2^{nd}$-D HPLC kolona aktarılarak mevcut lipit bileşenlerine ayrılmasını ve tayin edilmesini kapsamaktadır. Başka bir ifadeyle II. boyut ayrım analizleri,

- I. boyut ayrım aşamasında toplu halde SPE kolondan izole edilen nötral lipit fraksiyonun, $2^{nd}$-D HPLC kolonda uygun hareketli faz sistemleri ile *trigliserit, tokol, FFA, sterol, digliserit* ve *monogliserit* türlerine ayrılarak tayin edildiği,
- izole edilen polar lipit fraksiyonun ise; *fosfolipit* türlerine ayrılarak tayin edildiği aşama olarak tanımlanabilir.

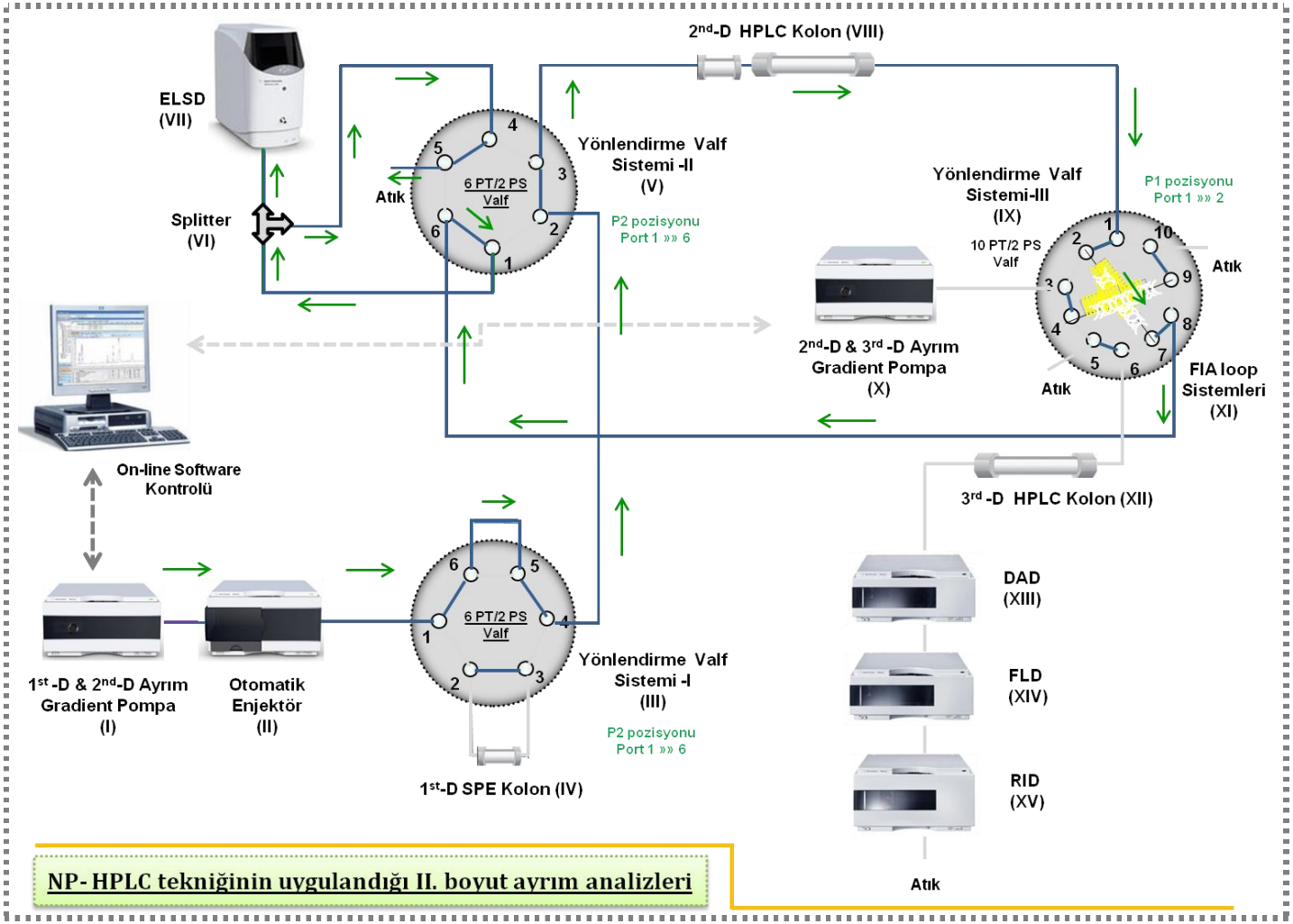
II. boyut ayrım analizleri için, sisteminin işleyişinde izlenen akış yolları ve lipit türlerine ait ayrımın şematik gösterimi Şekil 3.5 ve 3.6'da yer almaktadır. Şekil 3.5'den görüleceği üzere; toplu bir şekilde elüe edilen nötral lipit fraksiyonu $2^{nd}$-D HPLC kolona ilk önce ulaşmakta ve uygun şartların kullanılmasıyla lipit fraksiyonlarına/ bileşenlerine ayrılmaktadır. Bu aşamada elde edilen fraksiyonların (TG, DG, MG, FFA, tokol,... gibi) kendi bileşenlerine ayrımı için tekrar bir ayrım aşaması gerekmektedir. Bu nedenle; daha sonraki kısımlarda yer alan III. boyut ayrım aşaması uygulanmasına geçilmektedir.




**Şekil 3. 5.** NP-HPLC tekniğinin uygulandığı II. boyut ayrım analizlerine ait şematik gösterim

Uygulanan metot programlaması Çizelge 3.5'de detaylı olarak yer almaktadır. Analizlerde; ayçiçek, mısır, soya, kanola, palm ve sızma zeytinyağı gibi bitkisel yağların ham ve rafine olmak üzere farklı özellikteki numuneleri kullanılmıştır. Optimizasyon çalışmaları için esas alınan başlıca deneysel parametreler;

- Numune çözücü türü
- Numune miktarı
- Sabit faz türü
- Sıcaklık
- Akış hızı
- Azot gazı akış hızı
- Nebülizasyon ve buharlaştırma sıcaklığı şeklindedir.




**Şekil 3. 6.** NP- HPLC tekniğinin uygulandığı II. boyut ayrım analizleri için On-line SPE-FIA-HPLC yağ analiz sisteminin işleyişine ait şematik gösterim

**Çizelge 3. 5.** NP- HPLC tekniğinin uygulandığı II. boyut ayrım analizlerinde kullanılan deneysel parametreler

**NP- HPLC tekniğinin uygulandığı II. boyut ayrım analizlerinde kullanılan deneysel parametreler**

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| NUMUNE | **Türü** | Ham & rafine / palm, ayçiçek, mısır, soya, kanola ve sızma zeytinyağı | | |
| | **Miktarı** | 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 ve 0.5 mg yağ/µL çözücü | | |
| | **Enjeksiyon** | Otomatik enjeksiyon, 5 µL | | |
| | **Çözücü türü** | – Polar lipit çözücü sistemi (Hekzan: izopropanol: asetik asit (50:50:1.0, v/v/v) +0.08% trimetilamin)<br>– Nötral lipit çözücü sistemi (Hekzan: asetik asit (99:1.0, v/v))<br>– Hekzan | | |
| SABİT FAZ | **Türü** | Diol Kolon<br>Silika Kolon | | |
| | **Özelliği** | LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.0mm) + LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 250x4.0mm)<br>Inertsil Sil 100A kolon (5µm 50x4.6mm) + Inertsil Sil 100A kolon (5µm 250x4.6mm) | | |
| HAREKETLİ FAZ | **Çözücü sistemi** | **Nötral lipit hareketli faz A:** | Hekzan: asetik asit (99:1.0, v/v/v) | |
| | | **Nötral lipit hareketli faz B:** | Hekzan: izopropanol: asetik asit (84:15:1.0, v/v/v) | |
| | **Gradient Program** | | **Nötral A** | **Nötral B** |
| | | 0. dk | % 100 | % 0 |
| | | 25. dk | % 0 | % 100 |
| | | 26. dk | % 0 | % 100 |
| | | 29. dk | % 100 | % 0 |
| | | 31. dk | % 100 | % 0 |
| | **Akış hızı** | 0.5, 0.75, 1,0, 1.25 ve 1.5 mL/dk | | |
| | **Kolon Fırını Sıcaklık** | 10-20-30-40-50 °C | | |
| | **Valf Sistemi Pozisyonu** | **Valf -1 (6 PT/2 PS Valf)**<br>P2 | **Valf -2 (6 PT/2 PS Valf)**<br>P2 | **Valf -3 (10 PT/2 PS Valf)**<br>P1 |
| DEDEKSİYON | **Buharlaştırma Sıcaklığı** | 30- 35- 40- 45 ve 50°C | | |
| | **Nebülizasyon Sıcaklığı** | 70- 75- 80- 85 ve 90 °C | | |
| | **Gaz Akışı** | 1.0- 1.5- 1.75- 2.0- 2.25- 2.50 ve 3.0 SLM | | |

### 3.4.2.1. Numune çözücü türü etkisi

Numunelerin hazırlanmasında kullanılan çözücülerin etkisini tespit etmek için gerçekleştirilen analizlerde; ***polar lipit çözücü sistemi*** [hekzan: izopropanol: asetik asit; (50:50:1.0, v/v/v+0.08% trimetilamin)] ve ***nötral lipit çözücü sistemi*** [hekzan: asetik asit; (99:1.0, v/v)] olmak üzere iki farklı çözücü sistemi incelenmiştir (Çizelge 3.5).

### 3.4.2.2. Numune miktarı etkisi

Numune miktarı etkisinin incelendiği çalışmalarda; nötral lipit fraksiyon içerisindeki lipit türlerinin ayrımında etkin olan silika ve diol yapılı $2^{nd}$-D HPLC kolonlar ile analizler gerçekleştirilmiştir. Ham ayçiçek yağı numunesinin kullanıldığı analizler, nötral lipit çözücü sisteminde hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki numuneler (0.05–0.10–0.15–0.20–0.30–0.40 ve 0.50 mg yağ/µL) ile gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.5).

### 3.4.2.3. Akış hızı etkisi

Akış hızı etkisinin incelendiği çalışmalarda; sabit faz olarak diol ve silika yapılı $2^{nd}$-D HPLC kolonlar ile analizler gerçekleştirilmiştir. Nötral çözücü sistemi ve hekzan ile hazırlanan yağ numuneleri kullanılarak, farklı akış hızlarında (0.50-0.75-1.00-1.25 ve 1.50 mL/dk) analizler gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.5).

### 3.4.2.4. Sıcaklık etkisi

Sıcaklık etkisinin incelendiği çalışmalarda; diol yapılı $2^{nd}$-D HPLC kolon kullanılarak, 0.1 mg yağ/µL şeklinde hazırlanan numuneler ile farklı kolon sıcaklıklarında (10- 20- 30- 40 ve 50°C) analizler gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.5).

### 3.4.2.5. Sabit faz türü etkisi

Sabit faz türü etkisinin incelendiği analizler; ***silika*** [Inertsil Sil 100A (5µm,50x4.6mm)+Inertsil Sil 100A (5µm,250x4.6mm)] ve ***diol yapılı*** [LiChrospher 100 diol kolon (5µm,75x4.0mm)+LiChrospher 100 diol kolon (5µm,250x4.0mm)] kolonlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.5).

### 3.4.2.6. Azot gazı akış hızı etkisi

ELSD sisteminde inert gaz olarak kullanılan azot gazı akış hızının, sinyal kalitesi üzerine olan etkisinin incelendiği analizler farklı gaz akışları (1.00- 1.50- 1.75- 2.00- 2.25- 2.50 ve 3.00 SLM) için gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.5).

### 3.4.2.7. ELSD sistemi nebülizasyon ve buharlaştırma sıcaklığı etkisi

ELSD sisteminde uygulanan nebülizasyon ve buharlaştırma sıcaklıklarının, sinyal kalitesi üzerine olan etkisinin incelendiği analizler; ham ayçiçek yağı ile farklı sıcaklık değerleri (neb. sıcaklığı 70-75-80-85 ve 90°C; buh. sıcaklığı 30-35-40-45 ve 50°C) uygulanarak gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.5).

### 3.4.2.8. ELSD parametrelerinin kemometrik yöntem ile optimizasyonu

ELS dedektörüne ait sinyal kalitesinin iyileştirilmesi amacıyla, kemometrik yöntemler uygulanarak optimizasyon çalışmaları yürütülmüştür. Optimizasyon çalışmaları için 5 seviyeli/3 faktörlü deneysel tasarım çalışması oluşturulmuştur. Deneysel tasarım çalışmasında esas alınan faktör ve seviye değerleri, Çizelge 3.6'da yer almaktadır. Çizelge 3.6'dan görüleceği üzere; 5 farklı seviye değeri için, 3 deneysel parametrenin yani faktörün (*akış hızı, nebülizasyon sıcaklığı* ve *buharlaştırma sıcaklığı*) etkisi incelenmiştir. Literatürde yer alan (Brereton, 1997) bilgiler doğrultusunda hazırlanan deneysel tasarım çalışmasında; 25 farklı analiz seti yürütülmüştür. Analizlerin tamamlanmasının ardından; elde edilen veriler (cevap değeri), hazırlanan matriks ve MATLAB yazılım programına aktarılmıştır. MATLAB programında verilerin işlenmesiyle elde edilen 3B-yüzey grafikleri ile; deneysel parametrelerin etkileri değerlendirilmiştir.

**Çizelge 3. 6.** ELSD optimizasyon çalışması için hazırlanan deneysel tasarım şeması

| **5 seviye / 3 faktör** | **-2** | **-1** | **0** | **+1** | **+2** |
|---|---|---|---|---|---|
| Hareketli Faz Akış Hızı | 0.50 | 0.75 | 1.00 | 1.25 | 1.50 |
| Nebülizasyon sıcaklığı (°C) | 70 | 75 | 80 | 85 | 90 |
| Buharlaştırma sıcaklığı (°C) | 30 | 35 | 40 | 45 | 50 |

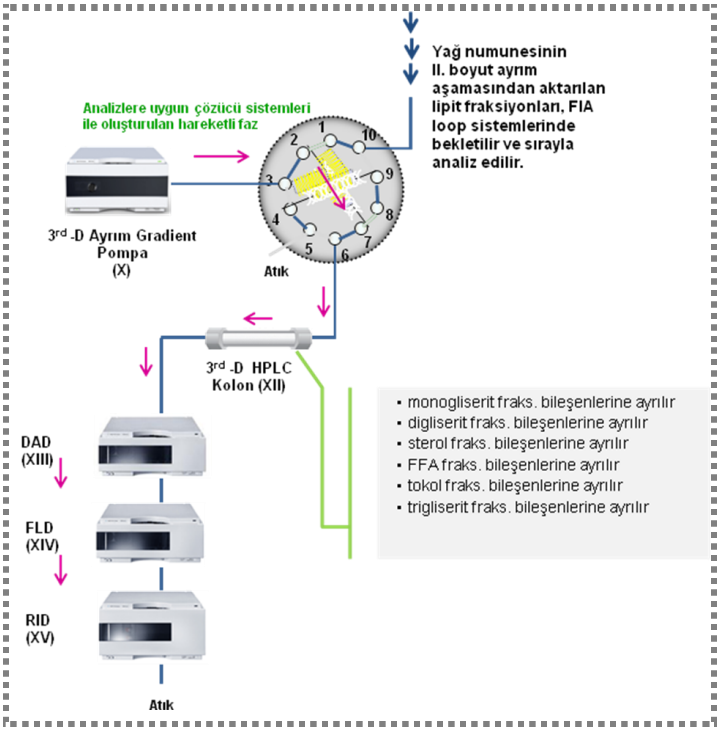
| **Deney No** | **Akış Hızı (mL/dk)** | **Neb. Sıcaklığı (°C)** | **Buh. Sıcaklığı (°C)** |
|---|---|---|---|
| **1** | **0** | **0** | **0** |
| | 1 | 80 | 40 |
| **2** | **0** | **-2** | **-2** |
| | 1 | 70 | 30 |
| **3** | **-2** | **-2** | **2** |
| | 0.5 | 70 | 50 |
| **4** | **-2** | **2** | **-1** |
| | 0.5 | 90 | 35 |
| **5** | **2** | **-1** | **2** |
| | 1.5 | 75 | 50 |
| **6** | **-1** | **2** | **0** |
| | 0.75 | 90 | 40 |
| **7** | **2** | **0** | **-1** |
| | 1.5 | 80 | 35 |
| **8** | **0** | **-1** | **-1** |
| | 1 | 75 | 35 |
| **9** | **-1** | **-1** | **1** |
| | 0.75 | 75 | 45 |
| **10** | **-1** | **1** | **2** |
| | 0.75 | 85 | 50 |
| **11** | **1** | **2** | **1** |
| | 1.25 | 90 | 45 |
| **12** | **2** | **1** | **0** |
| | 1.5 | 85 | 40 |
| **13** | **1** | **0** | **2** |
| | 1.25 | 80 | 50 |
| **14** | **0** | **2** | **2** |
| | 1 | 90 | 50 |
| **15** | **2** | **2** | **-2** |
| | 1.5 | 90 | 30 |
| **16** | **2** | **-2** | **1** |
| | 1.5 | 70 | 45 |
| **17** | **-2** | **1** | **-2** |
| | 0.5 | 85 | 30 |
| **18** | **1** | **-2** | **0** |
| | 1.25 | 70 | 40 |
| **19** | **-2** | **0** | **1** |
| | 0.5 | 80 | 45 |
| **20** | **0** | **1** | **1** |
| | 1 | 85 | 45 |
| **21** | **1** | **1** | **-1** |
| | 1.25 | 85 | 35 |
| **22** | **1** | **-1** | **-2** |
| | 1.25 | 75 | 30 |
| **23** | **-1** | **-2** | **-1** |
| | 0.75 | 70 | 35 |
| **24** | **-2** | **-1** | **0** |
| | 0.5 | 75 | 40 |
| **25** | **-1** | **0** | **-2** |
| | 0.75 | 80 | 30 |

### 3.4.2.9. Lipit standartları ile yürütülen kalibrasyon çalışmaları

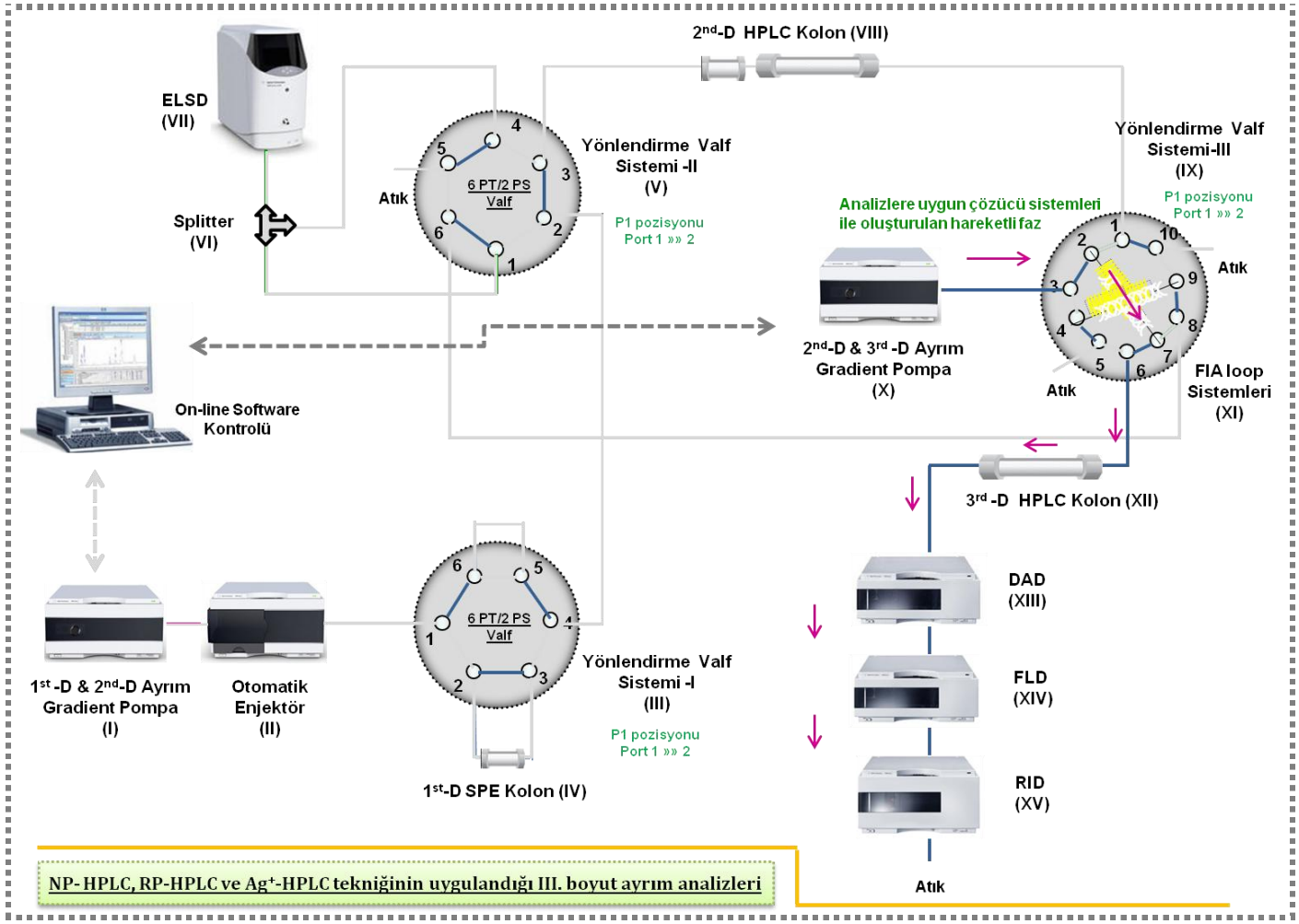
Bitkisel yağlarda mevcut lipit türlerinin kalitatif ve kantitatif tayinleri için; trigliserit kit, digliserit (1,2 diolein,1,3 diolein), monogliserit (monoolein) için 1,6 µg $\mu L^{-1}$; serbest yağ asidi (oleik asit, stearik asit) için 0,4 µg $\mu L^{-1}$; tokoferol (α-T, β-T, γ-T, δ-T), tokotrienol (α-TT, β-TT, γ-TT, δ-TT), sterol (stigma sterol) ve ester (stearyl stearate) için 1,0 µg $\mu L^{-1}$ şeklinde, hekzan içerisinde stok çözeltiler hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözeltilerden; 0,2 ila 20,0 µL arasında değişen değerlerde enjeksiyonlar gerçekleştirilerek, farklı konsantrasyonlardaki standart materyaller için kalibrasyon grafikleri oluşturulmuştur. Standart maddelere ait çalışmaların tamamlanmasının ardından, bitkisel yağ numuneleri ile konsantrasyon çalışmaları ve mevcut lipit türlerine ait kalitatif & kantitatif tayinler gerçekleştirilmiştir.

### 3.4.3. NP-HPLC, RP-HPLC ve $Ag^{+}$-HPLC tekniğinin uygulandığı III. boyut ayrım ($3^{rd}$-D) analizleri

III. boyut ayrım analizleri; $2^{nd}$-D HPLC kolonda ayrımı gerçekleştirilen lipitlerin, fraksiyonlar halinde loop sistemlerine yönlendirilmesini ve her bir fraksiyonun $3^{rd}$-D HPLC kolon üzerinde bileşenlerine ayrılarak tayin edilmelerini kapsamaktadır. Bu aşamada; $2^{nd}$-D HPLC kolonda alıkonma zamanları esas alınarak bekletme hücrelerine yönlendirilen; TG, tokol, DG, MG, sterol, ve FFA fraksiyonları, mevcut bileşenlerine ayrılmakta ve tayin edilmektedir. III. boyut ayrım uygulamalarında, belirtilen lipit türlerinin herbirisi için farklı yöntem ve sistem elemanı gerekmektedir. Bu nedenle; öncelikle NP-HPLC, RP-HPLC ve $Ag^{+}$-HPLC gibi farklı teknikler uygulanarak ayrı aşamalar halinde optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiş, daha sonrasında $1^{st}$-D ve $2^{nd}$-D ayrımlar ile birleştirilen sistem uygulamalarına geçilmiştir. III. boyut ayrım analizleri için analiz sisteminin işleyişinde izlenen akış yolları ve lipit türlerine ait ayrımın şematik gösterimi Şekil 3.7 ve 3.8'de yer almaktadır. Şekil 3.7'den görüleceği üzere; II. boyut ayrım aşamasında ayrımı gerçekleştirilen türler; alıkonma süreleri esas alınarak 10PT/2PS valf sistemi üzerinde yer alan loop sistemlerine sırasıyla yönlendirilmekte, daha sonra uygun sistem elemanları kullanılarak mevcut bileşenlerine ayrılmakta ve tayin edilmektedir.




**Şekil 3. 7.** NP-HPLC, RP-HPLC ve $Ag^{+}$-HPLC tekniğinin uygulandığı III. boyut ayrım analizleri




**Şekil 3. 8.** NP-HPLC, RP-HPLC ve Ag+-HPLC tekniğinin uygulandığı III. boyut ayrım analizleri için On-line SPE-FIA-HPLC yağ analiz sisteminin işleyişine ait şematik gösterim

### 3.4.3.1. NP-HPLC tekniğinin uygulandığı III. boyut ayrım analizleri

- **Tokol (tokoferol, -T & tokotrienol, -TT) analizi.**

NP-HPLC tekniğinin uygulandığı tokol analizlerinde; hekzanda çözülerek hazırlanan farklı yağ numuneleri ve standart maddeler kullanılarak deneyler yürütülmüştür. Farklı literatür çalışmalarında uygulanan metotlar esas alınarak deneysel parametreler optimize edilmeye çalışılmıştır. Gerçekleştirilen analizlere ait metot parametreleri Çizelge 3.7'de yer almaktadır.

**Çizelge 3. 7.** NP-HPLC tekniğinin uygulandığı III. boyut ayrım analizlerinde kullanılan deneysel parametreler

| | |
|---|---|
| **Numune ön işlemi:** | 1 g yağ numunesi 10 mL'lik kapaklı mezüre süzülerek tartılır. Hekzan ile 10 mL'ye tamamlanarak numune analize hazır hale getirilir ve HPLC sistemine enjekte edilir. |
| **Enjeksiyon miktarı:** | 2 µL |
| **Kolon:** | LiChrospher 100A° diol kolon (5µm 75x4.0mm)+ LiChrospher 100A° diol kolon (5µm 250x4.0mm) |
| **Sıcaklık:** | 15- 20- 25- 35- 40- 50°C |
| **Hareketli faz:** | Hekzan : İzopropanol (100:0- 99,2:0,8- 99,6:0,4- 99,4:0,6 v/v) |
| **Akış hızı:** | 0.75- 1.00- 1.25- 1.50 – 1.75 ve 2.00 mL/dk |
| **Dedektör:** | FLD; λex= 295 nm, λem= 330 nm |

### 3.4.3.2. RP-HPLC tekniğinin uygulandığı III. boyut ayrım analizleri

- **Trigliserit, digliserit ve monogliserit analizi.**

AOCS tarafından önerilen metot; RP-HPLC tekniği ile bitkisel sıvı yağlarda mevcut trigliserit moleküllerinin ayrılması ve molekül ağırlıkları cinsinden yada eş değer karbon sayısının fonksiyonu olarak doymamışlılıklarının kantitatif olarak tayin edilmesi amacıyla uygulanmaktadır. Standart AOCS Ce 5b-89 metoduna göre gerçekleştirilen analizlere ait metot parametreleri Çizelge 3.8'de yer almaktadır.

**Çizelge 3. 8.** RP-HPLC tekniğinin uygulandığı III. boyut ayrım analizlerinde kullanılan deneysel parametreler

| | |
|---|---|
| **Numune ön işlemi:** | 1 g yağ numunesi 10 mL'lik kapaklı mezüre süzülerek tartılır. Aseton ile 10 mL'ye tamamlanarak numune analize hazır hale getirilir ve HPLC sistemine enjekte edilir. |
| **Enjeksiyon miktarı:** | 5 µL |
| **Kolon:** | ACE C18 kolon (5µm 250 x 4.6 mm i.d.) |
| **Sıcaklık:** | 30°C |
| **Hareketli faz:** | Aseton / Asetonitril (50:50%, v/v ) |
| **Akış hızı:** | 1,5 mL/dk |
| **Dedektör:** | RI için 35°C; ELSD için N80°C E40°C |

### 3.4.3.3. $Ag^+$-HPLC tekniğinin uygulandığı III. boyut ayrım analizleri ve kemometrik yöntem ile metot optimizasyonu

- **Trigliserit analizi.**

Lipit türlerinin tayini için özel olarak geliştirilen ve kompleks oluşum mekanizması esas alınarak ayrımların gerçekleştirildiği gümüş iyon kromatografi tekniği, yağlarda mevcut TG türlerinin tayin edilmesi amacıyla kullanılmıştır. Deneysel parametrelerin optimizasyonu amacıyla; 5 seviyeli/3 faktörlü merkezi kompozit tasarım (MKT) uygulaması gerçekleştirilmiştir. $Ag^+$-HPLC tekniği ile yürütülen analizlere ait metot parametreleri Çizelge 3.9'da, deneysel tasarım çalışmasında yer alan deneysel parametreler ise Çizelge 3.10'da detaylı olarak yer almaktadır. Oluşturulan tasarımda; 5 farklı seviye değeri için, 3 önemli faktörün *hareketli faz akış hızı*, *kolon fırını sıcaklığı* ve *numune miktarı* etkisi incelenmeye çalışılmıştır.Tasarım sonucu elde edilen analiz verileri, MATLAB yazılım programı kullanılarak çizilen 3B-yüzey grafikleri ile değerlendirilmiş ve optimum parametrelere karar verilmiştir.

**Çizelge 3. 9.** $Ag^+$-HPLC tekniğinin uygulandığı III. boyut ayrım analizlerinde kullanılan deneysel parametreler

| | | |
|---|---|---|
| **Numune ön işlemi:** | 0,1 g yağ numunesi, hekzan ile 10 mL'ye tamamlanır. | |
| **Enjeksiyon miktarı:** | 5 µL | |
| **Kolon:** | ChromSpher 5 Lipids 5µm 250 x 4.6 mm kolon | |
| **Hareketli faz:** | **(A)** Hekzan; **(B)** Hekzan : İzopropanol : ACN (75: 22,5: 2,5%, v/v/v) | |
| **Gradient Program:** | **(A)** | **(B)** |
| 0.dk | %100 | %0 |
| 10.dk | %100 | %0 |
| 32.dk | %82 | %18 |
| 37.dk | %65 | %35 |
| 38.dk | %0 | %100 |
| 39.dk | %0 | %100 |
| 41.dk | %100 | %0 |
| **Akış hızı:** | 1 mL/dk | |
| **Dedektör:** | RI, 35°C; ELSD, N80°C E40°C | |

**Çizelge 3. 10.** $Ag^{+}$-HPLC tekniğinin uygulandığı III. boyut ayrım analizleri optimizasyon çalışmaları için merkezi kompozit deneysel tasarım şeması

| **MKT /// 5 seviye / 3 faktör** | **-1,68** | **-1** | **0** | **+1** | **+1,68** |
|---|---|---|---|---|---|
| Hareketli Faz Akış Hızı (mL/dk) | 0,58 | 0,75 | 1,00 | 1,25 | 1,42 |
| Kolon Sıcaklığı (°C) | 16,6 | 20,0 | 25,0 | 30,0 | 33,4 |
| Konsantrasyon (mg/5µL) | $0{,}8.10^{-2}$ | $2{,}5.10^{-2}$ | $5{,}0.10^{-2}$ | $7{,}5.10^{-2}$ | $9{,}2.10^{-2}$ |

| **Deney No** | **Akış Hızı (mL/dk)** | **Kolon Sıcaklığı (°C)** | **Konsantrasyon (mg/5µL)** |
|---|---|---|---|
| **1** | **-1**<br>0.75 | **-1**<br>20 | **-1**<br>$2{,}5.10^{-2}$ |
| **2** | **1**<br>1.25 | **-1**<br>20 | **-1**<br>$2{,}5.10^{-2}$ |
| **3** | **-1**<br>0.75 | **1**<br>30 | **-1**<br>$2{,}5.10^{-2}$ |
| **4** | **1**<br>1.25 | **1**<br>30 | **-1**<br>$2{,}5.10^{-2}$ |
| **5** | **-1**<br>0.75 | **-1**<br>20 | **1**<br>$7{,}5.10^{-2}$ |
| **6** | **1**<br>1.25 | **-1**<br>20 | **1**<br>$7{,}5.10^{-2}$ |
| **7** | **-1**<br>0.75 | **1**<br>30 | **1**<br>$7{,}5.10^{-2}$ |
| **8** | **1**<br>1.25 | **1**<br>30 | **1**<br>$7{,}5.10^{-2}$ |
| **9** | **0**<br>1 | **0**<br>25 | **0**<br>$5.10^{-2}$ |
| **10** | **-1,68**<br>0.58 | **0**<br>25 | **0**<br>$5.10^{-2}$ |
| **11** | **1,68**<br>1.42 | **0**<br>25 | **0**<br>$5.10^{-2}$ |
| **12** | **0**<br>1 | **-1,68**<br>16,6 | **0**<br>$5.10^{-2}$ |
| **13** | **0**<br>1 | **1,68**<br>33,4 | **0**<br>$5.10^{-2}$ |
| **14** | **0**<br>1 | **0**<br>25 | **-1,68**<br>$0{,}8.10^{-2}$ |
| **15** | **0**<br>1 | **0**<br>25 | **1,68**<br>$9{,}2.10^{-2}$ |
| **16** | **0**<br>1 | **0**<br>25 | **0**<br>$5.10^{-2}$ |
| **17** | **0**<br>1 | **0**<br>25 | **0**<br>$5.10^{-2}$ |
| **18** | **0**<br>1 | **0**<br>25 | **0**<br>$5.10^{-2}$ |
| **19** | **0**<br>1 | **0**<br>25 | **0**<br>$5.10^{-2}$ |
| **20** | **0**<br>1 | **0**<br>25 | **0**<br>$5.10^{-2}$ |
| **21** | **0**<br>1 | **0**<br>25 | **0**<br>$5.10^{-2}$ |
| **22** | **0**<br>1 | **0**<br>25 | **0**<br>$5.10^{-2}$ |
| **23** | **0**<br>1 | **0**<br>25 | **0**<br>$5.10^{-2}$ |

### 3.4.4. SPE ve NP-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı I. ve II. boyut ayrım ($1^{st}$-D & $2^{nd}$-D) analizleri

On-line SPE-FIA-HPLC birleştirilmiş yağ analiz sisteminin tamamen işler hale gelebilmesi için; öncelikle her bir ayrım aşamasına ait önemli deneysel parametreler optimize edilmiştir. Deneysel çalışmalar aşamalar halinde uygulanırken, sistem üzerinde her aşamaya özgü farklı akış yolları ve metot parametreleri belirlenmiş, ardından sırasıyla;

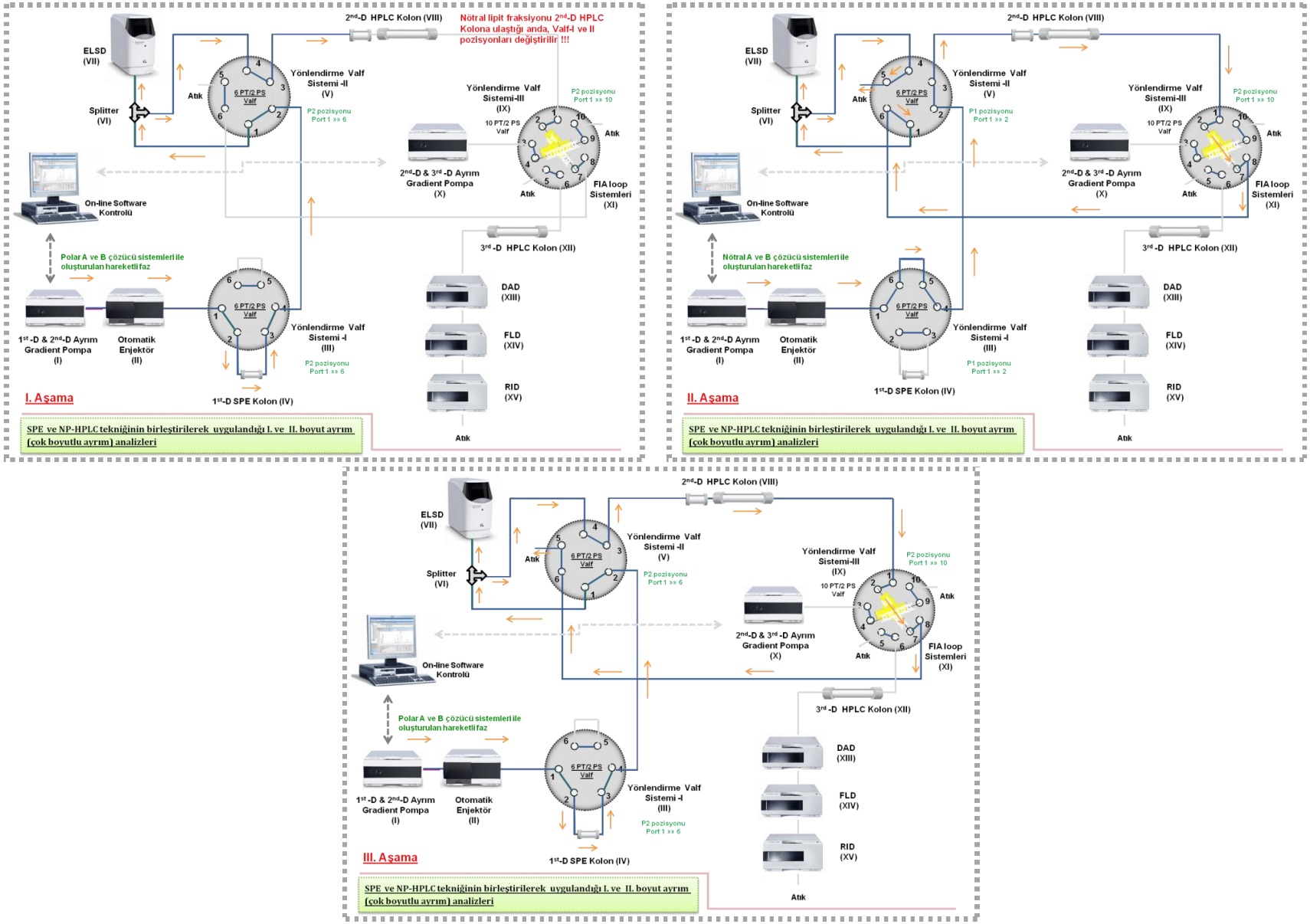
- *SPE ve NP-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı I. ve II. boyut ayrım ($1^{st}$-D & $2^{nd}$-D) analizleri*
- *NP-HPLC, FIA ve $Ag^{+}$-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı II. ve III. boyut ayrım ($2^{nd}$-D & $3^{rd}$-D) analizleri* ve
- *SPE, NP-HPLC, FIA ve $Ag^{+}$-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı I., II. ve III. boyut ayrım ($1^{st}$-D & $2^{nd}$-D & $3^{rd}$-D) analizleri*

  şeklindeki uygulamalar ile birleştirilmiş sistem uygulamalarına geçilmiştir.

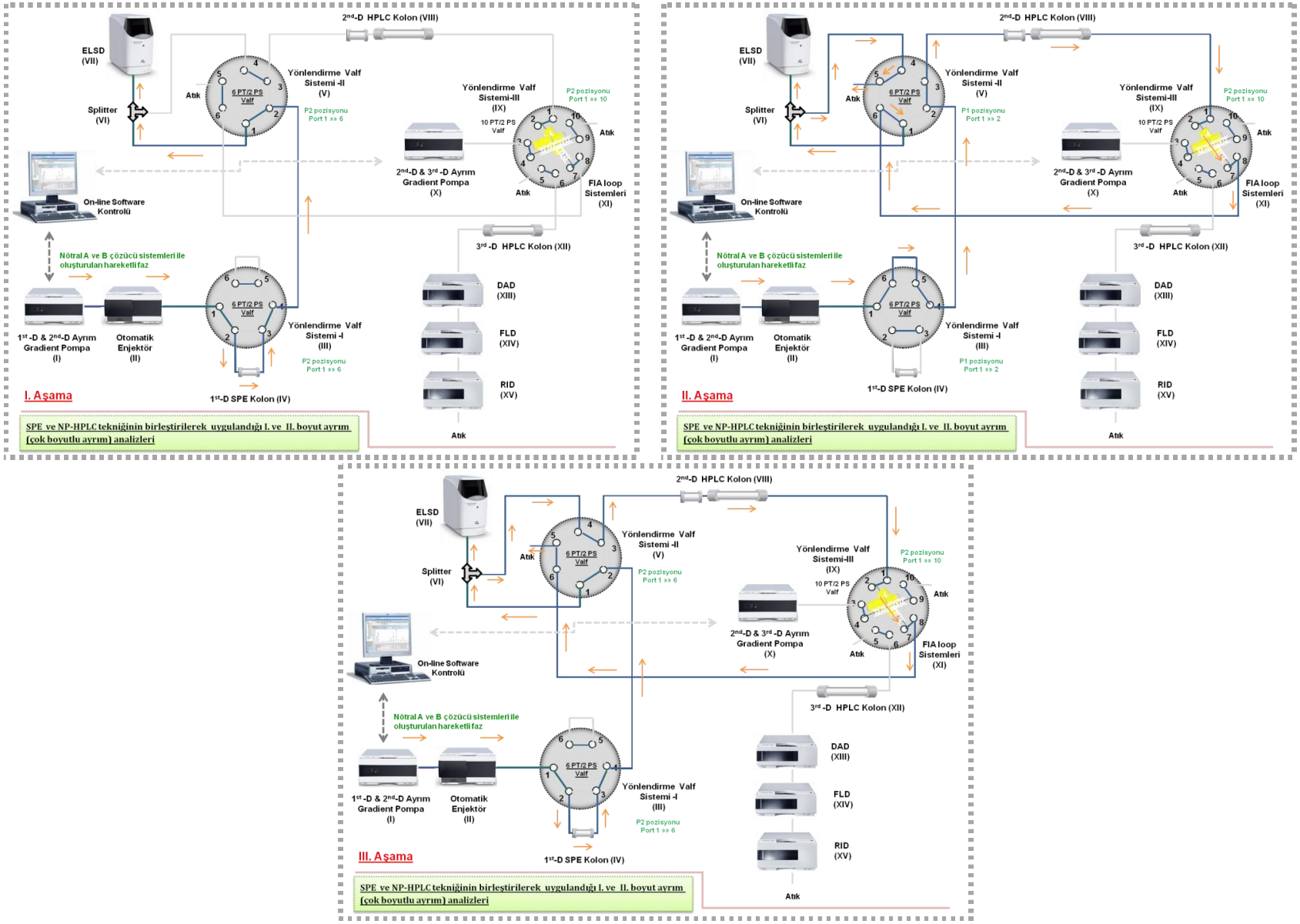
SPE ve NP-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı I. ve II. boyut ayrım analizleri; kullanılan softwarede yapılan özel bir programlama yardımıyla tek bir metot şeklinde yürütülmüştür. Oluşturulan program; I. boyut ayrım aşamasında toplu bir pik halinde ayrılan nötral lipit fraksiyonun önce $2^{nd}$-D HPLC kolona yönlendirilmesini, daha sonra bu fraksiyonun, içerisindeki mevcut lipit türlerine (*trigliserit, tokol, FFA, sterol, digliserit* ve *monogliserit)* fraksiyonlar halinde ayrılarak tayin edilmesini kapsamaktadır. Bu aşama için sistem işleyişine ait şematik gösterim Şekil 3.9 ve 3.10'da, uygulanan metot parametreleri & valf programlaması ise Çizelge 3.11'de detaylı olarak yer almaktadır.

Analizler için optimize edilen başlıca deneysel parametreler;

- Numune çözücü sistemi
- Akış hızı
- Valf sistemi pozisyonlarının değiştirilme sürelerine ilişkin programlama
- Azot gazı akış hızı
- Sabit ve harekeli faz türü şeklindedir.




**Şekil 3. 9.** SPE ve NP-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı I. ve II. boyut ayrım analizleri için On-line SPE-FIA-HPLC yağ analiz sisteminin işleyişine ait şematik gösterim



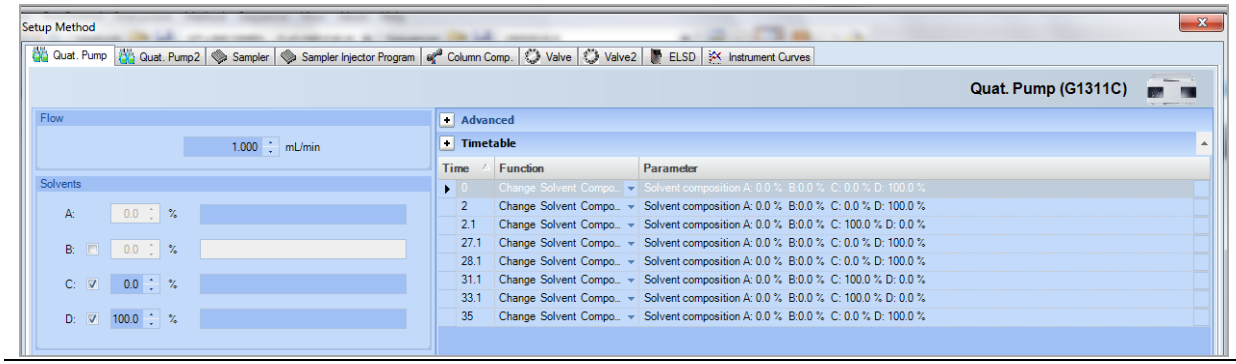

**Şekil 3. 10.** SPE ve NP-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı I. ve II. boyut ayrım analizleri için On-line SPE-FIA-HPLC yağ analiz sisteminin işleyişine ait şematik gösterim

**Çizelge 3. 11.** SPE ve NP-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı I. ve II. boyut ayrım (çok boyutlu ayrım) analizleri için kullanılan deneysel parametreler

**SPE ve NP-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı I. ve II. boyut ayrım (çok boyutlu ayrım) analizlerinde kullanılan deneysel parametreler**

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| **NUMUNE** | **Türü** | Bitkisel yağ numuneleri ve lipit standart maddeler | | |
| | **Miktarı** | 0.1 mg yağ/µL çözücü, farklı konsantrasyonlarda standart numuneler | | |
| | **Enjeksiyon** | Otomatik enjeksiyon, 5 µL | | |
| | **Çözücü türü** | Hekzan | | |
| **SABİT FAZ** | **Türü** | **1st-D SPE kolon;** Diol Kolon & Silika Kolon<br>**2nd-D HPLC kolon;** Diol Kolon & Silika Kolon | | |
| | **Özelliği** | **1st-D SPE kolon;** Inertsil Sil 100A kolon (5µm 50x4.6mm) veya LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.0mm)<br>**2nd-D HPLC kolon;** Inertsil Sil 100A kolon (5µm 250x4.6mm) veya<br>LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.0mm) + LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 250x4.0mm) | | |
| **HAREKETLİ FAZ** | **Çözücü sistemleri** | **Nötral lipid hareketli faz A:** | Hekzan: asetik asit (99:1.0, v/v/v) | |
| | | **Nötral lipid hareketli faz B:** | Hekzan: izopropanol: asetik asit (84:15:1.0, v/v/v) | |
| | ***Nötral A ve B çözücü sistemleri ile oluşturulan gradient program*** | | **Nötral A** | **Nötral B** |
| | | **1. pompa 0. dk** | % 100 | % 0 |
| | | **1. pompa 25. dk** | % 0 | % 100 |
| | | **1. pompa 26. dk** | % 0 | % 100 |
| | | **1. pompa 29. dk** | % 100 | % 0 |
| | | **1. pompa 31. dk** | % 100 | % 0 |
| | | **AKIŞ HIZI;** 1 mL/dk | | |
| | **Kolon Fırını Sıcaklık** | 40 °C | | |
| | **Valf Sistemi Pozisyonu** | **Valf -1 (6 PT/2 PS Valf)** | **Valf -2 (6 PT/2 PS Valf)** | **Valf -3 (10 PT/2 PS Valf)** |
| | | P2 | P2 | P2 |
| | | P1 | P1 | P2 |
| **ELSD** | **Buharlaştırma sıcaklığı** | 40°C | | |
| | **Nebülizasyon sıcaklığı** | 80 °C | | |
| | **Gaz akışı** | 1.5 & 2 SLM | | |

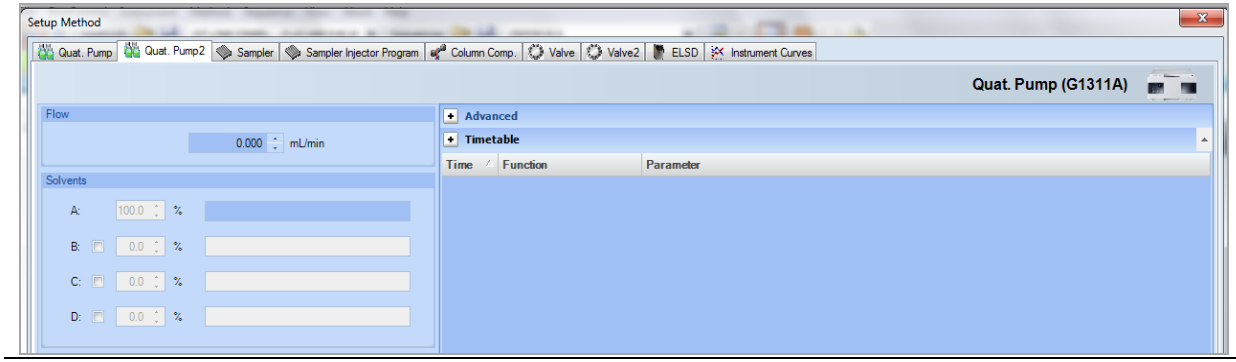
**SPE ve NP-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı I. ve II. boyut ayrım (çok boyutlu ayrım) analizleri için tespit edilen optimum metot programlaması**






**I. gradient pompaya ait programlama**

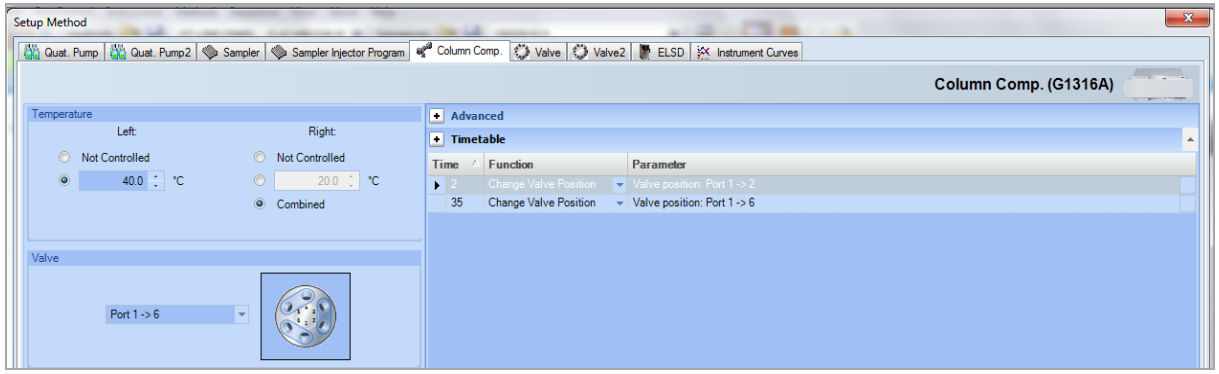
- 0. dk- 2. dk →→→ SPE tekniğinin uygulandığı I. boyut ayrım aşaması
- 2,1. dk- 35. dk →→→ NP-HPLC tekniğinin uygulandığı II. boyut ayrım aşaması






**II. gradient pompaya ait programlama**

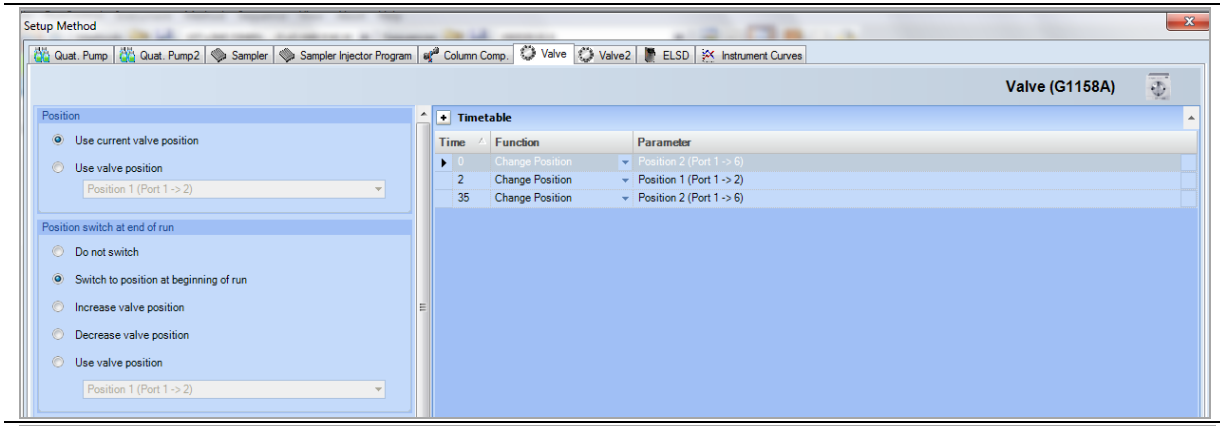
- 0. dk- 35. dk →→→ Aktif değil






**Valf sistemi- I (6PT/2PS) e ait programlama**

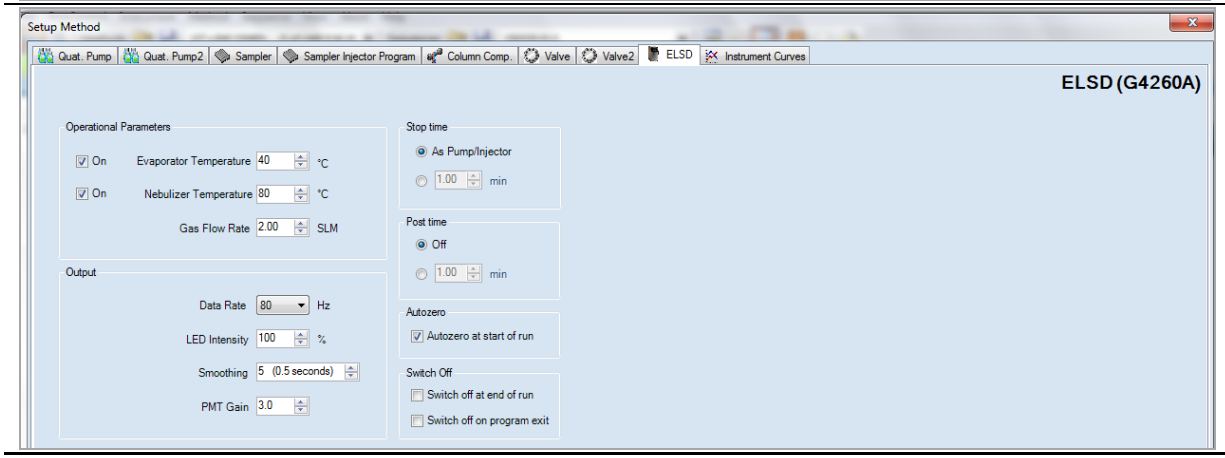
- 2. dk →→→ SPE tekniğinin uygulandığı I. boyut ayrım aşamasından NP-HPLC tekniğinin uygulandığı II. boyut ayrım aşamasına geçiş
- 35. dk →→→ NP-HPLC tekniğinin uygulandığı II. boyut ayrım aşamasından SPE tekniğinin uygulandığı I. boyut ayrım basamağına geçiş






**Valf sistemi- II (6PT/2PS) e ait programlama**

- 2. dk →→→ SPE tekniğinin uygulandığı I. boyut ayrım aşamasından NP-HPLC tekniğinin uygulandığı II. boyut ayrım aşamasına geçiş
- 35. dk →→→ NP-HPLC tekniğinin uygulandığı II. boyut ayrım aşamasından SPE tekniğinin uygulandığı I. boyut ayrım basamağına geçiş






**ELSD e ait programlama**

### 3.4.4.1. Numune çözücü türü etkisi

Numune çözücü sistemi etkisinin incelendiği çalışmalarda; **polar lipid çözücü sistemi** [*hekzan: izopropanol: asetik asit (50:50:1.0, v/v/v)+0.08% trimetilamin*], **nötral lipid çözücü sistemi** [*hekzan: asetik asit (99:1.0, v/v)*], **izopropanol** ve **hekzan** gibi farklı çözücüler ile hazırlanan yağ numuneleri kullanılmış ve elde edilen veriler karşılaştırılmıştır (Çizelge 3.11).

### 3.4.4.2. Akış hızı etkisi

Akış hızı etkisinin incelendiği çalışmalarda; sabit faz olarak diol ve silika yapılı $1^{st}$-D SPE ve $2^{nd}$-D HPLC kolonlar kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir. Nötral çözücü sisteminde ve hekzanda hazırlanan yağ numuneleri kullanılarak, otomatik enjeksiyon sistemi ile farklı akışlarda (0.50- 1.00- 1.25- 1.50- 2.00 ve 2.50 mL/dk) analizler gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.11).

### 3.4.4.3. Valf pozisyonlarının değiştirilme süresinin etkisi

Şekil. 3.10'da yer alan analiz sisteminde, valf-I ve valf-II sistemi pozisyonlarına ait değiştirilme sürelerine ilişkin optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Hekzan çözücü sisteminde hazırlanan yağ numuneleri kullanılarak, farklı sürelerde (2.0- 2.3- 2.5 ve 2.6 dk) valf pozisyonları değiştirilerek analizler gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.11).

### 3.4.4.4. Azot gazı akış hızı etkisi

ELSD sisteminde sisleştirme (nebülizasyon) gazı olarak kullanılan azot gazı akış hızının sinyaller üzerine olan etkisinin incelendiği analizler; ham ayçiçek yağı kullanılarak farklı gaz akışları (1.00- 1.50- 1.75- 2.00 ve 2.50 SLM) ile gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.11).

### 3.4.4.5. Sabit ve hareketli faz türü etkisi

Sabit ve hareketli faz türlerinin etkisinin incelendiği analizlerde; silika ve diol yapılı sabit fazlar esas alınarak hareketli faz türü etkisi I. ve II. boyut ayrım aşamaları için detaylı olarak incelenmiştir (Çizelge 3.11 ve 3.12). Hareketli faz sistemi olarak; %100 nötral A [*hekzan: asetik asit (99:1.0, v/v/v)*], %100 nötral B [*hekzan: izopropanol: asetik asit (84:15:1.0, v/v/v)*] ve nötral lipit gradient program uygulanmıştır.

**Çizelge 3. 12.** SPE ve NP-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı I. ve II. boyut ayrım analizleri için hareketli ve sabit faz etkisine ait deneysel parametreler

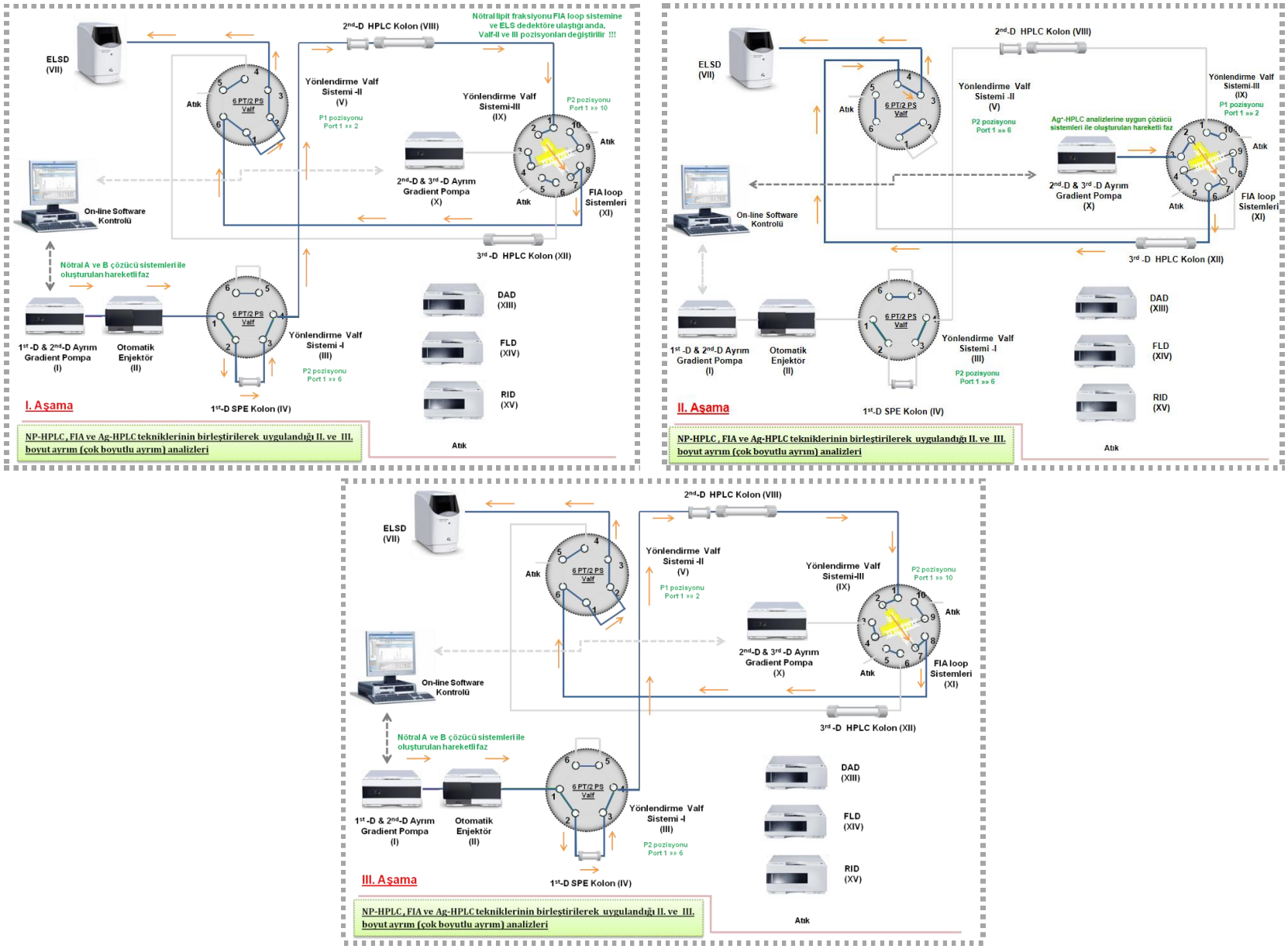
| | **1st-D SPE Kolon / I. boyut ayrım** | **2nd-D HPLC Kolon / II. boyut ayrım** |
|---|---|---|
| ▪ **SPE tekniğinin uygulandığı I. boyut ayrım analizleri** | **Sabit faz: Silika kolon**<br>**Hareketli faz:**<br>Nötral lipit gradient program (Nötral A ve B)<br>%100 Nötral A<br>%100 Nötral B | - |
| | **Sabit faz: Diol kolon**<br>**Hareketli faz:**<br>Nötral lipit gradient program (Nötral A ve B)<br>%100 Nötral A<br>%100 Nötral B | - |
| ▪ **NP-HPLC tekniğinin uygulandığı II. boyut ayrım analizleri** | - | **Sabit faz: Silika kolon**<br>**Hareketli faz:**<br>Nötral lipit gradient program (Nötral A ve B) |
| | - | **Sabit faz: Diol kolon**<br>**Hareketli faz:**<br>Nötral lipit gradient program (Nötral A ve B) |
| ▪ **SPE ve NP-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı I. ve II. boyut ayrım analizleri** | **Sabit faz: Silika kolon**<br>**Hareketli faz:**<br>Nötral lipit gradient program (Nötral A ve B) | **Sabit faz: Silika kolon**<br>**Hareketli faz:**<br>Nötral lipit gradient program (Nötral A ve B) |
| | **Sabit faz: Diol kolon**<br>**Hareketli faz:**<br>Nötral lipit gradient program (Nötral A ve B) | **Sabit faz: Diol kolon**<br>**Hareketli faz:**<br>Nötral lipit gradient program (Nötral A ve B) |
| | **Sabit faz: Silika kolon**<br>**Hareketli faz:**<br>Nötral lipit gradient program (Nötral A ve B) | **Sabit faz: Diol kolon**<br>**Hareketli faz:**<br>Nötral lipit gradient program (Nötral A ve B) |

### 3.4.5. NP-HPLC, FIA ve $Ag^{+}$-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı II. ve III. boyut ayrım ($2^{nd}$-D & $3^{rd}$-D) analizleri

NP-HPLC, FIA ve $Ag^{+}$-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı analizlerde; öncelikle $2^{nd}$-D HPLC kolonda ayrılan nötral lipit türlerinin (*trigliserit, tokol, FFA, sterol, digliserit* ve *monogliserit*) alıkonma süreleri dikkate alınarak, valf-III (10PT/2PS) üzerine adapte edilen FIA loop sistemlerine sırayla yönlendirilmesi ve fraksiyonlar halinde toplanması sağlanır. Loop sistemlerine fraksiyonların toplanmaya başlaması ile birlikte; valf-III (10PT/2PS) pozisyonu değiştirilir, I. pompa durdurulur ve II. pompanın işler hale gelmesi sağlanır. Bu aşama ile birlikte; III. boyut ayrım aşaması başlatılmış olur. Loop sistemlerinde toplanan nötral lipit fraksiyonlarının kendi türlerine ayrımını sağlayacak uygun hareketli faz sistemleri, II. gradient pompa ile sisteme gönderilir. Toplanan fraksiyonların, akış içerisine direk enjeksiyonu, FIA şeklinde gerçekleştirilen III. boyut analizlerinde; analiz edilecek türlere uygun seçilen $3^{rd}$-D HPLC kolonu, ELSD, DAD, FLD yada RID sistemi devreye konulmaktadır (Şekil 3.11).

NP-HPLC, FIA ve RP-HPLC yada NP-HPLC, FIA ve $Ag^{+}$-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı II. ve III. boyut ayrım ($2^{nd}$-D & $3^{rd}$-D) analizlerde; uygulanan metot parametreleri & programlama Çizelge 3.13 ve 3.14'de detaylı olarak yer almaktadır. Analizler için, optimize edilen başlıca deneysel parametreler;

- Sabit faz türü
- Harekeli faz türü
- Akış hızı
- Sıcaklık
- Valf pozisyonlarının değiştirilme sürelerine ilişkin programlama şeklindedir.




**Şekil 3. 11.** NP-HPLC, FIA ve $Ag^{+}$-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı II. ve III. boyut ayrım analizleri için On-line SPE-FIA-HPLC yağ analiz sisteminin işleyişine ait şematik gösterim

**Çizelge 3. 13.** NP-HPLC, FIA ve RP-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı II. ve III. boyut ayrım (çok boyutlu ayrım) analizleri için kullanılan parametreler

**NP-HPLC, FIA ve RP-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı II. ve III. boyut ayrım (çok boyutlu ayrım) analizleri için kullanılan parametreler**

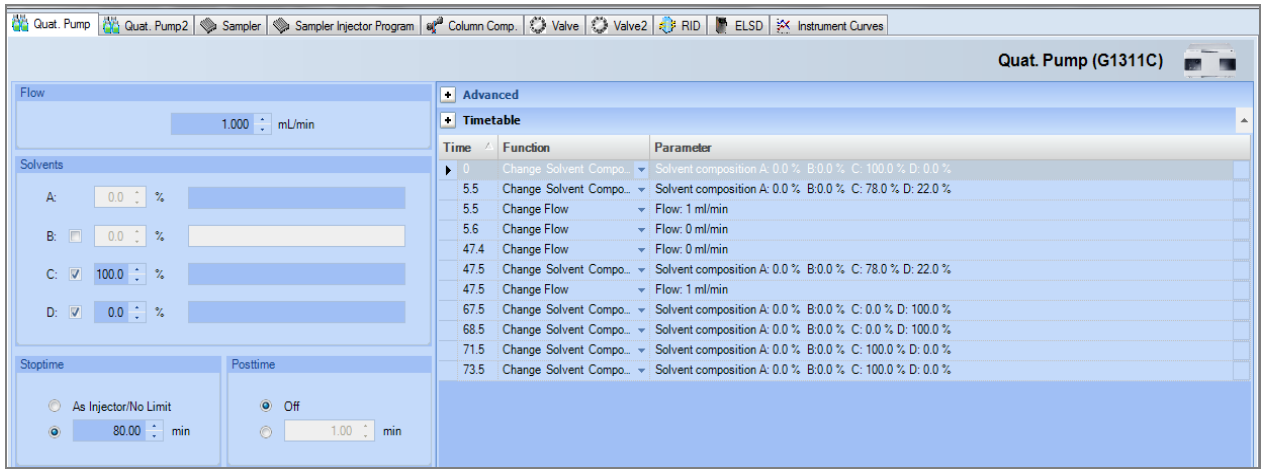
| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **NUMUNE** | **Türü** | Bitkisel yağ numuneleri ve lipit standart maddeleri | | | |
| | **Miktarı** | 0.1 mg yağ/ µL çözücü, farklı konsantrasyonlardaki standart maddeler | | | |
| | **Enjeksiyon** | Otomatik enjeksiyon, 5 µL | | | |
| | **Çözücü türü** | Hekzan | | | |
| **SABİT FAZ** | **Türü ve Özelliği** | **SPE kolon**; Inertsil Sil 100A kolon (5µm 50x4.6mm) | | | |
| | | **2nd-D HPLC kolon**; LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.0mm)+ LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 250x4.0mm) | | | |
| | | **3rd-D HPLC kolon**; ACE C18 kolon (5µm 250x4.6mm) | | | |
| **HAREKETLİ FAZ** | **Çözücü sistemi** (HPLC saflıkta) | **Nötral lipid hareketli faz A:** | Hekzan: asetik asit (99:1.0, v/v/v) | | |
| | | **Nötral lipid hareketli faz B:** | Hekzan: izopropanol: asetik asit (84:15:1.0, v/v/v) | | |
| | | **3rd-D ayrım aşaması için:** | Trigliserit analizi için seçilen çözücü sistemi; Aseton: Asetonitril (50:50, v/v) | | |
| | **1. ve 2. HPLC pompanın birlikte kullanılmasıyla uygulanan gradient program**<br>****** Valf pozisyonlarının değiştirilme süresi 7. dakika esas alınarak oluşturulan programlama*** | | **Nötral A** | **Nötral B** | **Aseton:ACN, (50:50, v/v)** |
| | | **1.pompa 0. dk** | % 100 | % 0 | %0 |
| | | **1.pompa 7. dk** | % 72 | % 28 | %0 |
| | | **I. HPLC pompa durdurulur, II. HPLC pompa ve Refraktif indeks dedektör (RID) devreye konulur.** | | | |
| | | **2.pompa 7.1 dk** | %0 | %0 | %100 |
| | | **2.pompa 37.1 dk** | %0 | %0 | %100 |
| | | **II. HPLC pompa durdurulur, I. HPLC pompa ve ELSD dedektör devreye konulur.** | | | |
| | | **1.pompa 38.dk** | %100 | %0 | %0 |
| | | **1.pompa 63.dk** | %0 | %100 | %0 |
| | | **1.pompa 64. dk** | %0 | %100 | %0 |
| | | **1.pompa 67 dk** | %100 | %0 | %0 |
| | | **1.pompa 69. dk** | %100 | %0 | %0 |
| | | **AKIŞ HIZI:** 1 mL/dk | | | |
| | **Kolon Fırını Sıcaklık** | 40°C | | | |
| | **Valf Sistemi Pozisyonu** | **Süre** | **Valf -1 (6 PT/2 PS Valf)** | **Valf -2 (6 PT/2 PS Valf)** | **Valf -3 (10 PT/2 PS Valf)** |
| | | 0 - 7 dk arası | P1 | P1 | P2 |
| | | 7.1 - 38 dk arası | P1 | P1 | P1 |
| | | 39 -69 dk arası | P1 | P1 | P2 |
| **ELSD ve RID** | **Buharlaştırma sıcaklığı** | 40°C | | | |
| | **Nebülizasyon sıcaklığı** | 80°C | | | |
| | **Gaz akışı** | 1.5 SLM; **Sıcaklık** 35°C | | | |

**Çizelge 3. 14.** NP-HPLC, FIA ve $Ag^+$-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı II. ve III. boyut ayrım (çok boyutlu ayrım) analizleri için kullanılan parametreler

**NP-HPLC, FIA ve $Ag^+$-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı II. ve III. boyut ayrım (çok boyutlu ayrım) analizleri için kullanılan parametreler**

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **NUMUNE** | **Türü** | Bitkisel yağ numuneleri ve lipit standart maddeleri | | | | |
| | **Miktarı** | 0.1 mg yağ/ µL çözücü, farklı konsantrasyonlardaki standart maddeler | | | | |
| | **Enjeksiyon** | Otomatik enjeksiyon, 5 µL | | | | |
| | **Çözücü türü** | Hekzan | | | | |
| **SABİT FAZ** | **Türü ve Özelliği** | **SPE kolon;** Inertsil Sil 100A kolon (5µm 50x4.6mm) | | | | |
| | | **2nd-D HPLC kolon;** LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.0mm) + LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 250x4.0mm) | | | | |
| | | **3rd-D HPLC kolon;** ChromSpher 5 Lipids kolon (5µm 250x4.6mm kolon) | | | | |
| **HAREKETLİ FAZ** | **Çözücü sistemi (HPLC saflıkta)** | **Nötral lipid hareketli faz A:** | Hekzan: asetik asit (99:1.0, v/v/v) | | | |
| | | **Nötral lipid hareketli faz B:** | Hekzan: izopropanol: asetik asit (84:15:1.0, v/v/v) | | | |
| | | **3rd-D ayrım aşaması için:** | TG analizi için seçilen çözücü sistemi; Hekzan (A), Hekzan:İzop:ACN, (75: 22.5: 2.5, v/v/v) | | | |
| | **1. ve 2. HPLC pompanın birlikte kullanılmasıyla uygulanan gradient program** | | **Nötral A** | **Nötral B** | **Hekzan (A)** | **Hekzan:İzop:ACN (B)** |
| | | **1.pompa 0. dk** | % 100 | % 0 | %0 | %0 |
| | | **1.pompa 5.5. dk** | % 78 | % 22 | %0 | %0 |
| | | **I. HPLC pompa durdurulur, II. HPLC pompa devreye konulur.** | | | | |
| | | **2.pompa 5.6 dk** | %0 | %0 | %100 | %0 |
| | | **2.pompa 15.6 dk** | %0 | %0 | %100 | %0 |
| | | **2.pompa 37.6 dk** | %0 | %0 | %82 | %18 |
| | | **2.pompa 42.6 dk** | %0 | %0 | %65 | %35 |
| | | **2.pompa 45.6 dk** | %0 | %0 | %0 | %100 |
| | | **2.pompa 46.6 dk** | %0 | %0 | %0 | %100 |
| | *** ***Valf pozisyonlarının değiştirilme süresi 5,5 dakika esas alınarak oluşturulan programlama*** | **2.pompa 47.5 dk** | %0 | %0 | %100 | %0 |
| | | **II. HPLC pompa durdurulur, I. HPLC pompa devreye konulur.** | | | | |
| | | **1.pompa 47.5.dk** | %78 | %22 | %0 | %0 |
| | | **1.pompa 67.5.dk** | %0 | %100 | %0 | %0 |
| | | **1.pompa 68.5. dk** | %0 | %100 | %0 | %0 |
| | | **1.pompa 71.5 dk** | %100 | %0 | %0 | %0 |
| | | **1.pompa 73.5. dk** | %100 | %0 | %0 | %0 |
| | **Akış Hızı:** 1 mL/dk | | | | | |
| | **Kolon Fırını Sıcaklık** | 40°C | | | | |
| | **Valf Sistemi Pozisyonu** | **Süre** | | **Valf -I (6 PT/2 PS Valf)** | **Valf -II (6 PT/2 PS Valf)** | **Valf -III (10 PT/2 PS Valf)** |
| | | 0 - 5.5 dk arası | | P1 | P2 | P1 |
| | | 5.6 - 47.5 dk arası | | P1 | P1 | P2 |
| | | 47.5 – 73.5 dk arası | | P1 | P2 | P1 |
| **ELSD** | **Buharlaştırma sıcaklığı** | 40°C | **Nebülizasyon sıcaklığı** | 80°C | | |
| | **Gaz akışı** | 1.5 SLM | | | | |

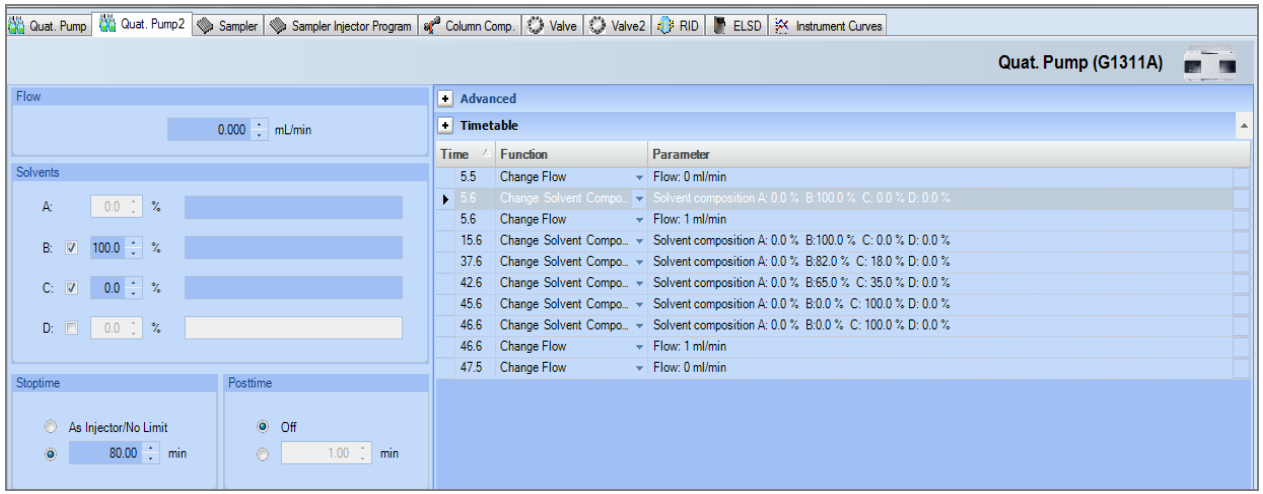
**NP-HPLC, FIA ve $Ag^{+}$-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı II. ve III. boyut ayrım analizleri için tespit edilen optimum metot programlaması**






**I. gradient pompaya ait programlama**

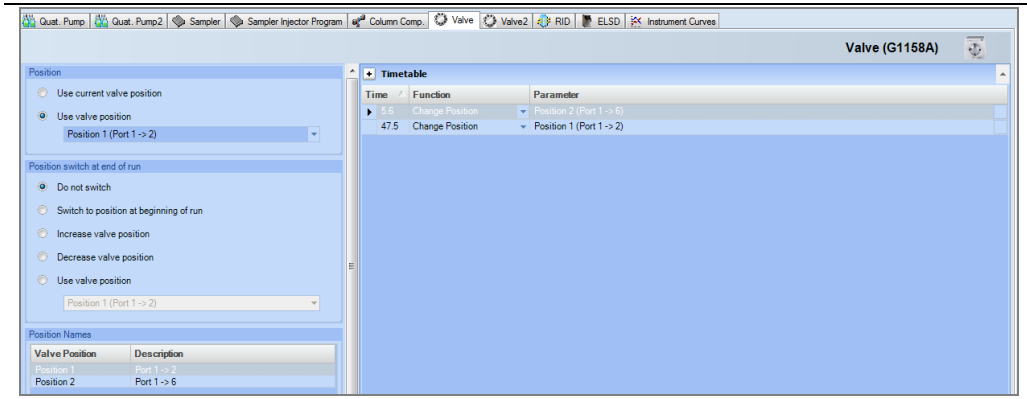
- 0. dk- 5,5. dk →→→ NP-HPLC tekniğinin uygulandığı II. boyut ayrım aşaması
- 5,6 dk- 47,5. dk →→→ Aktif değil
- 47,5. dk- 73,5. dk →→→ NP-HPLC tekniğinin uygulandığı II. boyut ayrım aşamasında kalan türlerin tayin basamağı






**II. gradient pompaya ait programlama**

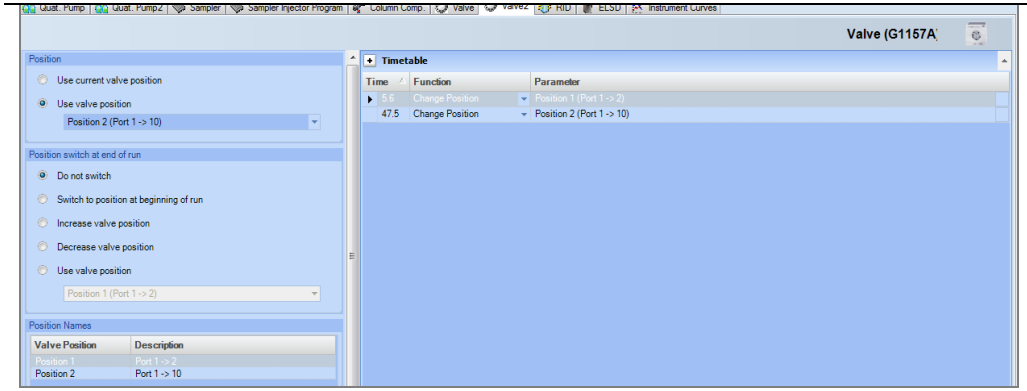
- 0. dk- 5,5. dk →→→ Aktif değil
- 5,6. dk- 47,5. dk →→→ $Ag^{+}$-HPLC tekniğinin uygulandığı III. boyut ayrım basamağı
- 47,5. dk- 73,5. dk →→→ Aktif değil






**Valf sistemi- II (6PT/2PS) e ait programlama**

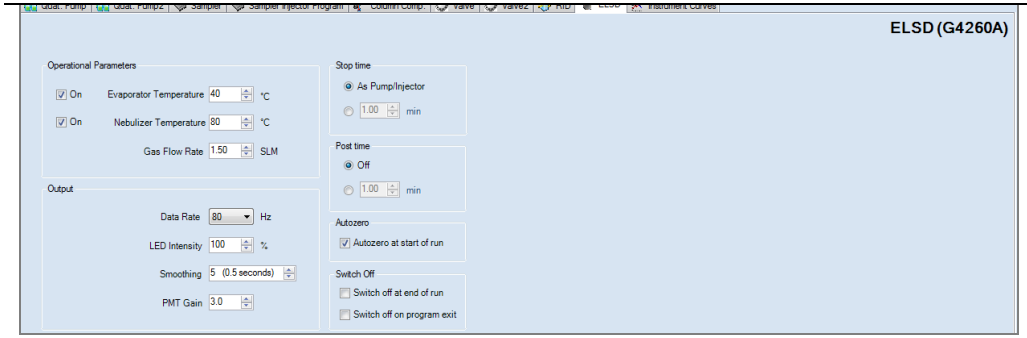
- 5,6. dk →→→ NP-HPLC tekniğinin uygulandığı II. boyut ayrım aşamasından $Ag^{+}$-HPLC tekniğinin uygulandığı III. boyut ayrım aşamasına geçiş
- 47,5. dk →→→ NP-HPLC tekniğinin uygulandığı II. boyut ayrım aşamasında kalan türlerin tayin basamağına geçiş






**Valf sistemi- III (10PT/2PS) e ait programlama**

- 5,6. dk →→→ NP-HPLC tekniğinin uygulandığı II. boyut ayrım aşamasından $Ag^{+}$-HPLC tekniğinin uygulandığı III. boyut ayrım aşamasına geçiş
- 47,5. dk →→→ NP-HPLC tekniğinin uygulandığı II. boyut ayrım aşamasında kalan türlerin tayin basamağına geçiş






**ELSD e ait programlama**

### 3.4.5.1. Sabit ve hareketli faz türü etkisi

Sabit faz yapısının etkisinin incelendiği birleştirilmiş II. ve III. boyut ayrım analizi uygulamalarında; 3rd-D HPLC kolonu olarak ***ACE C18 kolon*** *(5µm 250x4.6mm)* ve ***ChromSpher 5 Lipids kolon*** *(5µm 250x4.6mm)* kullanılarak etkileri incelenmiştir. Hareketli faz yapısının etkisinin incelendiği II. ve III. boyut birleştirilmiş ayrım analizi uygulamalarında ise; ACE C18 kolon (5µm, 250x4.6mm) kullanıldığında *Aseton:ACN (50:50, v/v)* hareketli faz sistemi; ChromSpher 5 Lipids kolon (5µm, 250x4.6mm) kullanıldığında *Hekzan (A), Hekzan:İzopropanol:ACN, (75: 22.5: 2.5, v/v/v) (B) gradient programı* ile analizler yürütülmüştür. Kullanılan sabit ve hareketli fazların, ayrımlar üzerine olan etkileri incelenmiştir (Çizelge 3.13 ve 3.14).

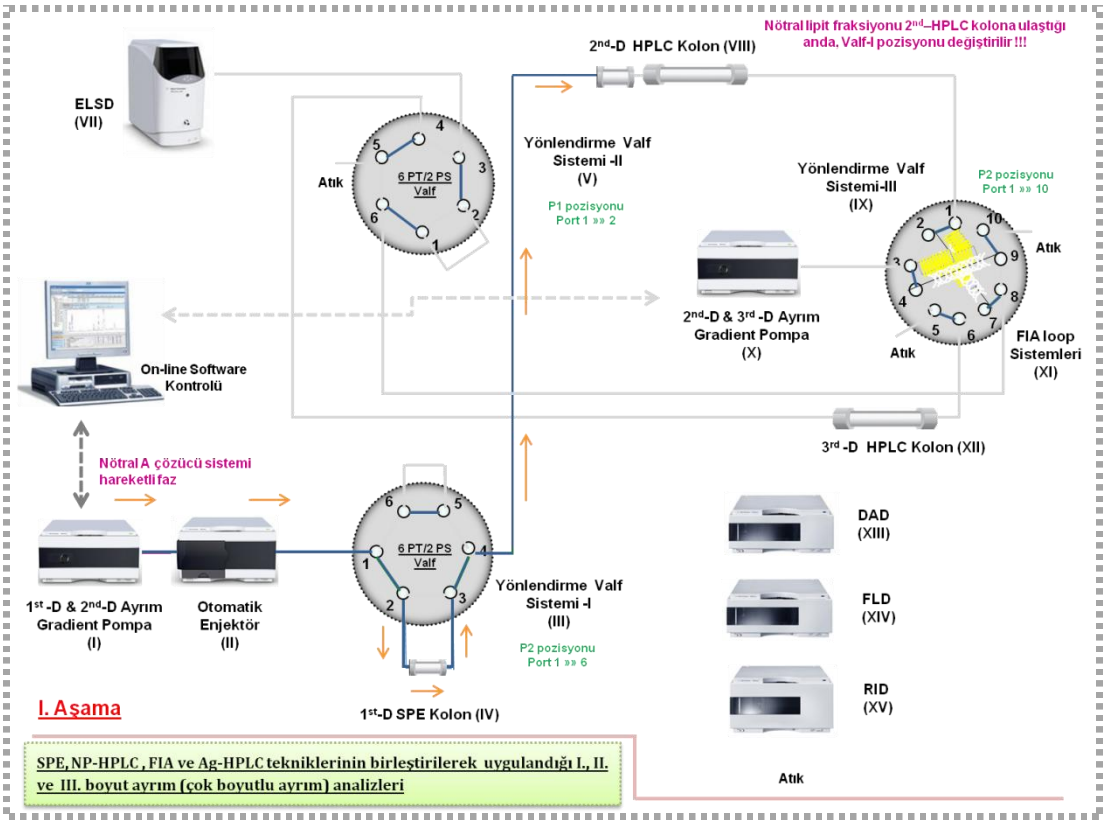
### 3.4.5.2. Valf pozisyonlarının değiştirilme sürelerinin etkisi

Şekil. 3.11'de yer alan analiz sisteminde, yönlendirme valf sistemi-II ve III' e ait pozisyonların değiştirilme sürelerine ilişkin optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Hekzan çözücü sisteminde hazırlanan farklı bitkisel yağ numuneleri kullanılarak, farklı sürelerde valf pozisyonları değiştirilerek analizler yürütülmüştür (Çizelge 3.13 ve 3.14).

### 3.4.6. SPE, NP-HPLC, FIA ve $Ag^{+}$-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı I., II. ve III. boyut ayrım ($1^{st}$-D & $2^{nd}$-D & $3^{rd}$-D) analizleri

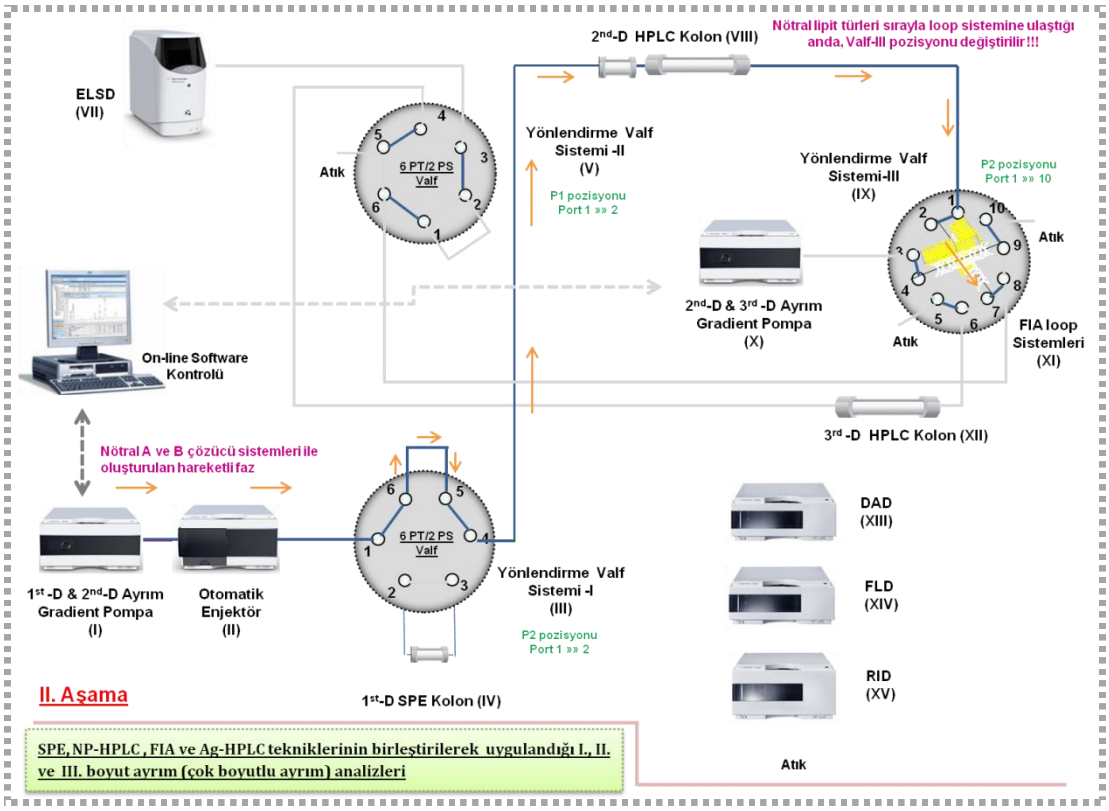
SPE, NP-HPLC, FIA ve $Ag^{+}$-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı I., II. ve III. boyut ayrım analizleri; sistem üzerinde 5 temel aşamanın sırasıyla uygulanması ile, oluşturulan tek bir analiz programının kontrolünde gerçekleştirilmektedir. Kullanılan yazılım ve yapılan uygun programlama yardımıyla, bu aşamalar tek bir analiz metodunda birleştirilerek uygulanabilmektedir (Şekil 3.12; 3.13; 3.14; 3.15 ve 3.16). Uygulanan metot parametreleri & programlaması Çizelge 3.14'de detaylı olarak yer almaktadır.

**I. aşama// SPE tekniğinin uygulandığı I. boyut ayrım basamağı.** Hekzan ile hazırlanan yağ numunesi, gradient pompa **(I)** ve otomatik enjektör **(II)** vasıtasıyla sisteme enjekte edilir. Enjeksiyon işleminin ardından termostatlı kolon fırınından geçen numune, seçilen uygun pozisyon ile yönlendirme valf-I (6PT/2PS) **(III)** üzerine adapte edilen diol yapılı SPE kolona **(IV)** gönderilir. %100 nötral A hareketli fazı kullanılarak gradient program başlatılır ve lipit türlerinin SPE kolon **(IV)** üzerinde ayrımı sağlanır. Yağ numunesindeki nötral lipit fraksiyonun, II. boyut ayrım aşaması öncesinde polar lipitlerden tamamen izole edilerek ayrımı sağlanır. SPE kolon **(IV)** üzerinde izole edilen ilk fraksiyon yani nötral lipit fraksiyonu, $2^{nd}$-D HPLC kolonuna **(VIII)** ulaştığı anda valf-I (6PT/2PS) sisteminin pozisyonu değiştirilir. Valf pozisyonunun değişmesi ile; SPE kolon **(IV)** üzerinde devam eden I. boyut ayrım analizinin; nötral lipit fraksiyonun tamamen izole edildiği, polar fraksiyonun ise ileriki aşamada ayrımı sağlanmak üzere kolonda bırakıldığı aşamada kesilmesi sağlanır. Bu esnada; nötral lipit fraksiyonu devam eden akışla birlikte, II. boyut ayrım analizlerinin gerçekleştirildiği $2^{nd}$-D HPLC kolonuna **(VIII)** ulaşmış olur (Şekil 3.12).



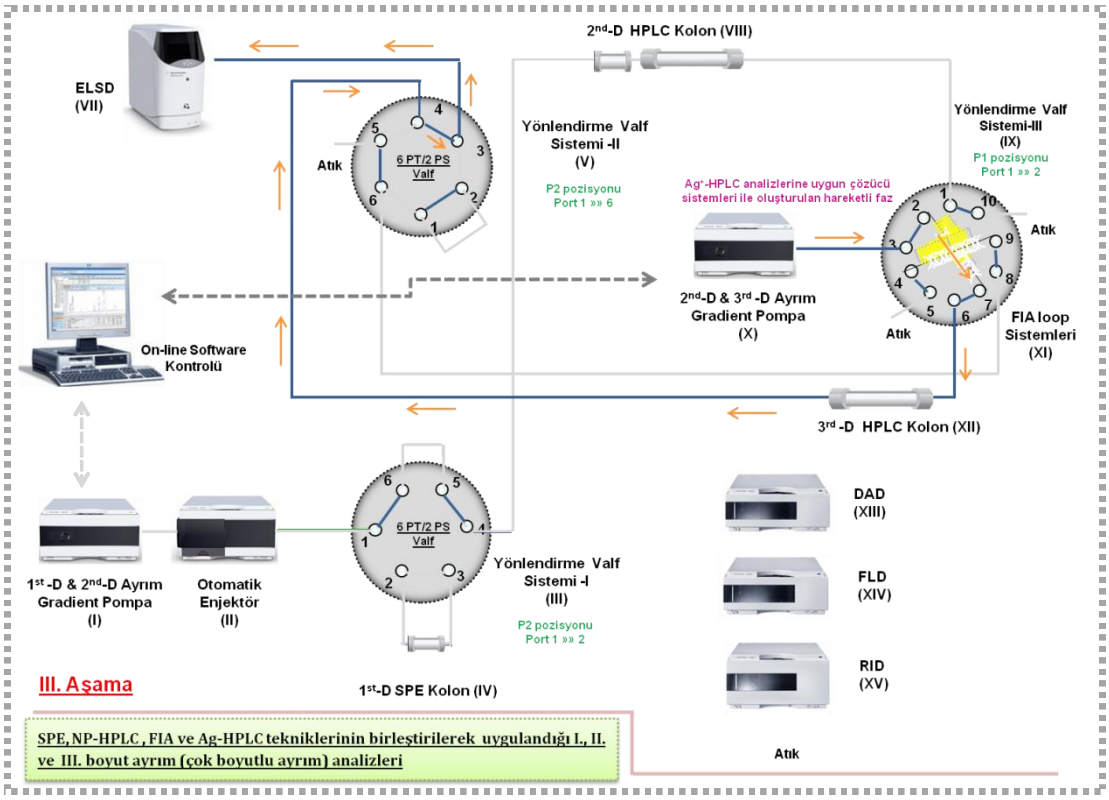

**Şekil 3. 12.** SPE, NP-HPLC, FIA ve $Ag^{+}$-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı I., II. ve III. boyut ayrım analizleri için I. aşama işleyişine ait şematik gösterim

**II. aşama// NP-HPLC tekniğinin uygulandığı II. boyut ayrım basamağı.** Nötral lipit fraksiyonun, içerisinde mevcut lipit türlerine (*trigliserit, tokoferol, tokotrienol, FFA, sterol, digliserit, monogliseritlere*) ayrımı için, diol yapılı $2^{nd}$-D HPLC kolona **(VIII)** ulaşmasıyla birlikte; II. boyut ayrım aşamasına tamamen geçiş sağlanır. II. boyut ayrım aşamasında; gradient pompa **(I)** üzerinde oluşturulan nötral lipit hareketli faz gradient programı ile, nötral lipit A ve B çözücüleri sisteme gönderilir. Valf-I (6PT/2PS) **(III)** sistemi için seçilen uygun pozisyonla sağlanan bu işlem; $2^{nd}$-D HPLC kolonu **(VIII)** üzerinde nötral lipit fraksiyondaki türlerin ayrımını sağlamaktadır. II. boyut ayrım aşamasında elde edilen veriler/kromatogramlar; I. boyut ayrımda olduğu gibi ELS dedektörde **(VII)** gözlenmekte ve alıkonma süreleri tespit edilmektedir. ELSD sisteminde **(VII)**; TG, tokol, FFA, sterol, DG ve MG piklerine ait alıkonma sürelerinin tespitinin ardından; bu bileşiklerin her birisinde mevcut türlerin ayrım aşamasına; yani III. boyut ayrım analizlerine sırayla geçiş yapılır (Şekil 3.13).



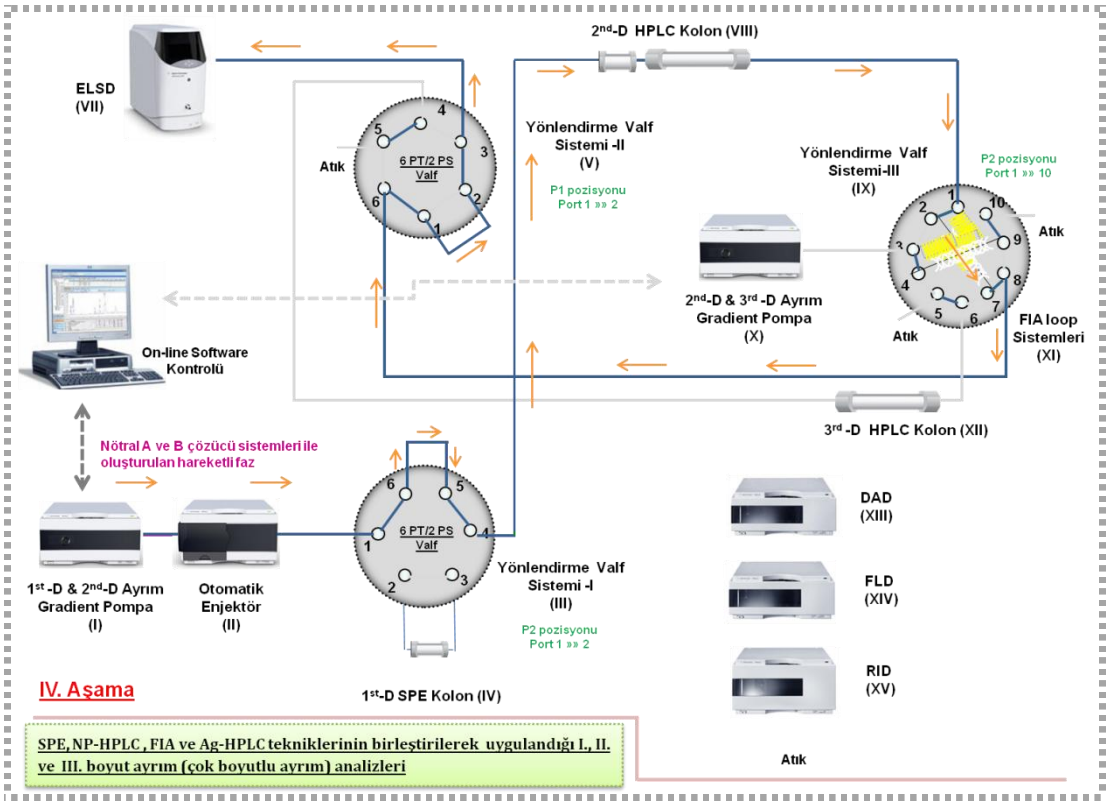

**Şekil 3. 13.** SPE, NP-HPLC, FIA ve $Ag^{+}$-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı I., II. ve III. boyut ayrım analizleri için II. aşama işleyişine ait şematik gösterim

**III. aşama// $Ag^{+}$-HPLC tekniğinin uygulandığı III. boyut ayrım basamağı.** III. boyut ayrım analizleri için; $2^{nd}$-D HPLC kolonu **(VIII)** ile ayrımı sağlanan nötral lipitlerin, alıkonma süreleri dikkate alınarak valf-III (10PT/2PS) **(IX)** üzerine adapte edilen FIA loop sistemlerine **(XI)** sırayla yönlendirilmeleri ve fraksiyonlar şeklinde toplanmaları sağlanır. Loop sistemlerine nötral lipit fraksiyonlarının toplanmaya başlaması ile birlikte; valf-III (10PT/2PS) **(IX)** ve valf-II (6PT/2PS) **(V)** pozisyonu değiştirilir, pompa **(I)** durdurulur, pompa **(X)**'nın işler hale gelmesi sağlanır. Bu aşama ile birlikte; III. boyut ayrım aşaması başlatılmış olur. Loop sistemlerinde toplanan nötral lipit bileşiklerinin, kendi türlerine ayrımını sağlayacak uygun hareketli faz sistemleri, gradient pompa **(X)** ile sisteme gönderilir. Toplanan fraksiyonların, akış içerisine enjeksiyonu (FIA) şeklinde gerçekleştirilen III. boyut analizlerinde; $Ag^{+}$-HPLC tekniğinin uygulandığı $3^{rd}$-D HPLC kolonu **(XII)** ve ELSD sistemi **(VII)** devreye konulmaktadır (Şekil 3.14).



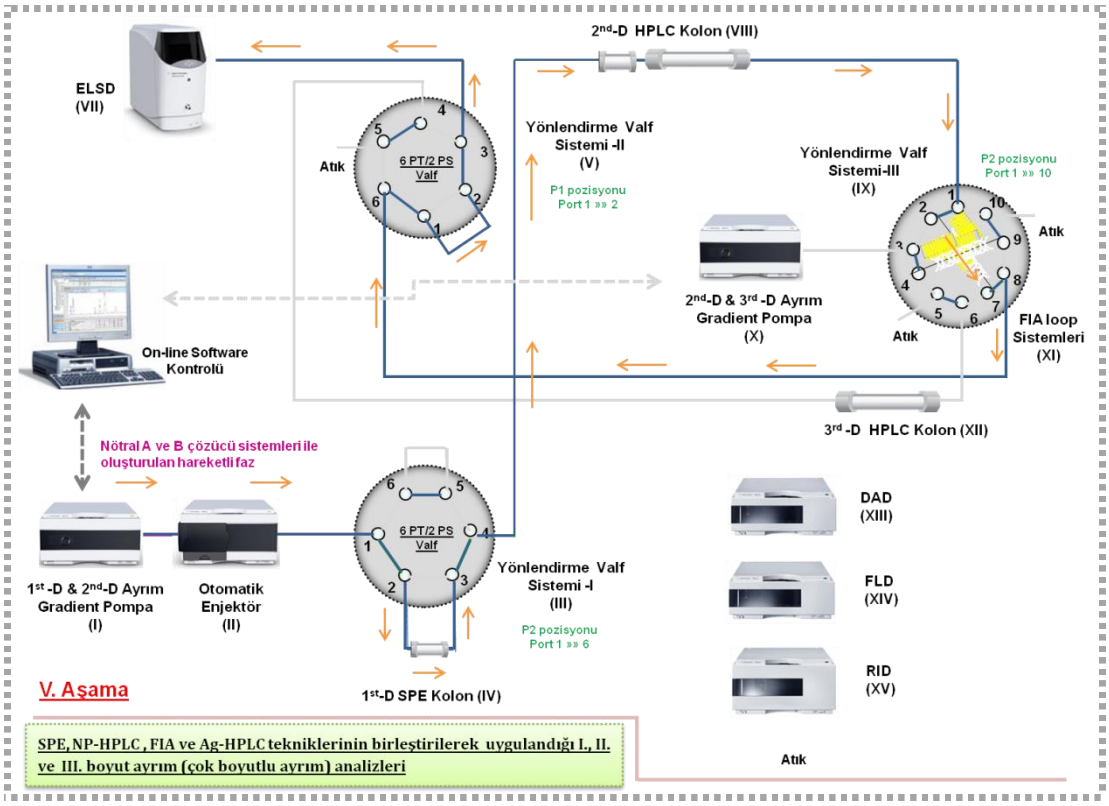

**Şekil 3. 14.** SPE, NP-HPLC, FIA ve Ag+-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı I., II. ve III. boyut ayrım analizleri için III. aşama işleyişine ait şematik gösterim

**IV. aşama// NP-HPLC tekniğinin uygulandığı II. boyut ayrım aşamasında kalan türlerin tayini.** III. boyut ayrım analizlerinin, trigliserit fraksiyonu uygulanmasının ardından; 2nd-D HPLC kolonu **(VIII)** ile lipitlerin tayin aşamasına tekrar geçiş yapılır. II. aşamada; 2nd-D HPLC kolonunda lipit türlerinin, valf-III (10PT/2PS) **(IX)** üzerine adapte edilen FIA loop sistemlerine **(XI)** sırayla yönlendirilmesi sağlanmıştı. Bu işlemler esnasında; II. boyut ayrım aşamasında uygulanan gradient programa, türlerin alıkonma süresine göre ara verilmiş ve bazı türlerin daha sonra analiz edilmek üzere 2nd-D HPLC kolonunda bekletilmesi sağlanmıştı. Bekletilen türlerin tayini için; nötral gradient program, bırakıldığı yerden gradient pompa **(I)** vasıtasıyla tekrar devreye konulmuştur (Şekil 3.15).




**Şekil 3. 15.** SPE, NP-HPLC, FIA ve $Ag^{+}$-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı I., II. ve III. boyut ayrım analizleri için IV. aşama işleyişine ait şematik gösterim

**V. aşama// SPE tekniğinin uygulandığı I. boyut ayrım aşamasında kalan türlerin tayini.** Sistem işleyişinin son aşamasında; bir önceki aşamada olduğu gibi I. boyut ayrım aşamasında ara verilen/ kesilen analiz basamağına geri dönülerek, SPE kolonda **(IV)** kalan lipit türlerinin tayini sağlanmıştır. Valf-I (6PT/2PS) **(III)** sistemi için uygun pozisyon seçilmiş ve gradient pompa **(I)** vasıtasıyla nötral gradient programın kaldığı yerden devreye konulması sağlanmıştır. SPE kolon **(IV)** üzerinde bekletilen polar lipit fraksiyonun (*fosfolipitlerin*) analizi için, sistemin ilk halindeki programlamaya geçmesi sağlanarak, sistem işleyişi tamamlanmıştır (Şekil 3.16). Sistem işleyişinin tamamlanmasıyla birlikte; birçok yağ analizinin ön işlem basamağında yer alan katı faz ekstraksiyon (SPE) tekniğinin, akış enjeksiyon analiz (FIA) ve yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) sistemlerine entegrasyonu sağlanmıştır. Böylece yağlarda mevcut türlerin tek bir enjeksiyon ile 3 boyutlu kromatografik tayinleri için, numune ön işlemlerinin otomatik olarak gerçekleştirilebildiği ve analizci müdahalesinin en aza indirilmesi ile daha kısa sürede, tekrarlanabilirliği yüksek sonuçların elde edilebildiği; on-line SPE-FIA-HPLC yağ analiz sisteminin oluşturulması ve sistem üzerinde yeni analiz metotlarının geliştirilip/uygulanabilirlik kazanması sağlanmıştır.




**Şekil 3. 16.** SPE, NP-HPLC, FIA ve Ag+-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı I., II. ve III. boyut ayrım analizleri için V. aşama işleyişine ait şematik gösterim

### 3.4.6.1. Valf pozisyonlarının değiştirilme sürelerinin etkisi

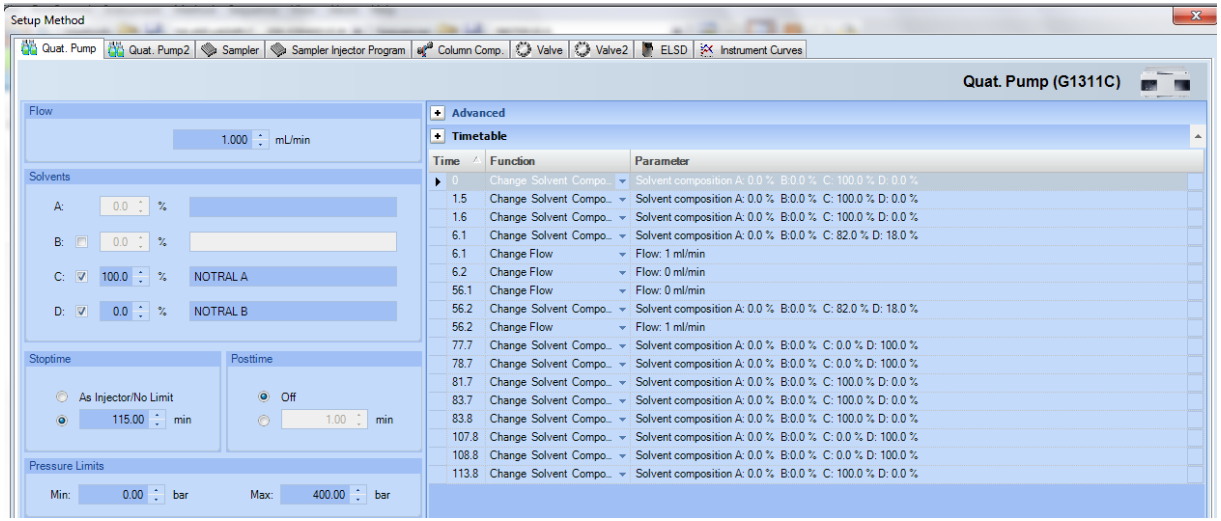
Birleştirilmiş analiz sistemlerinde; fraksiyonların bir sonraki ayrım aşamasına aktarılma prosedürlerinin iyileştirilmesi amacıyla, valf sistemi pozisyonlarının değiştirilme sürelerine ilişkin optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.15).

**Çizelge 3. 15.** SPE,NP-HPLC, FIA ve Ag+-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı I.,II. ve III. boyut ayrım analizleri için kullanılan parametreler

**SPE, NP-HPLC, FIA ve $Ag^{+}$-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı I., II. ve III. boyut ayrım analizleri için kullanılan parametreler**

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | **Türü Miktarı** | Bitkisel yağ numuneleri ve lipit standart maddeler 0.1 mg yağ/ µL çözücü, farklı konsantrasyonlardaki standart maddeler | | | |
| | **Enjeksiyon** | Otomatik enjeksiyon, 5 µL | | | |
| | **Çözücü türü** | Hekzan | | | |
| **SABİT FAZ** | **Türü ve Özelliği** | **1st-D SPE kolon;** LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.0mm)<br>**2nd-D HPLC kolon;** LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.0mm)+LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 250x4.0mm)<br>**3rd-D HPLC kolon;** ChromSpher 5 Lipids kolon (5µm 250x4.6mm) | | | |
| **HAREKETLİ FAZ** | **Çözücü sistemi** (HPLC saflıkta) | **Nötral lipid hareketli faz A:** | Hekzan: asetik asit (99:1.0, v/v/v) | | |
| | | **Nötral lipid hareketli faz B:** | Hekzan: izopropanol: asetik asit (84:15:1.0, v/v/v) | | |
| | | **3rd-D boyut ayrım aşaması için:** | Hekzan (A), Hekzan:İzop:ACN, (75: 22.5: 2.5, v/v/v) (B) | | |
| | **1. ve 2. HPLC pompanın birlikte kullanılmasıyla uygulanan gradient program** | | **Nötral A** | **Nötral B** | **Hekzan (A)** | **Hekzan:İzop:ACN (B)** |
| | | **1.pompa 0. dk** | % 100 | % 0 | %0 | %0 |
| | | **1.pompa 1.5. dk** | % 100 | % 0 | %0 | %0 |
| | | **1.pompa 1.6. dk** | %100 | %0 | %0 | %0 |
| | | **1.pompa 6.1. dk** | %82.4 | %17.6 | %0 | %0 |
| | | **I. HPLC pompa durdurulur, II. HPLC pompa devreye konulur.** | | | | |
| | | **2.pompa 6.1 dk** | %0 | %0 | %100 | %0 |
| | | **2.pompa 16.1 dk** | %0 | %0 | %100 | %0 |
| | | **2.pompa 38.1 dk** | %0 | %0 | %82 | %18 |
| | | **2.pompa 43.1 dk** | %0 | %0 | %65 | %35 |
| | | **2.pompa 46.1 dk** | %0 | %0 | %0 | %100 |
| | | **2.pompa 49.1 dk** | %0 | %0 | %0 | %100 |
| | | **2.pompa 56 dk** | %0 | %0 | %100 | %0 |
| | | **II. HPLC pompa durdurulur, I. HPLC pompa devreye konulur.** | | | | |
| | | **1.pompa 56.1 dk** | %82.4 | %17.6 | %0 | %0 |
| | | **1.pompa 77.6.dk** | %0 | %100 | %0 | %0 |
| | | **1.pompa 78.6. dk** | %0 | %100 | %0 | %0 |
| | | **1.pompa 81.6 dk** | %100 | %0 | %0 | %0 |
| | | **1.pompa 83.6. dk** | %100 | %0 | %0 | %0 |
| | | **1.pompa 83.7.dk** | %100 | %0 | %0 | %0 |
| | | **1.pompa 107.7 dk** | %0 | %100 | %0 | %0 |
| | | **1.pompa 108.7 dk** | %0 | %100 | %0 | %0 |
| | | **1.pompa 111.7 dk** | %100 | %0 | %0 | %0 |
| | | **1.pompa 113.7 dk** | %100 | %0 | %0 | %0 |
| | **Kolon Fırını Sıcaklık** | 30 - 35°C **Akış Hızı:** 1 mL/dk | | | |
| | **Valf Sistemi Pozisyonu** | **Süre** | **Valf -1 (6 PT/2 PS Valf)** | **Valf -2 (6 PT/2 PS Valf)** | **Valf -3 (10 PT/2 PS Valf)** |
| | | **0 - 1.5 dk arası** | P2 | P1 | P2 |
| | | **1.5 -6.1 dk arası** | P1 | P1 | P2 |
| | | **6.1 - 56.1 dk arası** | P1 | P2 | P1 |
| | | **56.1 -83.7 dk arası** | P1 | P2 | P1 |
| | | **83.7 – 113.7 dk arası** | P2 | P1 | P2 |
| | **Buharlaştırma sıcaklığı** 40°C **Nebülizasyon sıcaklığı** 80°C **Gaz akışı**1.5 SLM | | | | |

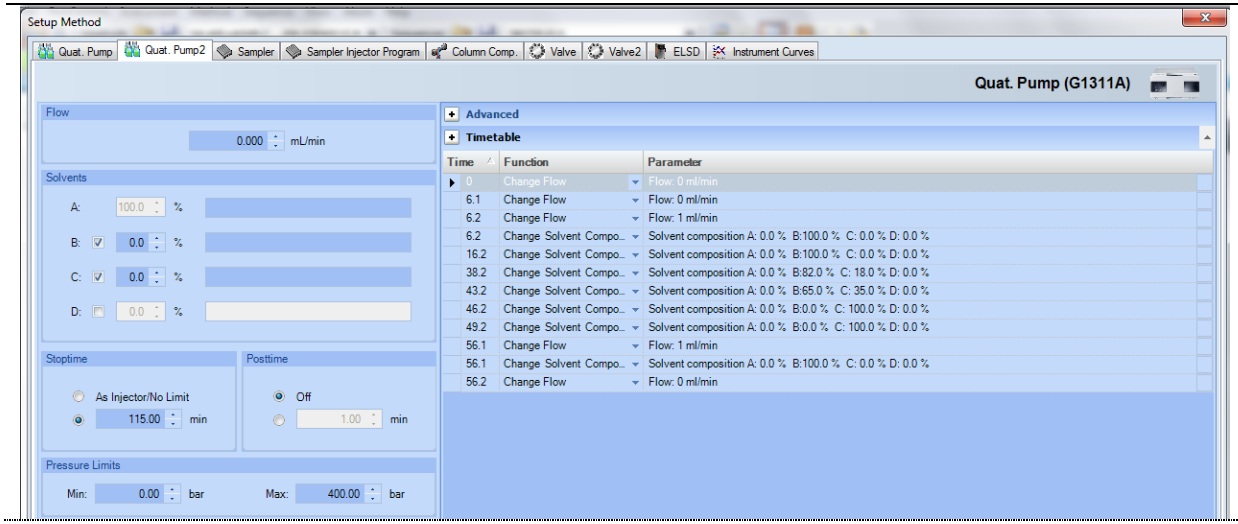
**SPE, NP-HPLC, FIA ve $Ag^{+}$-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı I., II. ve III. boyut ayrım analizleri için tespit edilen optimum metot programlaması**






**I. gradient pompaya ait programlama**

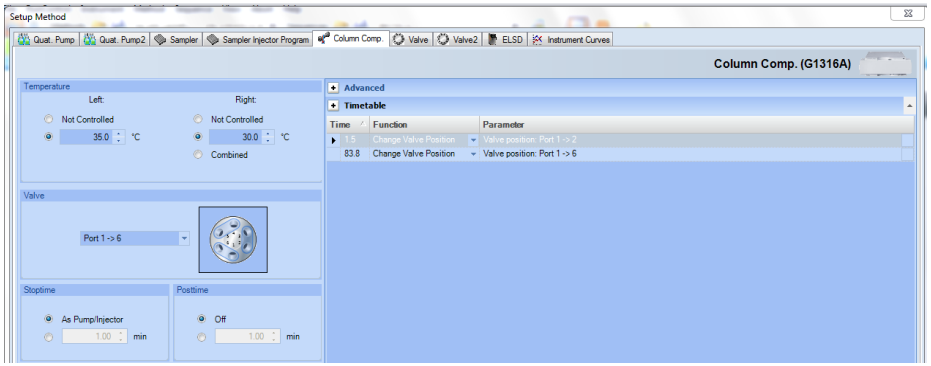
- 0. dk- 1,5. dk →→→ SPE tekniğinin uygulandığı I. boyut ayrım aşaması
- 1,5. dk- 6,1. dk →→→ NP-HPLC tekniğinin uygulandığı II. boyut ayrım aşaması
- 6,1. dk- 56,1. dk →→→ Aktif değil
- 56,1. dk- 83,7. dk →→→ NP-HPLC tekniğinin uygulandığı II. boyut ayrım aşamasında kalan türlerin tayin basamağı
- 83,7. dk- 113,7. dk →→→ SPE tekniğinin uygulandığı I. boyut ayrım aşamasında kalan türlerin tayin basamağı






**II. gradient pompaya ait programlama**

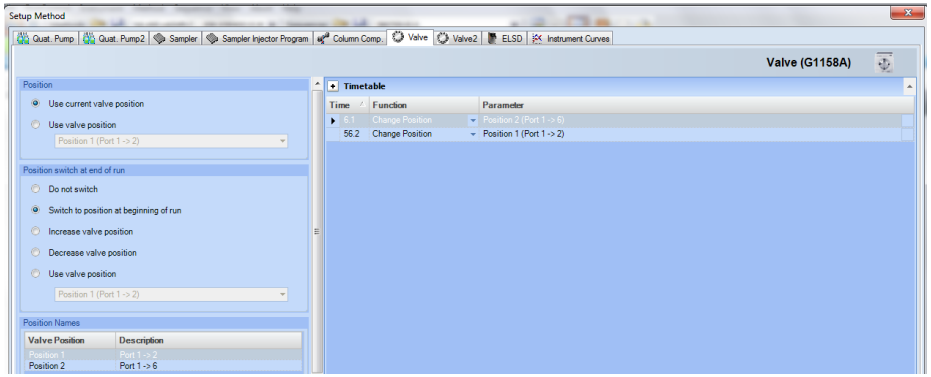
- 0. dk- 6,1. dk →→→ Aktif değil
- 6,1. dk- 56,1. dk →→→ $Ag^{+}$-HPLC tekniğinin uygulandığı III. boyut ayrım basamağı
- 56,1. dk- 113,7. dk →→→ Aktif değil






**Valf sistemi- I (6PT/2PS) e ait programlama**

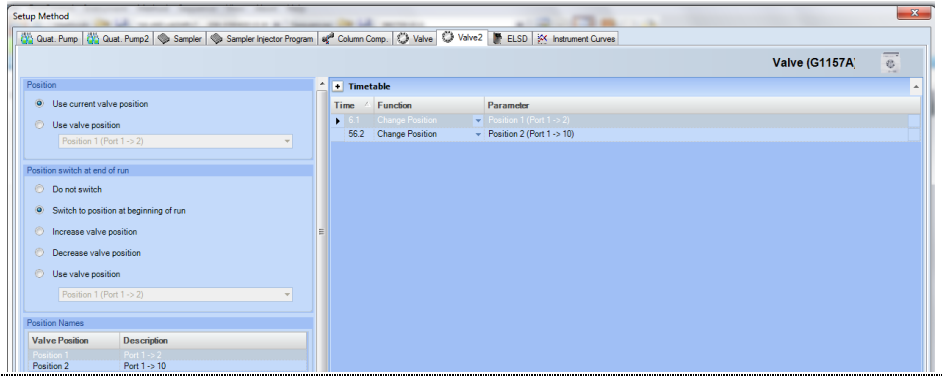
- 1,5. dk →→→ SPE tekniğinin uygulandığı I. boyut ayrım aşamasından NP-HPLC tekniğinin uygulandığı II. boyut ayrım aşamasına geçiş
- 83,7. dk →→→ SPE tekniğinin uygulandığı I. boyut ayrım aşamasında kalan türlerin tayin basamağına geçiş






**Valf sistemi- II (6PT/2PS) e ait programlama**

- 6. dk →→→ NP-HPLC tekniğinin uygulandığı II. boyut ayrım aşamasından $Ag^{+}$-HPLC tekniğinin uygulandığı III. boyut ayrım basamağına geçiş
- 56,1. dk →→→ NP-HPLC tekniğinin uygulandığı II. boyut ayrım aşamasında kalan türlerin tayin basamağına geçiş






**Valf sistemi- III (10PT/2PS) e ait programlama**

- 6. dk →→→ NP-HPLC tekniğinin uygulandığı II. boyut ayrım aşamasından $Ag^{+}$-HPLC tekniğinin uygulandığı III. boyut ayrım basamağına geçiş
- 56,1. dk →→→ NP-HPLC tekniğinin uygulandığı II. boyut ayrım aşamasında kalan türlerin tayin basamağına geçiş

### 3.5. Standart Yağ Analiz Metotları

Önerilen sistem üzerinde yürütülen optimizasyon çalışmalarının ardından, yağ analizleri için çeşitli resmi kuruluşlar tarafından onaylı standart metotlar ile tayinler tekrar edilmiştir. Standart metotlar ile yürütülen tayinlerden elde edilen sonuçlar, geliştirilen metotlardan elde edilenlerle karşılaştırılmıştır. Böylece; geliştirilen metotların belirlenen tayinlerin yürütülmesinde, standart metotlara alternatif olarak kullanılıp/kullanılamayacağı ortaya konulmuştur. Yağların özelliklerini belirlemede büyük önem arz eden; trigliserit, tokoferol, tokotrienol, sterol, FFA, digliserit, monogliserit ve fosfolipit türlerinin tayini için geliştirilen metotların yanında, bu türlerin standart metotlar ile tayinlerinin gerçekleştirilmesi hedeflenmişti. Fakat, sistem üzerinde $1^{st}$-D & $2^{nd}$-D & $3^{rd}$-D birleştirilmiş analiz uygulamalarına geçildiğinde; bu bileşenlerin tümü için istenilen verimlilikte sonuç alınamayacağı görülmüş ve bu türlerin standart metot uygulamalarının gerçekleştirilmesinin anlamlı olmayacağına karar verilmiştir.

Yağın ana bileşenleri olan trigliseritler haricindeki türlerin, III. boyut ayrım aşamasına kadar aktarılarak tayin edilebilmelerinin oldukça güç olduğu görülmüştür. Bu nedenle; önerilen sistem üzerinde; sterol, FFA, digliserit, monogliserit ve fosfolipit türlerinin tayini için, sadece II. boyut ayrım aşamasındaki sistem işleyişinin ve metot uygulanmasının en doğru yaklaşım olacağına karar verilmiştir. Sonuç olarak, sistem üzerinde geliştirilen birleştirilmiş analiz uygulamalarından elde edilen sonuçlar ile karşılaştırma yapmak üzere; trigliserit ve tokol standart metot uygulamaları gerçekleştirilmiştir.

#### 3.5.1. Trigliserit Analizi (AOCS Ce 5b-89, Standart Metot)

AOCS tarafından onaylı metot; bitkisel sıvı yağlarda mevcut trigliserit moleküllerinin ayrımını ve molekül ağırlıkları cinsinden veya eş değer karbon sayısının (ECN) fonksiyonu olarak doymamışlılıklarının kantitatif olarak tayini için uygulanmaktadır. Standart AOCS Ce 5b-89 metoduna ait metot parametreleri Çizelge 3.16'da yer almaktadır.

**Çizelge 3. 16.** Trigliserit analizlerinde kullanılan standart metoda ait deneysel parametreler

| | |
|---|---|
| **Numune ön işlemi:** | 1 g yağ numunesi 10 mL'lik kapaklı mezüre süzülerek tartılır. Aseton ile 10 mL'ye tamamlanarak numune analize hazır hale getirilir ve HPLC sistemine enjekte edilir. |
| **Enjeksiyon miktarı:** | 5 µL |
| **Kolon:** | ACE C18 kolon (5µm 250 x 4.6 mm) |
| **Sıcaklık:** | 30°C |
| **Hareketli faz:** | Aseton / Asetonitril (50:50%, v/v ) |
| **Akış hızı:** | 1,5 mL/dk |
| **Dedektör:** | RI dedektör, 35°C |

### 3.5.2. Tokol (Tokoferol ve Tokotrienol) Analizi (AOCS Ce 8-89, Standart Metot)

AOCS tarafından onaylı metot; NP-HPLC tekniği kullanılarak bitkisel sıvı yağlarda mevcut tokoferol ve tokotrienol yani tokol türlerinin kalitatif ve kantitatif olarak tayini amacıyla uygulanmaktadır. Standart AOCS Ce 8-89 metoduna göre gerçekleştirilen analizlere ait metot parametreleri Çizelge 3.17'de yer almaktadır.

**Çizelge 3. 17.** Tokol analizlerinde kullanılan standart metoda ait deneysel parametreler

| | |
|---|---|
| **Numune ön işlemi:** | 1 g yağ numunesi 10 mL'lik kapaklı mezüre süzülerek tartılır. Aseton ile 10 mL'ye tamamlanarak numune analize hazır hale getirilir ve HPLC sistemine enjekte edilir. |
| **Enjeksiyon miktarı:** | 2 µL |
| **Kolon:** | ACE C18 5µm 250 x 4.6 mm kolon |
| **Sıcaklık:** | 20°C |
| **Hareketli faz:** | Hekzan : İzopropanol (99,5 : 0,5 v/v) |
| **Akış hızı:** | 1 mL/dk |
| **Dedektör:** | FLD; λex= 295 nm, λem= 330 nm |

# 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

## 4.1. On-line SPE-FIA-HPLC Yağ Analiz Sisteminde Uygulanan Yöntemler

HPLC sisteminin modifiye edilmesiyle oluşturulan on-line SPE-FIA-HPLC analiz sistemi üzerinde yeni yağ analiz metotlarının geliştirilip/uygulanabilirlik kazanmasını sağlayabilmek amacıyla yürütülen deneysel çalışmalar;

- **i.** SPE tekniğinin uygulandığı I. boyut ayrım ($1^{st}$-D) analizleri
- **ii.** NP-HPLC tekniğinin uygulandığı II. boyut ayrım ($2^{nd}$-D) analizleri
- **iii.** NP-HPLC, RP-HPLC ve $Ag^{+}$-HPLC tekniğinin uygulandığı III. boyut ayrım ($3^{rd}$-D) analizleri
- **iv.** SPE ve NP-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı I. ve II. boyut ayrım ($1^{st}$-D & $2^{nd}$-D) analizleri
- **v.** NP-HPLC, FIA ve $Ag^{+}$-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı II. ve III. boyut ayrım ($2^{nd}$-D & $3^{rd}$-D) analizleri ve
- **vi.** SPE, NP-HPLC, FIA ve $Ag^{+}$-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı I., II. ve III. boyut ayrım ($1^{st}$-D & $2^{nd}$-D & $3^{rd}$-D) analizleri olmak üzere farklı teknik/yöntem uygulamaları ile 6 aşamada tamamlanmıştır.

Deneysel çalışmaların uygulanmasında, Şekil 3.1'de yer alan on-line SPE-FIA-HPLC yağ analiz sistemi üzerinde her aşamaya özgü farklı akış yolları ve uygun metot parametreleri belirlenmiştir. Sistem üzerinde uygulanan deneysel parametreler ve elde edilen veriler ilgili başlıklar altında detaylı olarak yer almaktadır.

### 4.1.1. SPE tekniğinin uygulandığı I. boyut ayrım ($1^{st}$-D) analizleri

SPE tekniği uygulanarak gerçekleştirilen I. boyut ayrım ($1^{st}$-D) analizleri ile; bitkisel yağlarda mevcut nötral (basit) ve polar (kompleks) lipitlerin, iki ana fraksiyon halinde ayrılarak kalitatif ve kantitatif olarak tayini sağlanmıştır. Önerilen analiz sisteminin birleştirilmiş analiz yöntemi uygulamalarına uygun hale getirilebilmesi amacıyla her bir boyut ayrım aşaması için uygun akış yolları izlenerek optimizasyon çalışmaları yürütülmüştür. Bu amaçla gerçekleştirilen çalışmaların ilk aşamasında, SPE tekniği uygulanarak gerçekleştirilen I. boyut ayrım analizleri için optimizasyon çalışmaları yürütülmüştür.

Şekil 3.3'de yer alan sistem işleyişi ve Çizelge 3.3'de yer alan metot parametreleri kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir. Şekil.3.3'de yer alan sistem işleyişinden görüleceği üzere; uygun çözücü ile hazırlanan yağ numunesi, gradient pompa **(I)** ve otomatik enjektör **(II)** vasıtasıyla sisteme enjekte edilmiştir. Enjeksiyon işleminin ardından termostatlı kolon fırınından geçen karışım, seçilen uygun pozisyon ile yönlendirme valfi (6PT/2PS) **(III)** üzerine adapte edilen SPE kolonuna **(IV)** yönlendirilmiştir. Polar lipit çözücü sistemleri kullanılarak oluşturulan gradient program sayesinde, lipit bileşenlerinin SPE kolon **(IV)** üzerinde "***nötral***" ve "***polar lipitler***" şeklinde iki temel fraksiyona ayrımı sağlanmıştır. "***I. boyut ayrım analizleri***" olarak adlandırılan bu aşama ile; yağlarda mevcut nötral (*trigliserit, tokoferol, tokotrienol, FFA, sterol, digliserit, monogliserit, ester bileşikleri*) ve polar lipitlerin (*fosfolipitler*), II. boyut ayrım aşaması öncesinde birbirinden tamamen izole edilerek ayrımları sağlanmıştır. Silika veya diol yapılı sabit faz içeren SPE kolonları ile gerçekleştirilen tayinlerde polar lipit çözücü sistemi ile hazırlanan bitkisel yağ numuneleri ve standart maddeler kullanılarak optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiş ve metot parametrelerine karar verilmiştir.

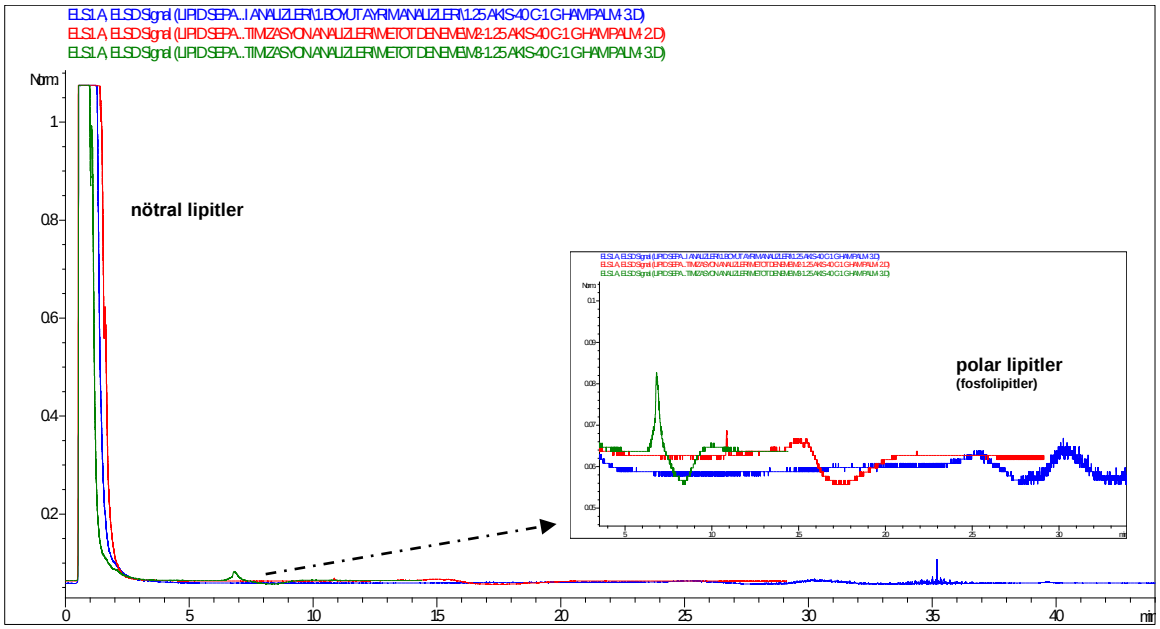
Optimizasyon çalışmalarından elde edilen sonuçlarla ilgili detaylı bilgiler, ilgili başlıklar altında sunulmuştur.

#### 4.1.1.1. Hareketli faz türü etkisi

I. boyut ayrım ($1^{st}$-D) analizlerinde kullanılması öngörülen silika yapılı SPE kolon üzerinde ham palm yağı numuneleri ile; hareketli faz bileşimi etkisine dair bazı analizler yürütülmüştür. Bu analizlerde metot karşılaştırması yapılırken; $1^{st}$-D aşamasında tayini planlanan polar lipit türlerinin (*fosfolipitler*), kromatografik davranışları üzerinde durulmuş, silika sabit fazı üzerinde Çizelge 3.4'de belirtilen hareketli faz sistemleri kullanılarak analizler yürütülmüştür. Analizlerde kullanılan hareketli faz programları, Silversand ve ark. (1997) tarafından somon balığından ekstrakte edilen yağdaki nötral ve polar lipit fraksiyonların tayin edildiği çalışmaya ait metot şartları esas alınarak oluşturulmuştur.

Polar lipit A [*hekzan:izopropanol:asetik asit (82:17:1.0, v/v/v)+0.08% trimetilamin*] ve polar lipit B [*izopropanol:su:asetik asit (85:14:1.0, v/v/v)+0.08% trimetilamin*] hareketli faz sistemleri ile gradient program şeklinde oluşturulan üç farklı metodun (Çizelge 3.4) ayrımlar üzerine olan etkisi incelenmiş, elde edilen

kromatogramlar karşılaştırmalı olarak Şekil 4.1'de verilmiştir. Ayrıca, kullanılan hareketli faz sistemlerinde 0,08% trimetilamin çözücüsü ilavesi (*modifier solvent*) ile, polar karakterli lipit bileşenlerin ayrım ve tayinlerinin iyileştirilmesine katkı sağlanmıştır.




**Şekil 4. 1.** I. boyut ayrım analizleri üzerine hareketli faz bileşimi etkisinin, ham palm yağı numunesi kullanılarak incelendiği analizlerden elde edilen kromatogramlar

| | |
|---|---|
| Numune çözücüsü: | Polar lipid çözücü [hekzan: izopropanol: HAc (50:50:1.0, v/v/v)+0.08% trimetilamin] |
| Numune enjeksiyonu: | 2 µL (0.1 mg yağ/µL) (Manuel enjeksiyon) |
| 1st-D SPE kolon: | Inertsil Sil 100A kolon (5µm, 50x4.6mm) |
| Hareketli f. programı: | **Metot 1** - **Metot 2**- **Metot 3** |
| Akış hızı: | 1,25 mL/dk |
| Sıcaklık: | 40°C |
| ELSD programı: | Neb. sıcaklığı 60°C, Buh.sıcaklığı 50°C, Azot gazı akış 1.6 SLM |

*Şekil 3.3'de yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.3 ve 3.4'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

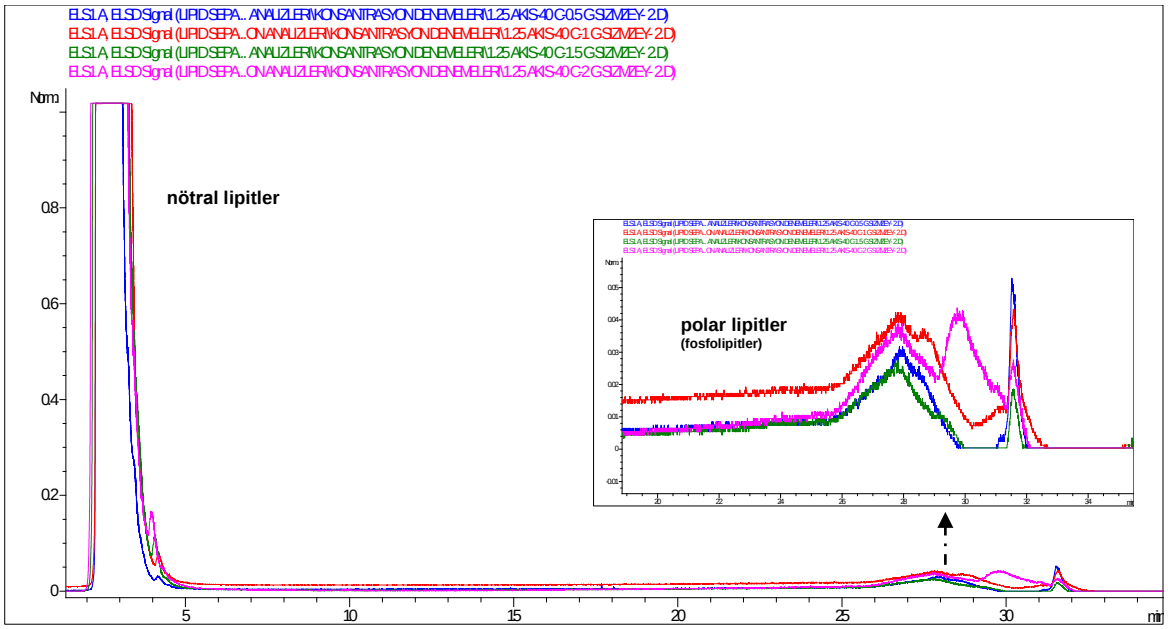
Şekil 4.1'den görüleceği üzere; oluşturulan metotlara ait gradient programlar ile nötral ve polar lipit türleri için farklı *k'* ve *Rs* değerleri tespit edilmiştir. Nötral lipit türlerinin (*trigliserit, tokol, FFA, sterol, digliserit, monogliserit ve ester bileşikleri*) beklenildiği gibi, toplu halde tek bir pik halinde elue edildiği ve yaklaşık 3 dakikalık kısa bir alıkonma süresine sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu durum, nötral fraksiyon içerisinde yer alan ve farklı polarite değerlerine sahip 7 farklı lipit türünün ayrımı için; daha geniş skalada polarite indis değerine sahip çözücü karışımlarının uygulanması gerektiğini göstermektedir.

Metotlara ait hareketli faz sistemlerinin tümünün; SPE kolondan nötral fraksiyonun toplu şekilde elue edilmesini, polar fraksiyonun (*fosfolipitler*) ise türlerine ayrılarak, daha uzun alıkonma süresine sahip olacak şekilde elue edilmesini mümkün kıldığı görülmüştür. Şekil 4.1'de yer alan kromatogramda polar lipit türlerine ait kısımdan görüleceği üzere; polar lipit A ve B hareketli faz sistemleri ile oluşturulan farklı gradient programların, ayrımlar üzerinde oldukça etkili olduğu görülmektedir. Oluşturulan gradient programlarda; süreye bağlı olarak farklı *P'* değerlerine sahip olan çözücülerin, bu farklılığa yol açtığı düşünülmektedir.

Bilindiği üzere; çözücü sistemlerine ait *P'* değerleri, aynı sabit faz yapıları üzerinde oldukça farklı kromatografik ayrımların meydana gelmesine neden olmaktadır. SPE kolondan elue edilen nötral ve polar lipit türlerinin alıkonma sürelerinin, 44 dakikalık gradient program şeklinde oluşturulan metot-I ile en fazla; 12 dakikalık gradient program şeklinde oluşturulan metot-III ile en kısa olduğu görülmektedir. Polar B çözücü sistemi ile kısa sürede yüksek polarite indis değerlerine ulaşılması sağlanmış, bu durumun türlerin *k'* değerlerini ve alıkonma sürelerini azalttığı, türlerin birbirinden ayrımını yani *Rs* değerlerini etkilemediği gözlenmiştir. Sonuç olarak; I. boyut ayrım ($1^{st}$-D) aşamasında, numunedeki polar lipit bileşenlerinin tamamen ayrılarak tayini sağlanmış; nötral lipitlerin ise toplu fraksiyon şeklinde elue edilmesi sağlanmıştır. Polar lipit türlerinin (fosfolipit) ayrımında; polar B çözücü sistemi uygulamasının oldukça etkili olduğu ve 44 dakika analiz süresine sahip gradient programlama (metot-1) ile istenilen düzeyde uygun sonuçların elde edilebildiği görülmüştür.

#### 4.1.1.2. Numune miktarı etkisi

Numune miktarı etkisinin incelendiği çalışmalarda; literatürde Silversand ve ark. (1997) tarafından önerilen polar lipit çözücü sisteminde hazırlanan 0,05; 0,10; 0,15 ve 0,20 mg yağ/µL konsantrasyonlarındaki sızma zeytinyağı numuneleri için analizler gerçekleştirilmiştir. Diol yapılı SPE kolon üzerinde yürütülen analizlerde, bir önceki aşamada etkin olduğu/optimum tespit edilen 44 dakikalık gradient program uygulanmıştır. Numune miktarının, nötral ve polar türlerin kromatografik davranışları üzerine olan etkilerini incelemek amacıyla yürütülen analizlerden elde edilen kromatogramlar, karşılaştırmalı olarak Şekil 4.2'de verilmiştir.




**Şekil 4. 2.** I. boyut ayrım analizleri üzerine numune miktarı etkisinin, sızma zeytinyağı numunesi kullanılarak incelendiği analizlerden elde edilen kromatogramlar

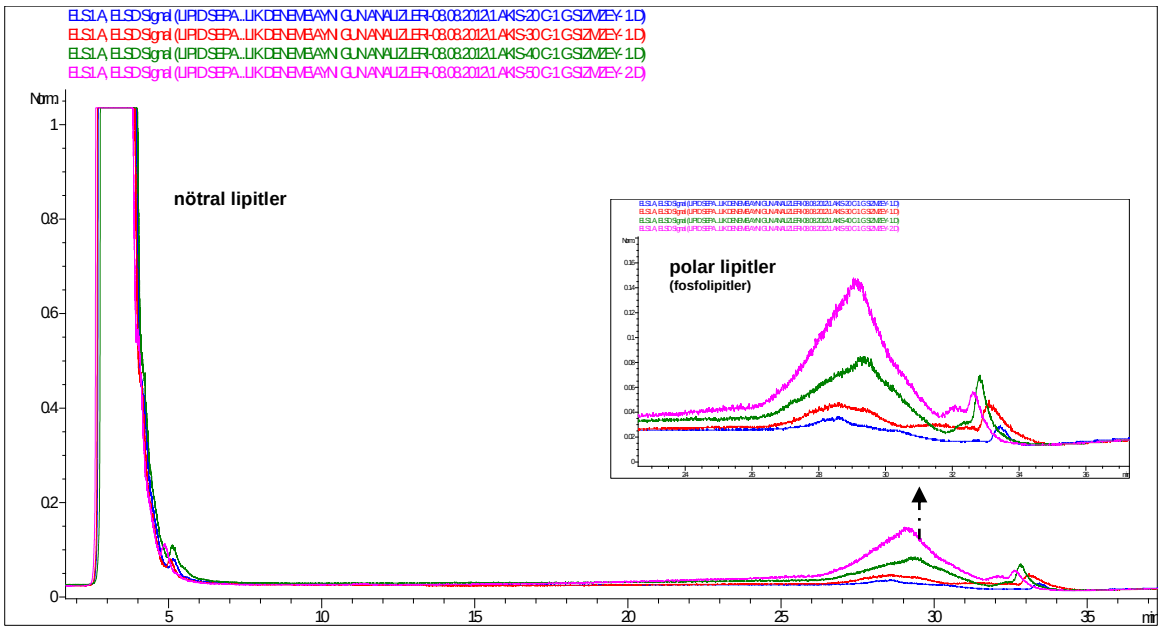
| | |
|---|---|
| Numune çözücüsü: | Polar lipid çözücü [hekzan: izopropanol: HAc (50:50:1.0, v/v/v)+0.08% trimetilamin] |
| Numune enjeksiyonu: | **2 µL (0.05 – 0.10 – 0.15 – 0.20 mg yağ/µL)** (Manuel enjeksiyon) |
| 1st-D SPE kolon: | LiChrospher 100A Diol kolon (5µm,75x4.6mm)+LiChrospher 100A Diol kolon (5µm,250x4.6mm) |
| Akış hızı: | 1,25 mL/dk |
| Sıcaklık: | 40°C |
| ELSD programı: | Neb. sıcaklığı 60°C, Buh.sıcaklığı 50°C, Azot gazı akış 1.6 SLM |

* Şekil 3.3'de yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.3'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

Aynı kromatografik şartlar altında yürütülen analizlerde; numune miktarı etkisi tespit edilirken, polar lipit türlerinin davranışları üzerinden karar verilmeye çalışılmıştır. Şekil 4.2'de yer alan kromatogramlardan görüleceği üzere; nötral lipit fraksiyonların hemen hemen aynı alıkonma sürelerine sahip oldukları tespit edilmiştir. Polar lipit türlerinin (fosfolipitlerin) ise; alıkonma sürelerinin çok yakın değerler olduğu, fakat mevcut fosfolipit bileşenlerinin ayrımına dair önemli farklanmaların olduğu gözlenmiştir. Bu durum; yüksek miktarda (konsantrasyonda) numune enjeksiyonları ile kolon kapasitesinin aşılmasına neden olunması, dolayısıyla kolonun analitleri ayırma kabiliyetinin azalması ile ilişkilendirilmiştir. Sonuç olarak; 0,1 mg yağ/µL konsantrasyonda hazırlanan sızma zeytinyağı numunesi ile 2 µL şeklinde yapılan enjeksiyonlarda, polar lipit fraksiyonun yaklaşık dört farklı fosfolipit türüne ayrımının sağlanabildiği tespit edilmiştir. Belirtilen numune miktarı ile devam edilecek $1^{st}$-D ayrım analizlerinin; özellikle fosfolipit türlerinin ayrımı ve tayini için daha uygun bir yaklaşım olacağı kanaatine varılmıştır.

### 4.1.1.3. Sıcaklık etkisi

On-line SPE-FIA-HPLC analiz sistemi üzerinde, I. boyut ayrım analizlerinin optimizasyonu için yürütülen bir diğer önemli çalışma ise; sıcaklık etkisi üzerine yapılan analizlerdir. HPLC kolon fırınında yapılan sıcaklık değeri uygulamasının, kolon üzerinde ayrımı hedeflenen analitlerin kromatografik davranışlarına önemli derecede etki ettiği bilinmektedir. I. boyut ayrım analizlerinde; nötral ve polar lipit türlerinin kromatografik davranışları üzerine sıcaklık etkisi detaylı olarak incelenmiştir. Yürütülen analizlerde; diol yapıda sabit faz içeren SPE kolonlar kullanılmıştır. 0,1 mg yağ/µL konsantrasyonda hazırlanan numuneler ile, farklı sıcaklık değerleri (20; 30; 40; 50 ve 60°C) için analizler gerçekleştirilmiştir. Yürütülen analizlere ait kromatogramlar, karşılaştırmalı olarak Şekil 4.3'de verilmiştir.




**Şekil 4. 3.** I. boyut ayrım analizleri üzerine sıcaklık etkisinin, sızma zeytinyağı numunesi kullanılarak incelendiği analizlerden elde edilen kromatogramlar

| | |
|---|---|
| Numune çözücüsü: | Polar lipid çözücü [hekzan:izopropanol:HAc (50:50:1.0,v/v/v)+0.08% trimetilamin] |
| Numune enjeksiyonu: | 2 µL (0.1 mg yağ/µL) (Manuel enjeksiyon) |
| 1st-D SPE kolon: | LiChrospher 100A Diol kolon (5µm,75x4.6mm)+LiChrospher 100A Diol kolon (5µm,250x4.6mm) |
| Akış hızı: | 1,0 mL/dk |
| Sıcaklık: | **20- 30- 40- 50°C** |
| ELSD programı: | Neb. sıcaklığı 60°C, Buh.sıcaklığı 50°C, Azot gazı akış 1.6 SLM |

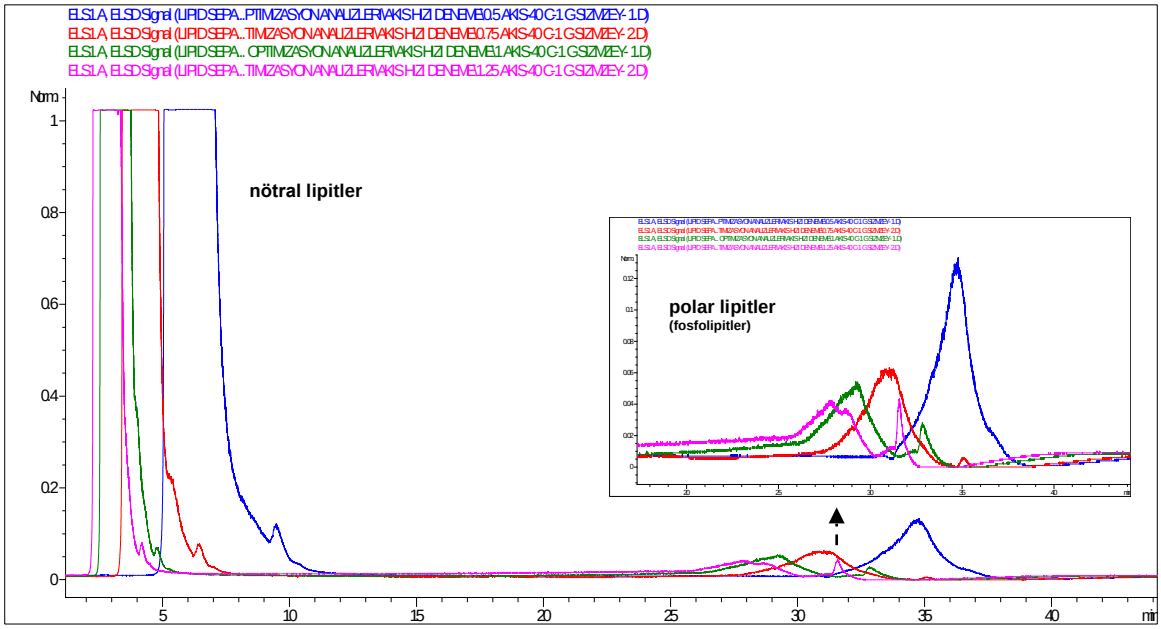
* Şekil 3.3'de yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.3'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

On-line SPE-FIA-HPLC analiz sistemi üzerinde yürütülen sıcaklık analizlerinde; tespit edilen optimum hareketli faz gradient programı ve numune konsantrasyonu kullanılarak, 1 mL/dk akış hızında diol kolon ile analizler tamamlanmıştır. Şekil 4.3'de yer alan kromatogramlardan; sıcaklık değeri arttıkça hem nötral hem de polar türlere ait alıkonma sürelerinin, *Rs* ve *k'* değerlerinin azaldığı görülmektedir. Toplu halde izole edilen nötral lipit türleri için bu değişim çok az iken; polar lipit türlerin (*fosfolipit türleri*) özellikle *Rs* değerlerinin ve kromatografik ayırmaların farklandığı tespit edilmiştir. Bu durum; kromatografik ayırmaların iyileştirilmesinde & optimizasyonunda sıcaklığın önemli bir deneysel parametre olduğunu bir kez daha kanıtlamıştır. Özellikle; SPE kolondan daha geç elue edilen türlerin (fosfolipitlerin), istenilen düzeyde kromatografi pik şekline ve Rs değerine sahip olabilmeleri için, sıcaklık değerindeki artışın faydalı olacağı kanaatine varılmıştır. Diğer yandan, kullanılan diol yapılı SPE kolonun yapısını bozucu etki gösterebilecek ve kullanma talimatına uygun olmayan daha yüksek sıcaklık uygulamalarına geçilmemiştir. En yüksek 50°C uygulaması yapılan analizlerden; 40°C'de kaydedilen kromatogramdan (Şekil 4.3) polar lipit türlerinin başarılı bir şekilde ayrılabildiği görülmektedir.

#### 4.1.1.4. Akış hızı etkisi

SPE kolon ile elue edilmesi hedeflenen nötral ve polar türlerin, kromatografik davranışları üzerine hareketli faz akış hızının etkisini incelemek amacıyla bazı denemeler gerçekleştirilmiştir. 0,1 mg yağ/µL kosantrasyonundaki sızma zeytin yağı numuneleri kullanılarak, farklı akış hızlarında (0,50; 0,75; 1,00 ve 1,25 mL/dk) gerçekleştirilen analizlere ait kromatogramlar karşılaştırmalı olarak Şekil 4.4'de verilmiştir. Akış hızı etkisinin incelendiği analizlerde; tayin edilmesi hedeflenen nötral lipit ve polar lipit fraksiyonların kromatografik davranışlarında önemli derecede farklanmaların meydana geldiği tespit edilmiştir (Şekil 4.4). Elde edilen kromatogramlardan görüleceği üzere; nötral ve polar lipit fraksiyonlarının her ikisi için de, akış hızının artmasıyla birlikte *k'*, *Rs* ve alıkonma süresi değerlerinde belirgin bir azalma meydana gelmiştir. Ayrıca akış hızının azalmasıyla yani kolonda alıkonma süresinin artışıyla birlikte; elde edilen piklerin yayvanlaşma, kuyruklanma ve simetri değerlerinde istenmeyen değerlerin tespit edildiği bilinmektedir. Bu durum; artan hareketli faz akışının kolonda bulunan lipit moleküllerinin hareketliliğini arttırması, ve

etkin ayırmayı sağlayacak olan dengenin, hareketli ve sabit faz arasında yeterli düzeyde sağlanamaması ile ilişkilendirilmiştir.




**Şekil 4. 4.** I. boyut ayrım analizleri üzerine akış hızı etkisinin, sızma zeytiyağı numunesi kullanılarak incelendiği analizlerden elde edilen kromatogramlar

| | |
|---|---|
| Numune çözücüsü: | Polar lipid çözücü [hekzan:izopropanol:HAc (50:50:1.0,v/v/v)+ 0.08% trimetilamin] |
| Numune enjeksiyonu: | 2 µL (0.1mg yağ/µL) (Manuel enjeksiyon) |
| 1st-D SPE kolon: | LiChrospher 100A Diol kolon (5µm,75x4.6mm)+LiChrospher 100A Diol kolon (5µm, 250x4.6mm) |
| Akış hızı: | **0,50- 0,75- 1,00- 1,25 mL/dk** |
| Sıcaklık: | 40°C |
| ELSD programı: | Neb. sıcaklığı 60°C, Buh.sıcaklığı 50°C, Azot gazı akış 1.6 SLM |

* Şekil 3.3'de yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.3'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

Analizler için modifiye edilen HPLC sisteminde oluşan basınç problemi nedeniyle; en fazla 1,25 mL/dk akış hızında denemeler yapılabilmiştir. Kullanılan polar A ve B çözücü sistemleri, yüksek polarite değerleri ile sistem üzerinde yüksek akış hızında basınç oluşumuna ve sistemin devre dışı kalmasına yol açmaktadır. Akış hızı değerleri için yapılan karşılaştırmada, fosfolipit türleri için meydana gelen ayrımların etkinliği değerlendirilmiştir. Uygulanabilen maksimum akış hızında (1,25 mL/dk), dört farklı fosfolipit türünün ayrımı sağlanabilmiş, ve bu akış hızı değerini piklerin kromatografik davranışları bakımından daha uygun olduğu görülmüştür. Sonuç olarak; sistem üzerinde devam eden çalışmalarda, 1,25 mL/dk akış hızının kullanılmasının uygun olduğu kanaatine varılmıştır.

#### 4.1.1.5. ELSD sistemi nebülizasyon ve buharlaştırma sıcaklıklarının etkisi

Bitkisel yağ analizleri için önerilen on-line SPE-FIA-HPLC analiz sisteminin oluşturulmasında; farklı boyut analizlerinde türlerin dedeksiyonunu sağlayabilecek dedektörlerin kullanımı önem arz etmektedir. Literatürde yağ analizleri için önerilen UV, DAD, FLD, RID, MS,... gibi pek çok HPLC dedektör sistemi bulunmaktadır. Önerilen dedektörler, tayin edilecek analitin/lipit türünün özelliğine göre yüksek seçicilik ve hassasiyetle dedeksiyon yapabilme kabiliyetine sahip sistemlerdir.

Son yıllarda lipit türlerinin tayini için önerilen çalışmalar incelendiğinde; ELSD (buharlaştırmalı ışık saçılım dedektör) sisteminin, en yaygın kullanım alanı oluşturan HPLC dedektörü olduğu görülmektedir. ELSD sistemi ile, analitlerin genel özelliklerinin esas alınmasına dayalı dedeksiyon gerçekleştirmektedir. Analitin, herhangi bir elektro aktif yada kromofor gruba sahip olması gerekmemektedir. Dedektör cevabı direk olarak maddelerin kütlesi ile ilgili alınmakta ve temel olarak hareketli fazdan daha az uçucu olan tüm maddeler tespit edilebilmektedir. Bu nedenle; farklı fiziksel ve kimyasal özellikte molekül yapısına sahip lipit bileşenlerinin, eş zamanlı olarak tayini mümkün olmaktadır. Yağlarda mevcut nötral ve polar lipit bileşenlerinin tümünün tayin edebilmesine imkan sunan ELSD sistemi, başlıca üç kısımdan/bölümden oluşmaktadır.

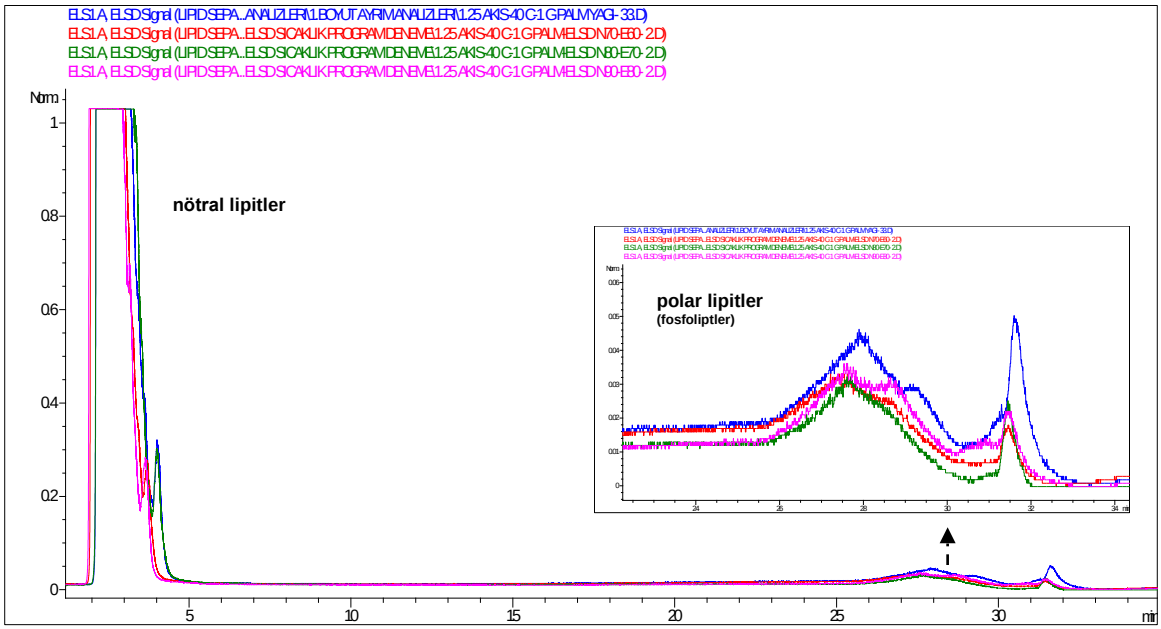
1. **<u>Nebülizasyon aşaması (eluentin sisleştirilmesi)</u>**: HPLC kolonundan gelen ve analitleri içeren eluent; nebülüzer olarak adlandırılan kısma girer. Burada, kullanılan inert bir gaz yardımıyla eluentin sisleştirilmesi yani küçük zerrecikler (aerosol) halini alması sağlanır. Yüksek hızda nebülüzere giren iner gaz molekülleri, küçük zerreciklerin oluşmasına yol açarken; düşük gaz akışları daha büyük zerreciklerin oluşmasına neden olmaktadır. Uçucu olmayan analitlerin çözücüsünden kısmen buharlaştırma ile ayrılması yoluyla bir sonraki aşamaya geçişini sağlamak/kolaylaştırmak amacıyla, nebülüzer kısmında yüksek sıcaklık uygulamasına ihtiyaç duyulmaktadır.
2. **<u>Buharlaştırma aşaması (çözücünün analitten tamamen uzaklaştırılması)</u>:** İnert gaz tarafından taşınan zerrecikler, bir sonraki aşama olan buharlaştırma tüpünün içerisine doğru yayılır. Buharlaştırma tüpüne giren zerreciklerin, düşük sıcaklıkta ısıtılarak hareketli faz çözücüsünden tamamen uzaklaştırılması sağlanır. Hareketli faz çözücüsü tamamen uzaklaştırıldıktan sonra ortamda sadece uçucu olmayan analitler

kalır. Buharlaştırma işlemi, numunede tayin edilecek analitlerin yapısına zarar vermeyecek, fakat hareketli faz çözüsünü tamamen uzaklaştıracak uygun bir sıcaklıkta gerçekleştirilmelidir. Buharlaştırma işlemi verimli yapılmadığı takdirde, dedektör sinyalinde belirgin gürültü meydana gelmektedir.

3. **Saçılan ışının dedeksiyon aşaması (saçılan ışının kaydedilmesi)**: Buharlaştırma işlemi sonucunda kalan yani uçucu olmayan yapılar, inert gaz yardımıyla "*flow cell*" olarak adlandırılan kısma sürüklenir. Flow cell hücresinde, partiküller üzerine gönderilen lazer ışın demeti molekül yüzeylerine çarpıp, molekül tarafından geri dağıtılır. Dağılan yani saçılan ışın demetlerinin yoğunluğu dedekte edilerek, elektrik sinyaline dönüştürülür ve "*milivolt (mV)*" cinsinden kaydedilir.

ELSD sisteminin kurulumu esnasında önerilen bazı aplikasyon notları (Agilent technologies, 2011) esas alınarak sıcaklık programlamaları uygulanmış ve analizlere başlanmıştır. $1^{st}$-D ayrım optimizasyon analizlerinden elde kromatogramlardan görüleceği üzere, oldukça gürültülü sinyaller elde edilmiştir. Sinyallerde meydana gelen bu istenmeyen durumun düzeltilebilmesi amacıyla, ELSD sisteminin iki önemli kısmına ait sıcaklık değerleri optimize edilmeye çalışılmıştır. Sinyallerde meydana gelen değişiklik esas alınarak, ve kemometrik yöntemlerden faydalanılarak daha detaylı şekilde optimizasyon çalışması yürütülmüştür. Buharlaştırma ve nebülizasyon sıcaklıklarının dedeksiyon kalitesine etkisinin incelendiği çalışmalarda, ham palm yağı numuneleri tercih edilmiştir. Diol yapılı sabit faz içeren SPE kolonlar ile yürütülen analizler için; farklı dedektör sıcaklıklarında (N60-E50; N70-E60; N80-E70 ve N90-E80°C) uygulamalar yapılmıştır (Çizelge 3.3). Analizler sonucu elde edilen kromatogramlar Şekil 4.5'de verilmiştir.

Elde edilen kromatogramlar incelendiğinde yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilen buharlaştırma işleminin, tayin edilecek lipit türlerinin yapısını bozarak piklerde farklılaşmaya neden olduğu görülmektedir. Düşük buharlaştırma sıcaklığında ($T_{buharlaştırma}$=50°C) yürütülen analizlerden elde edilen fosfolipit pikleri ile, yüksek sıcaklık uygulamalarından ($T_{buharlaştırma}$=80°C) elde edilen veriler karşılaştırıldığında, yüksek buharlaştırma uygulamalarında sinyal kalitelerinin düşük olduğu tespit edilmiştir. Bu durumun, teoride belirtilen şekilde yüksek sıcaklıkta gerçekleştirilen uygulamaların tayini hedeflenen türlerin yapısını bozmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.




**Şekil 4. 5.** I. boyut ayrım analizleri üzerine ELSD dedektör sıcaklıklarının etkisinin, ham palm yağı numuneleri kullanılarak incelendiği analizlerden elde edilen kromatogramlar

| | |
|---|---|
| Numune çözücüsü: | Polar lipid çözücü [hekzan: izopropanol: HAc (50:50:1.0, v/v/v)+0.08% trimetilamin] |
| Numune enjeksiyonu: | 2 µL (0.1mg yağ/µL) (Manuel enjeksiyon) |
| 1st-D SPE kolon: | LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm)+LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 250x4.6mm) |
| Akış hızı: | 1,25 mL/dk |
| Sıcaklık: | 40°C |
| ELSD programı: | **Neb. sıcaklığı 60- 70- 80- 90 °C, Buh. sıcaklığı 50- 60- 70- 80 °C,** Azot akış 1.6 SLM **N60;E50- N70;E60- N80;E70** ve **N90;E80°C** |

* Şekil 3.3'de yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.3'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

### 4.1.1.6. Optimum şartlarda gerçekleştirilen yağ analizleri

SPE tekniğinin uygulandığı I. boyut ($1^{st}$-D) ayrım analizleri için belirlenen optimum şartlarda farklı bitkisel yağ numuneleri için tayinler gerçekleştirilmiş ve elde edilen veriler Çizelge 4.2 ve Şekil 4.6'da sunulmuştur. Şekil 3.3'de yer alan sistem akışı kullanılarak yürütülen analizlerde belirlenen optimum metot parametreleri (Çizelge 3.3) genel olarak özetlenecek olursa;

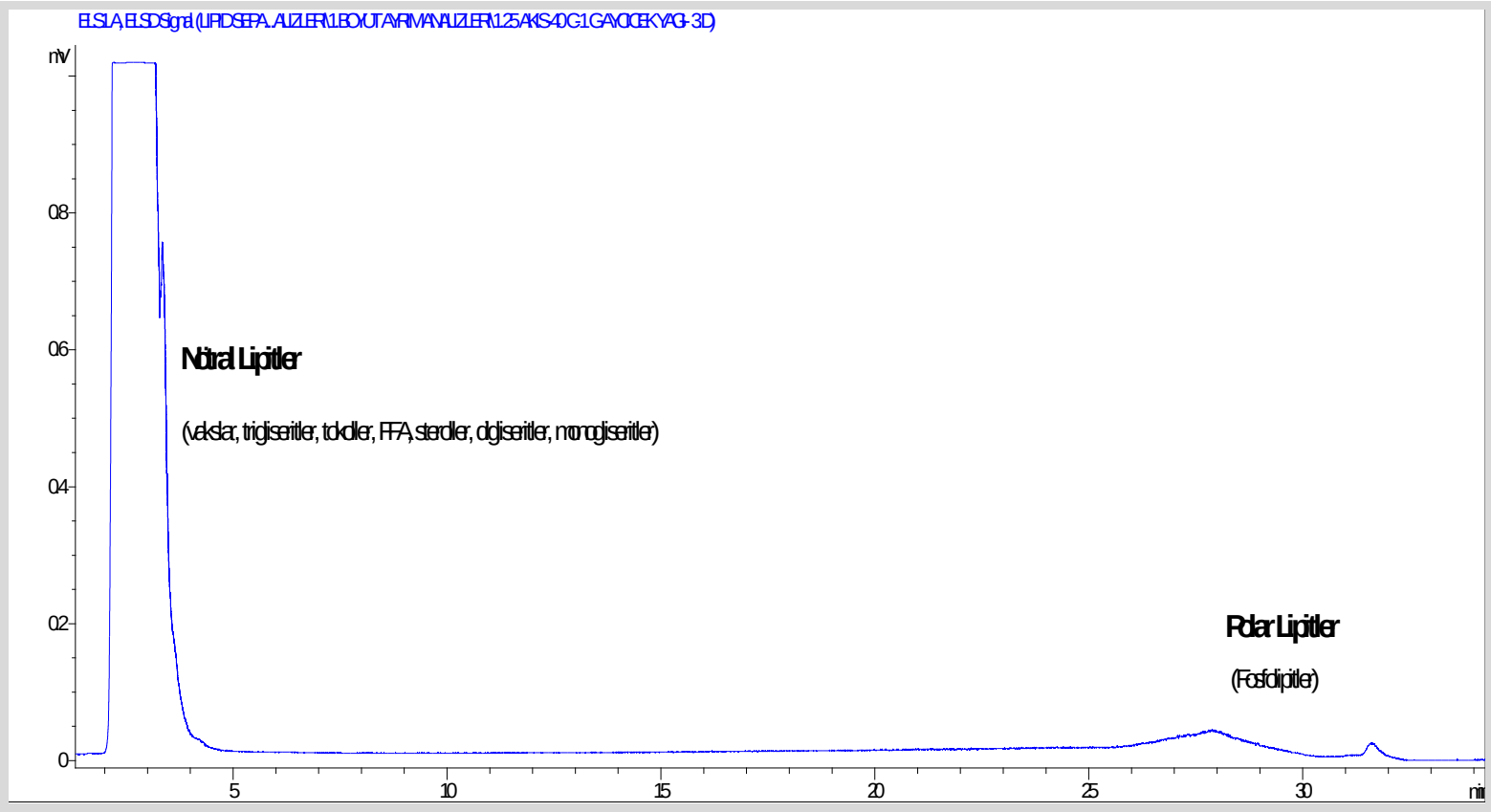
- **Numune çözücüsü:** Polar lipid çözücü sistemi [hekzan:izopropanol:HAc (50:50:1.0, v/v/v)+0.08% trimetilamin]
- **Numune enjeksiyonu:** 2 µL (0.1 mg yağ/µL yağ numunesi için)

- **1st-D SPE kolon:** LiChrospher 100A° Diol kolon (5µm,75x4.6mm) veya Inertsil Sil 100A° kolon (5µm,50x4.6mm)
- **Akış hızı:** 1,25 mL/dk
- **Sıcaklık:** 40°C
- **ELSD programı:** Neb. Sıc. 60°C, Buh. Sıc. 50°C, Azot akış hızı 1.6 SLM

**Çizelge 4. 1.** SPE tekniğinin uygulandığı I. boyut ayrım yöntemi ile gerçekleştirilen bitkisel yağ numunelerine ait sonuçları

| | **SPE tekniğinin uygulandığı I. boyut (1st-D) ayrım analizlerine ait sonuçlar** | |
|---|---|---|
| | **% NLs (Nötral Lipitler)** | **% PLs (Polar Lipitler)** |
| **Rafine ayçiçek yağı** | 95,87 ±0,02 | 4,13 ±0,02 |
| **Rafine mısır yağı** | 96,15 ±0,04 | 3,85 ±0,04 |
| **Rafine kanola yağı** | 95,85 ±0,03 | 4,15 ±0,03 |
| **Rafine soya yağı** | 95,24 ±0,03 | 4,76 ±0,03 |
| **Rafine fındık yağı** | 95,38 ±0,03 | 4,62 ±0,03 |
| **Rafine palm yağı** | 95,53 ±0,02 | 4,47 ±0,02 |
| **Ham palm yağı** | 94,15 ±0,04 | 5,85 ±0,04 |

* Şekil 3.3'de yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.3'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.




**Şekil 4. 6.** SPE tekniğinin uygulandığı I. boyut ayrım analizleri için tespit edilen optimum şartlarda gerçekleştirilen rafine ayçiçek yağı analizine ait kromatogram

| | |
|---|---|
| **Numune çözücüsü:** | Polar lipid çözücü sistemi [hekzan:izopropanol:HAc (50:50:1 v/v/v)+0.08% trimetilamin] |
| **Numune enjeksiyonu:** | 2 µL (0.1 mg yağ/µL) (Manuel enjeksiyon) |
| **1st-D SPE kolon:** | LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm) & Inertsil Sil 100A kolon (5µm 50x4.6mm) |
| **Akış hızı:** | 1,25 mL/dk |
| **Sıcaklık:** | 40°C |
| **ELSD programı:** | Neb. sıcaklığı 60°C, Buh.sıcaklığı 50°C, Azot gazı akış hızı 1.6 SLM |

* Şekil 3.3'de yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.3'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

### 4.1.2. NP-HPLC tekniğinin uygulandığı II. boyut ayrım ($2^{nd}$-D) analizleri

NP-HPLC tekniğinin uygulandığı II. boyut ayrım analizleri ile; I. boyut ayrım aşamasında iki ana fraksiyon halinde ayrılan nötral ve polar lipitlerin, $2^{nd}$-D HPLC kolona aktarılarak mevcut lipit bileşenlerine ayrımı ve tayini sağlanmıştır. I. boyut ayrım aşamasında toplu halde SPE kolondan izole edilen nötral lipit fraksiyonun; $2^{nd}$-D HPLC kolonda uygun hareketli faz sistemleri ile *trigliserit, tokol, FFA, sterol, digliserit* ve *monogliserit* türlerine; izole edilen polar lipit fraksiyonun ise; *fosfolipit* türlerine ayrılarak tayini gerçekleştirilmiştir. Sistemin tamamen işler hale getirilmesi için gerçekleştirilen optimizasyon çalışmalarının ikinci aşamasında; NP-HPLC tekniğinin uygulandığı II. boyut ayrım analizleri için optimizasyon çalışmaları yürütülmüştür.

Şekil 3.6'da yer alan sistem işleyişi ve Çizelge 3.5'de yer alan metot parametreleri kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir. Şekil.3.6'da yer alan sistem işleyişinden görüleceği üzere; SPE kolonu **(IV)** üzerinde izole edilen ilk fraksiyon yani toplu haldeki nötral lipit fraksiyonu, ELS dedektörde **(VII)** gözlemlendiği anda, valf-I (6PT/2PS) **(III)** ve valf-II (6PT/2PS) **(V)** sistemlerinin pozisyonları değiştirilmiştir. Valf pozisyonlarının değişmesi ile; SPE kolon **(IV)** üzerinde devam eden I. boyut ayrım analizinin, nötral lipit fraksiyonun tamamen izole edildiği, polar fraksiyonun ise ileriki aşamada ayrımı sağlanmak üzere kolonda bırakıldığı aşamada kesilmesi/ara verilmesi sağlanmıştır. Bu esnada; valf-II (6PT/2PS) **(V)** ve HPLC kolon **(VIII)** arasında kullanılan akış yolunda bulunan nötral lipit fraksiyonun, devam eden akışla birlikte II. boyut ayrım analizlerinin gerçekleştirildiği $2^{nd}$-D HPLC kolonuna **(VIII)** ulaşması sağlanmıştır. Sistem üzerine adapte edilen manuel splitter **(VI)** yani numune bölücü sistemi; I. boyut ayrım aşamasından elde edilen nötral lipit fraksiyonun ikiye bölünerek bir kısmının ELS dedektöre **(VII)**, diğer kısmının ise II. boyut ayrım analizlerinin gerçekleştirildiği $2^{nd}$-D HPLC kolonuna **(VIII)** yönlendirilmesini sağlamıştır. Yani; in-line kullanımı mümkün olmayan ve numunenin tamamen bozulmasına neden olan ELS dedektörün **(VII)**, sistem üzerinde aktif kullanımına ve fraksiyonların I. boyut ayrım aşamasından, II. boyut ayrım aşamasına aktarılması sağlanmıştır. II. boyut ayrım aşamasına aktarılan nötral lipit fraksiyonun, mevcut lipit bileşenlerine ayrımı için $2^{nd}$-D HPLC kolonuna **(VIII)** ulaşmasıyla birlikte; *"II. boyut ayrım aşaması"*na tamamen geçiş sağlanmıştır. II. boyut ayrım aşamasında; pompa **(I)** üzerinde oluşturulan yeni bir gradient program ile, nötral lipit çözücü sistemi/ hareketli faz karışımı sisteme gönderilmiştir. Valf-I (6PT/2PS) **(III)** ve valf-II (6PT/2PS) **(V)** sistemleri için seçilen

uygun pozisyonlarla sağlanan bu işlem ile; 2nd-D HPLC kolonu **(VIII)** üzerinde nötral lipit fraksiyondaki türlerin ayrımı sağlanmıştır. II. boyut ayrım aşamasında elde edilen kromatogramlar; I. boyut ayrımda olduğu gibi ELS dedektör **(VII)** ile kaydedilmiştir.

Hekzan, polar lipit çözücü [hekzan:izopropanol:HAc;(50:50:1.0,v/v/v)+0.08% trimetilamin] ve nötral lipit çözücü [hekzan:HAc; (99:1.0, v/v)] sistemlerinde hazırlanan yağ numuneleri ve lipit standartları kullanılarak; herhangi bir fraksiyon toplama işlemi yapılmadan, yağın direk enjeksiyonu ile analizler yürütülmüştür (Şekil 3.6). Silika yada diol yapılı sabit faz içeren HPLC kolonları ile gerçekleştirilen tayinlerde; farklı yağ numuneleri kullanılarak optimizasyon çalışmaları yürütülmüş ve en uygun metot parametrelerine karar verilmiştir.

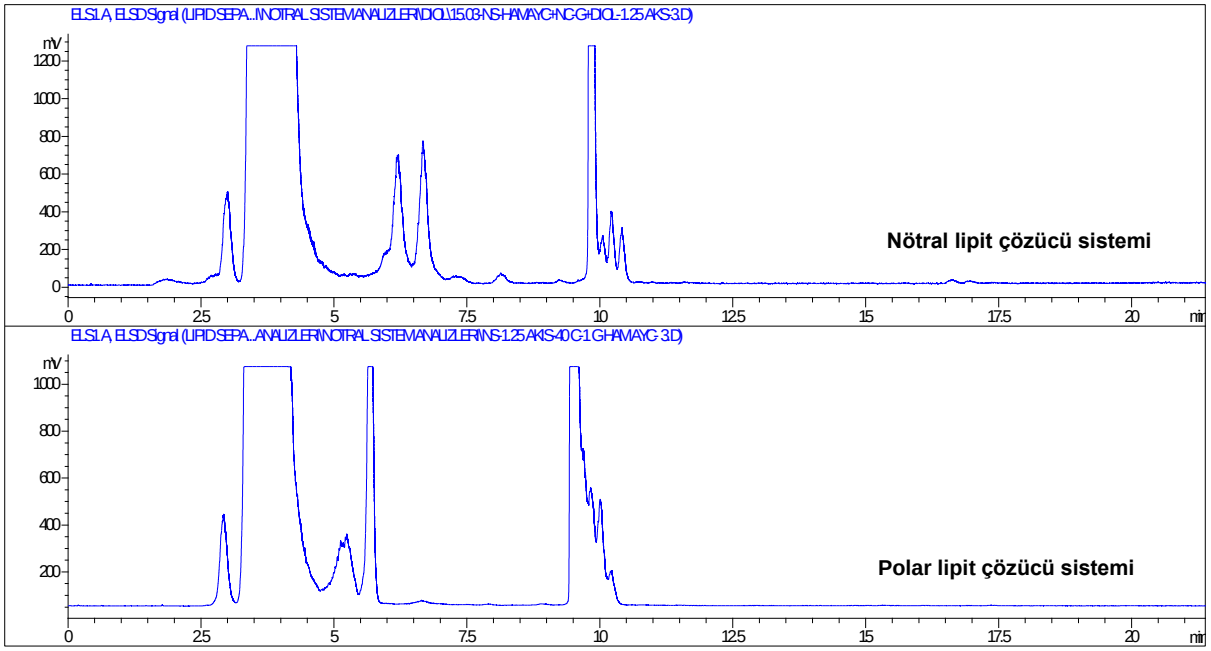
Optimizasyon çalışmalarından elde edilen sonuçlarla ilgili detaylı bilgiler, ilgili başlıklar altında sunulmuştur.

#### 4.1.2.1. Numune çözücü türü etkisi

II. boyut ayrım aşamasında; diol ve silika yapılı HPLC kolonlar üzerinde ayçiçek ve palm yağı numuneleri kullanılarak; numune çözücü sistemlerinin etkisine dair bazı analizler yürütülmüştür. Kromatografik ayırmalarda bilindiği üzere; sürekli akış halinde devam eden hareketli faz sistemine enjekte edilen numune ve özelliği büyük önem arz etmektedir. Özellikle, kromatografik ayrım öncesinde numune yapısını/özelliğini etkileyen en önemli faktör; numune hazırlanmasında kullanılan çözücü sistemleridir. Numune hazırlama işlemlerinde kullanılan çözücülerin; hareketli faz sistemleri yanında oluşturduğu farklılık, elde edilen ayrımlardan kolaylıkla görülebilmektedir.

Lipit bileşenlerinin 2nd-D ayrımları için yürütülen analizler; Silversand ve ark. (1997) tarafından önerilen çalışmaya ait metot şartları esas alınarak oluşturulmuş /optimize edilmiştir. Belirtilen çalışma; nötral lipit fraksiyon içerisindeki türlerin tayini için nötral lipit çözücü sistemini [hekzan:HAc; (99:1.0, v/v)]; polar lipit fraksiyon içerisindeki türlerin ayrımı için ise polar lipit çözücü [hekzan:izopropanol:HAc; (50:50:1.0,v/v/v)+0.08% trimetilamin] sistemini önermektedir. Önerilen analiz sistemi üzerinde; birleştirilmiş çok boyutlu ayrım analizlerine geçildiğinde, literatürde önerilen numune çözücü sistemlerinin uygunluğunu incelemenin, doğru bir yaklaşım olacağı düşünülmüştür. Bu amaç doğrultusunda yürütülen analizlerde; *polar lipit çözücü sistemi* [hekzan:izopropanol:HAc;(50:50:1.0,v/v/v)+0.08% trimetilamin], *nötral lipit çözücü*

*sistemi* [hekzan:HAc; (99:1.0, v/v)] ve *hekzan* (100%) ile hazırlanan yağ numuneleri kullanılmıştır. Numune çözücü türünün etkisinin incelendiği deneylerden elde edilen kromatogramlar, karşılaştırmalı olarak Şekil 4.7, 4.8 ve 4.9 'da verilmiştir.




**Şekil 4. 7.** II. boyut ayrım analizleri üzerine numune çözücü sistemi etkisinin, ham ayçiçek yağı numunesi kullanılarak incelendiği analizlerden elde edilen kromatogramlar

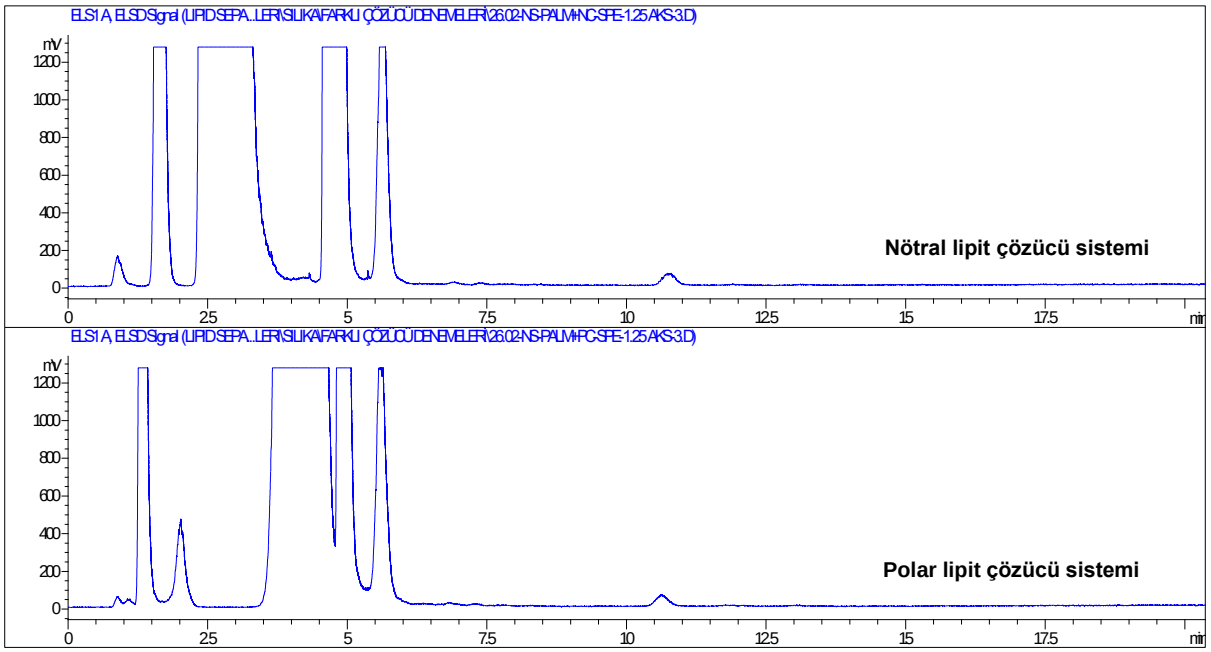
| | |
|---|---|
| Numune çözücüsü: | **Nötral lipid çözücü sistemi [hekzan:asetik asit (99:1.0, v/v)]** ve **Polar lipid çözücü [hekzan:izopropanol:asetik asit (50:50:1.0, v/v/v)+0.08% trimetilamin]** |
| Numune enjeksiyonu: | 5 µL (0.1mg yağ/ µL) (Otomatik enjeksiyon) |
| 2nd-D HPLC kolon: | LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm) |
| Akış hızı: | 1,25 mL/dk, |
| Sıcaklık: | 40°C |
| ELSD programı: | Neb. sıcaklığı 60°C, Buh.sıcaklığı 50 °C, Azot gazı akış 1.6 SLM |

*Şekil. 3.6.'da yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.5.'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

Şekil 4.7'de yer alan ve diol yapıya sahip HPLC kolonu ile gerçekleştirilen analiz sonuçları incelendiğinde; kullanılan numune çözücülerinin ayrımlar üzerinde belirgin bir farklılık oluşturduğu görülmektedir. bu farklanmanın temelde; çözücü sistemlerinde kullanılan çözücülerin elüsyon kuvvetlerindeki farklıktan kaynaklandığı düşünülmektedir. $\epsilon°$ ve $P'$ değerleri daha yüksek olan çözücülerden meydana gelen polar lipit çözücü sistemi; numune içerisindeki türlerin alıkonma süresi ve $k'$ değerlerini azaltmaktadır. Bununla birlikte; türlerin ayrımında istenilen $Rs$ değerlerinin azalmasına dolayısıyla; III. boyut ayrım aşamasına fraksiyonlar halinde ulaştırılması hedeflenen türlerin, ayrımlarının zorlaştırmasına neden olmaktadır. Daha düşük $\epsilon°$ ve $P'$ değerlerine sahip nötral çözücü sisteminde ise; nötral lipit fraksiyon içerisinde mevcut

türlerin (*trigliserit, tokol, FFA, sterol, digliserit* ve *monogliseritler*), ayrım düzeylerinin daha iyileştirilmiş olduğu görülmektedir. Numune çözücü sistemlerinde yer alan solventlerin; buharlaşma kabiliyetlerinin de elde edilen sinyal kalitesi ve ayrımlar üzerinde, az da olsa etkili olduğu düşünülmektedir. ELSD sisteminin buharlaşma kısmına aeresol halinde ulaşan analitlerin; mevcut çözücü moleküllerinden buharlaşma yoluyla uzaklaştırılması, elde edilen türlere ait sinyal kalitesine etki etmektedir. Daha az buharlaşma kabiliyetine sahip izopropanol'ün ($T_{buh}$=82.6°C), hekzan'a kıyasla ($T_{buh}$=68.5-69.1°C) daha güç şekilde analitten uzaklaşması; sinyallerin daha gürültülü elde edilmesine neden olabilmektedir. Bu nedenle; ELSD sisteminde yapılan analizlerde; buharlaşma kabiliyeti daha yüksek çözücülerin tercihi, daha sağlıklı bir yaklaşım sunmaktadır.

Benzer analizler; silika yapılı sabit faz içeren HPLC kolonu ile tekrarlanarak, karşılaştırmalı olarak sonuçlar verilmiştir (Şekil 4.8).

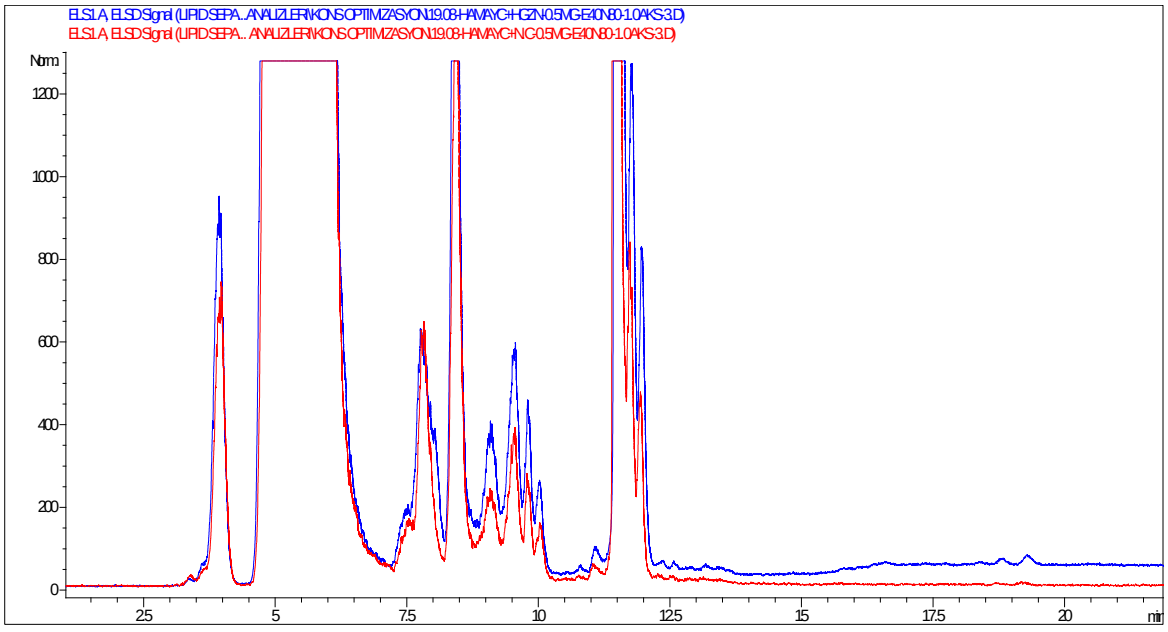



**Şekil 4. 8.** II. boyut ayrım analizleri üzerine numune çözücü sistemi etkisinin, ham palm yağı numunesi kullanılarak incelendiği analizlerden elde edilen kromatogramlar

| | |
|---|---|
| Numune çözücüsü: | **Nötral lipid çözücü sistemi [hekzan: asetik asit (99:1.0, v/v)]** ve **Polar lipid çözücü [hekzan: izopropanol: asetik asit (50:50:1.0, v/v/v)+0.08% trimetilamin]** |
| Numune enjeksiyonu: | 5 µL (0.1mg yağ/ µL) (Otomatik enjeksiyon) |
| 2nd-D HPLC kolon: | Inertsil Sil 100A kolon (5µm 50x4.6mm) |
| Akış hızı: | 1,25 mL/dk |
| Sıcaklık: | 40°C |
| ELSD programı: | Neb. sıcaklığı 60°C, Buh.sıcaklığı 50 °C, Azot gazı akış 1.6 SLM |

* Şekil. 3.6.'da yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.5.'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

Şekil 4.8'de yer alan kromatogramlar incelendiğinde; numune çözücü sistemlerinin, diol yapılı HPLC kolon ayırmalarında olduğu gibi, belirgin bir farklanma oluşturduğu görülmektedir. Palm yağı numunesi kullanılarak yürütülen analizlerde; polar yapılı çözücü sistemlerinin, numunede mevcut apolar türlerin alıkonma süresi ve *k'* değerlerini azalttığı tespit edilmiştir. Lipit türlerinin *Rs* değerlerini azaltarak, III. boyut ayrım aşamasına fraksiyon halinde aktarılacak türlerin, ayrımlarını kötüleştirmektedir. Daha düşük $\epsilon^{\circ}$ ve *P'* değerlerine sahip nötral çözücü sisteminde ise; lipit bileşenlerinin alıkonma süresi, *k'* ve *Rs* değerlerinin oldukça iyileştirilmiş ve kabul edilebilir düzeyde olduğu görülmektedir. Sonuç olarak; yüksek buharlaşma kabiliyetine, bunun yanında düşük $\epsilon^{\circ}$ ve *P'* değerlerine sahip nötral çözücü sisteminin, bitkisel yağ numunelerinin hazırlanması için daha uygun karışım olduğu kanaatine varılmıştır. Numune çözücü sistemleri için yürütülen deneylerin son aşamasında; literatürde Silversand ve ark. (1997) tarafından önerilen nötral çözücü sistemine alternatif olarak düşünülen, hekzanın etkisi incelenmiştir (Şekil 4.9).




**Şekil 4. 9.** II. boyut ayrım analizleri üzerine numune çözücü sistemi etkisinin, ham ayçiçek yağı numunesi kullanılarak incelendiği analizlerden elde edilen kromatogramlar

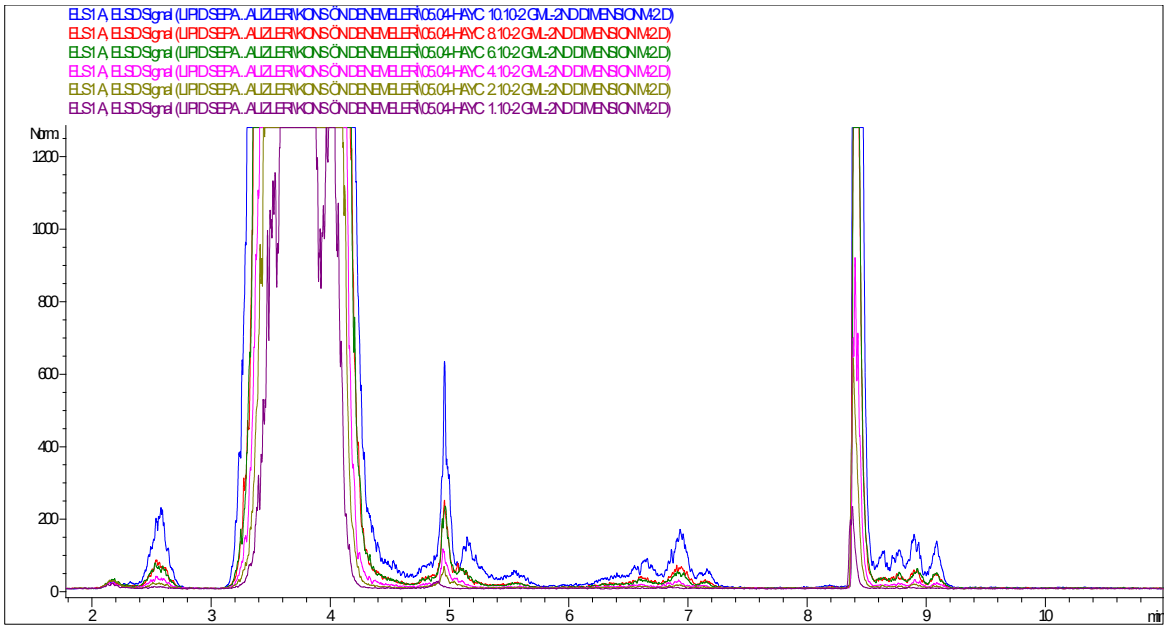
| | |
|---|---|
| Numune çözücüsü: | **Nötral lipid çözücü sistemi [hekzan: asetik asit (99:1.0, v/v)]** ve **Hekzan** |
| Numune enjeksiyonu: | 5 µL (0.1mg yağ/µL) (Otomatik enjeksiyon) |
| 2nd-D HPLC kolon: | LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm) + LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 250x4.6mm) |
| Akış hızı: | 1,25 mL/dk |
| Sıcaklık: | 40°C |
| ELSD programı: | Neb. sıcaklığı 80°C, Buh.sıcaklığı 40°C, Azot gazı akış 1.5 SLM |

* Şekil. 3.6.'da yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.5'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

Hekzan'a ($T_{buharlaşma}$=68.5-69.1°C) kıyasla daha düşük buharlaşma kabiliyetine sahip asetik asidin ($T_{buharlaşma}$=118.1°C); sistemden tamamen bertaraf edilmesiyle ayrımların ne derece farklandığı tespit edilmeye çalışılmıştır. Diol yapılı kolon üzerinde yürütülen analizlerde; hekzan çözücüsünde hazırlanan numune analizlerinde ayrımlarda herhangi bir farklılığın meydana gelmediği görülmektedir. Hekzan ile hazırlanan numune analizinde; sinyal değerinin yükseldiği ve lipit türlerinin dedeksiyonunun daha iyileştirilmiş olduğu tespit edilmiştir. Sinyal yükselmesinde meydana gelen bu durumun, daha önce belirtilen çözücü sistemlerinin buharlaşma kabiliyetlerindeki farklılığın kaynaklandığı düşünülmektedir. 118.1°C kaynama noktası değeri ile; daha zor buharlaşma kabiliyetine sahip asetik asidin, numune çözme işleminde kullanılmaması, sinyal değerlerinin yükselmesine neden olmuştur. Sonuç olarak; numune hazırlama çözücüsü olarak, türlerin bir aşamadan diğerine aktarımında farklılık oluşturmayan ve yüksek sinyal kalitesine sahip sonuçların eldesini mümkün kılan hekzan çözücüsünü kullanmanın, daha uygun bir yaklaşım olduğu kanaatine varılmıştır.

#### 4.1.2.2. Numune miktarı etkisi

Numune miktarı etkisinin incelendiği çalışmalarda; nötral lipit çözücü sisteminde hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki (0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,30; 0,40 ve 0,50 mg yağ/µL) ayçiçek yağı numuneleri ile analizler gerçekleştirilmiştir. Diol yapılı $2^{nd}$-HPLC kolon üzerinde gerçekleştirilen analizlerde; nötral lipit A [*hekzan: asetik asit (99:1.0, v/v/v)*] ve nötral lipit B [*hekzan: izopropanol: asetik asit (84:15:1.0, v/v/v)*] çözücü sistemleri ile oluşturulan gradient program uygulanmıştır (Çizelge 3.5) (Silversand ve ark.; 1997). Numune miktarının nötral lipit türlerinin davranışları üzerine olan etkisini incelemek için yürütülen analizlere ait kromatogramlar, karşılaştırmalı olarak Şekil 4.10'da verilmiştir.




**Şekil 4. 10.** II. boyut ayrım analizleri üzerine numune miktarı etkisinin, ham ayçiçek yağı numunesi kullanılarak incelendiği analizlerden elde edilen kromatogramlar

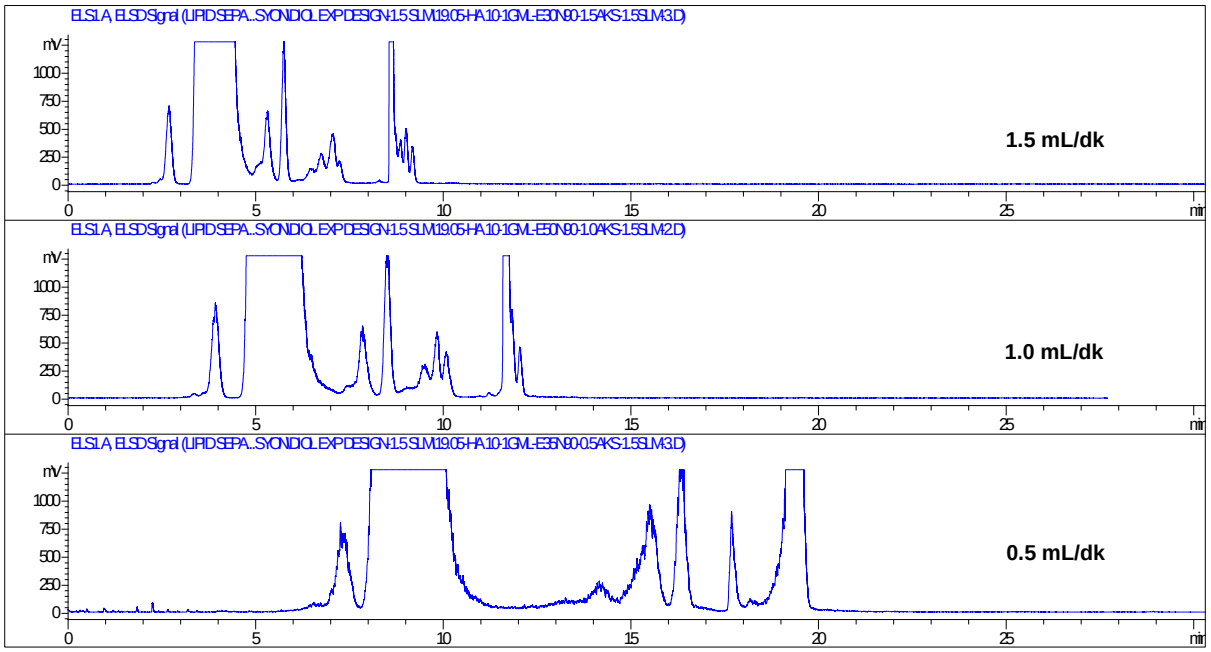
| | |
|---|---|
| Numune çözücüsü: | Nötral lipid çözücü sistemi [hekzan: asetik asit (99:1.0, v/v)] |
| Numune enjeksiyonu: | 5 µL (Otomatik enjeksiyon) (0.01- 0.02- 0.04- 0.06- 0.08- 0.1 mg yağ/ µL) |
| Kolona yüklenen miktar: | — **0.5 mg,** — **0.4 mg,** — **0.3 mg ,** — **0.2 mg,** — **0.1 mg,** — **0.05 mg yağ** |
| 2nd-D HPLC kolon: | LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm) + LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 250x4.6mm) |
| Akış hızı: | 1.25 mL/dk |
| Sıcaklık: | 40°C |
| ELSD programı: | Neb. sıcaklığı 60°C, Buh.sıcaklığı 50 °C, Azot gazı akış 2 SLM |

* Şekil. 3.6.'da yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.5.'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

Şekil 4.10'da yer alan kromatogramlardan görüleceği üzere; bir önceki aşamada uygulanan numune konsantrasyonlarının, oldukça altında hazırlanan numuneler ile çalışmalar yürütülmüştür. Yüksek miktarda numune enjeksiyonları ile kolon kapasitesinin aşılması ve kolonun analitleri ayırma kabiliyetinin azalması nedeniyle; çok düşük konsantrasyonlar için analizler gerçekleştirilmiştir. Analiz edilen numunelerden; sadece 0,1 mg yağ/µL konsantrasyon için 5 µL şeklinde yapılan uygulamanın, istenilen düzeyde lipit dedeksiyonu sağlanabildiği tespit edilmiştir. Daha düşük konsantrasyonlar ile; özellikle trigliserit türlerinin dedeksiyonunun iyileştirilmesi hedeflenmiş, fakat beklenildiği gibi sonuçlar alınamamıştır. Numune miktarı azaldıkça; sinyal kalitesinde ve elde edilen piklerde yayvanlaşma ve simetrilerinde istenmeyen değerler tespit edilmiştir. Bu nedenle çalışmalara, 0,1 mg yağ/µL konsantrasyondaki numunelerin 5µL enjeksiyonu ile devam edilmesine karar verilmiştir.

### 4.1.2.3. Akış hızı etkisi

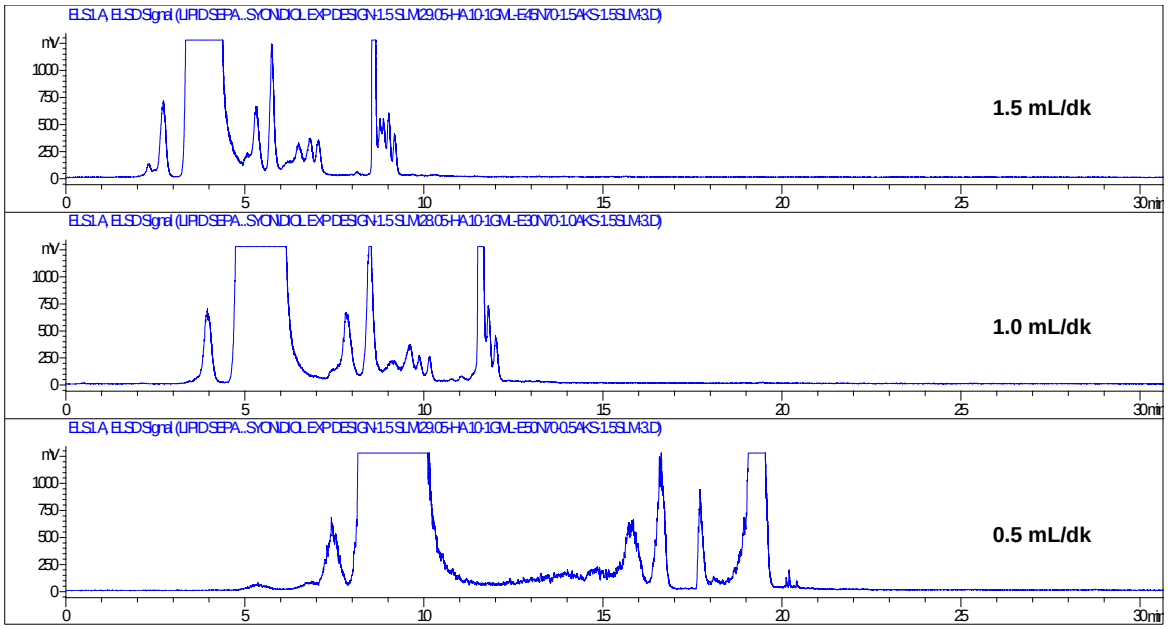
Nötral lipit türlerinin 2nd-D HPLC kolon ile ayrımlarının gerçekleştirildiği analizlerde; hareketli faz akış hızının, türlerin ayrımları üzerine etkisi incelenmiştir. Akış hızı etkisinin incelendiği çalışmalarda; ham ayçiçek yağı numuneleri kullanılmıştır. Nötral çözücü sisteminde hazırlanan yağ numuneleri kullanılarak, farklı akış hızlarında (0,50; 0,75; 1,00; 1,25 ve 1,50 mL/dk) analizler gerçekleştirilmiştir. Analizler sonucu elde edilen kromatogramlar, karşılaştırmalı olarak Şekil 4.11 ve 4.12'de verilmiştir.




**Şekil 4. 11.** II. boyut ayrım analizleri üzerine hareketli faz akış hızı etkisinin, ham ayçiçek yağı numunesi kullanılarak incelendiği analizlerden elde edilen kromatogramlar

| | |
|---|---|
| Numune çözücüsü: | Nötral lipid çözücü sistemi [hekzan: asetik asit (99:1.0, v/v)] |
| Numune enjeksiyonu: | 5 µL (0.1mg yağ/ µL çözücü) (Otomatik enjeksiyon) |
| 2nd-D HPLC kolon: | LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm)+LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 250x4.6mm) |
| Akış hızı: | **--0.50 --1.00 --1.25 mL/dk** |
| Sıcaklık: | 40°C |
| ELSD programı: | Azot gazı akış 1.5 SLM |
| | **----N90;E30- N90;E50- N90;E35°C** |

* Şekil. 3.6.'da yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.5.'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.




**Şekil 4. 12.** II. boyut ayrım analizleri üzerine hareketli faz akış hızı etkisinin, ham ayçiçek yağı numunesi kullanılarak incelendiği analizlerden elde edilen kromatogramlar

| | |
|---|---|
| Numune çözücüsü: | Nötral lipid çözücü sistemi [hekzan: asetik asit (99:1.0, v/v)] |
| Numune enjeksiyonu: | 5 µL (0.1mg yağ/ µL çözücü) (Otomatik enjeksiyon) |
| 2nd-D HPLC kolon: | LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm)+LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 250x4.6mm) |
| Akış hızı: | **--0.50 --1.00 --1.25 mL/dk** |
| Sıcaklık: | 40°C |
| ELSD programı: | Azot gazı akış 1.5 SLM |
| | **----N70;E50- N70;E45- N70;E30°C** |

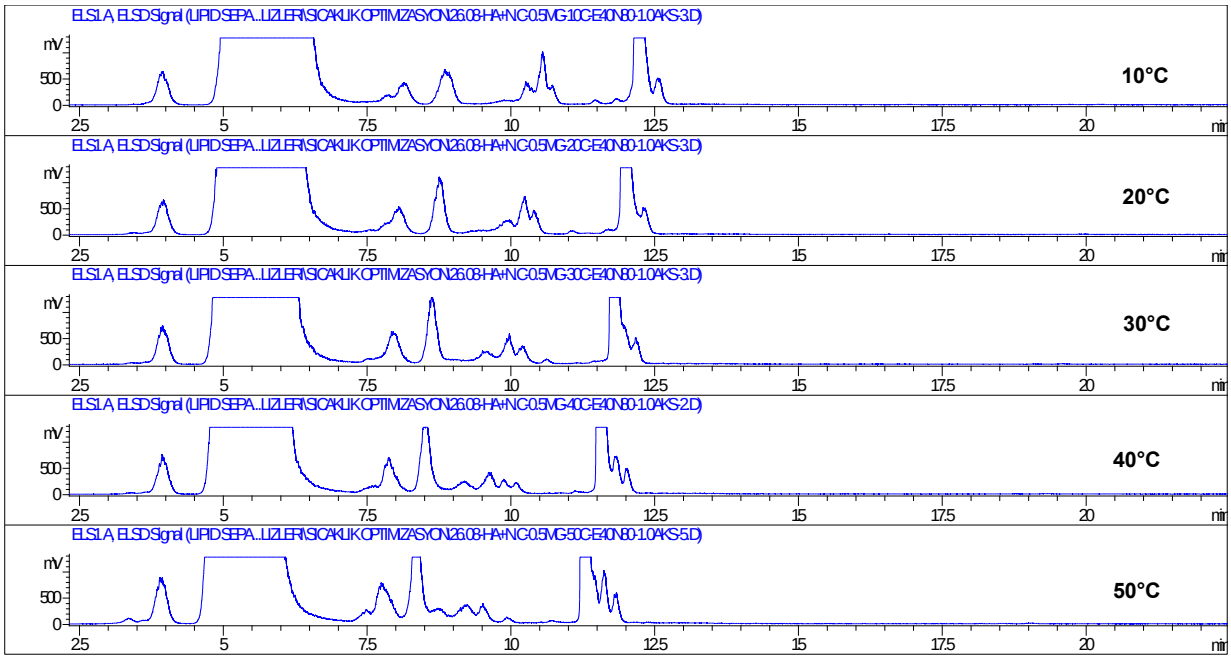
* Şekil. 3.6.'da yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.5.'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

Her iki uygulama için elde edilen veriler karşılaştırıldığında; düşük akış hızlarındaki kromatogramlarda sinyal kalitelerinin istenmeyen düzeyde olduğu görülmektedir. Hareketli faz akış hızlarındaki artışla birlikte (1.00 ve 1.25 mL/dk), sinyal değerlerinde belirgin bir iyileşme tespit edilmiştir. Bu durumun; ELSD sistemindeki nebülizasyon işlemi esnasında/ basamağında; düşük akış hızlarında sisteme giriş yapan eluent ile, istenilen düzeyde/büyüklükte aeresol oluşumunun sağlanamamasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Yüksek hareketli faz akış hızlarında, inert gaz ile iyi aeresol yapılarının oluşturulabilmesi sinyal kalitesini belirgin şekilde iyileştirmektedir. Bu durum aynı zamanda; artan hareketli faz akışı ile, kolonda bulunan lipit moleküllerinin hareketliliğinin arttırılması ve hareketli-sabit fazlar arasındaki dengenin en etkin ayırmayı sağlayacak şekilde sağlanmış olması ile ilişkilendirilmiştir. Optimum akış hızına karar verilirken; karşılaştırma yapılan akış hızlarının nötral lipit türlerinin *k'*, *Rs* ve alıkonma süresi değerlerine etkisi göz ardı

edilmemelidir. İstenilen düzeyde ayırma verimliliği sağlanan 1.00 mL/dk akış hızının, her iki uygulama için de tercih edilebilir değer olduğu kanaatine varılmıştır.

### 4.1.2.4. Sıcaklık etkisi

II. boyut ayrım analizlerinin optimizasyonu için yürütülen bir diğer önemli çalışma ise; sıcaklık etkisi üzerine yapılan analizlerdir. Daha önceki tecrübelerimizden; kolon fırınında yapılan sıcaklık değeri uygulamasının, analitlerin kromatografik davranışlarına önemli derecede etki ettiği bilinmektedir. Sıcaklık etkisinin incelendiği analizler; diol HPLC kolon kullanılarak, 0.1 mg yağ/µL şeklinde hazırlanan numuneler ile farklı sıcaklıklarda (10; 20; 30; 40 ve 50°C) gerçekleştirilmiş ve elde edilen kromatogramlar, karşılaştırmalı olarak Şekil 4.13'de verilmiştir.




**Şekil 4. 13.** II. boyut ayrım analizleri üzerine kolon sıcaklığı etkisinin, ham ayçiçek yağı numunesi kullanılarak incelendiği analizlerden elde edilen kromatogramlar

| | |
|---|---|
| Numune çözücüsü: | Nötral lipid çözücü sistemi [hekzan: asetik asit (99:1.0, v/v)] |
| Numune enjeksiyonu: | 5 µL (0.1mg yağ/ µL) (Otomatik enjeksiyon) |
| 2nd-D HPLC kolon: | LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm)+LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 250x4.6mm) |
| Akış hızı: | 1 mL/dk |
| Sıcaklık: | --10 --20 --30 --40 --50°C |
| ELSD programı: | Neb. sıcaklığı 80°C, Buh.sıcaklığı 40 °C, Azot gazı akış 1.5 SLM |

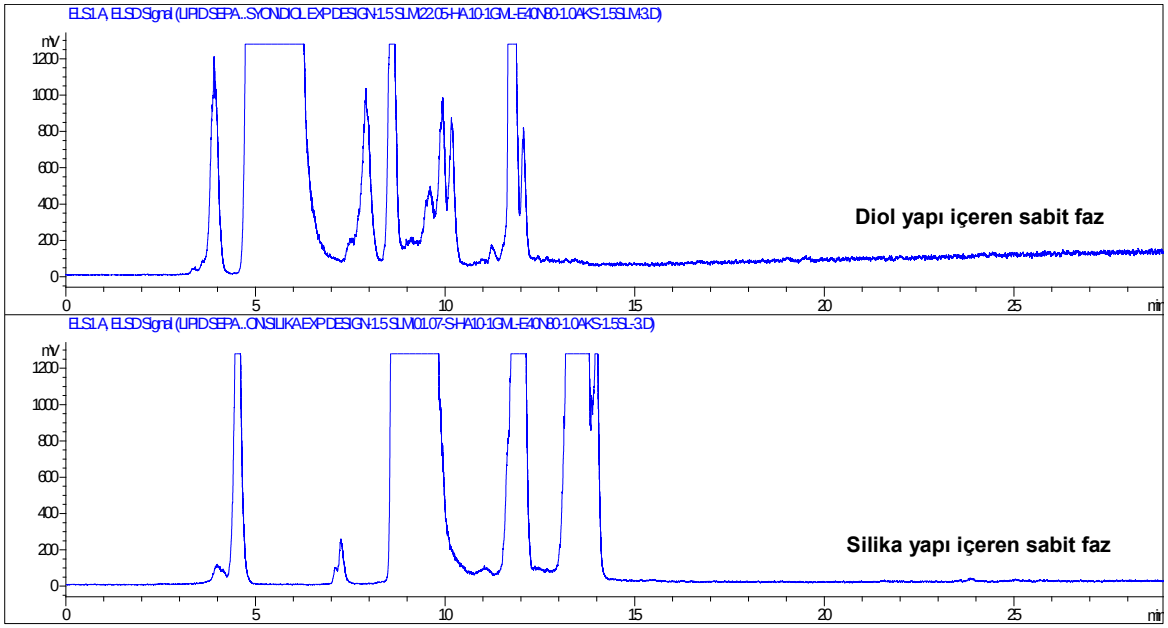
* Şekil. 3.6.'da yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.5.'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

Şekil 3.6'da yer alan sistem kullanılarak, sıcaklık optimizasyonu üzerine yürütülen analizler; tespit edilen optimum deney parametreleri ile tamamlanmıştır. Şekil 4.13'de yer alan kromatogramlardan; sıcaklık değeri arttıkça, özellikle nötral fraksiyon içerisinde yer alan daha polar yapıların ait alıkonma süresi, $Rs$ ve $k'$ değerlerinin azaldığı görülmektedir. Bununla birlikte, sıcaklık artışı ile daha polar özellikteki lipit türlerinin tayinlerinin iyileştirilebildiği gözlemlenmiştir. Bu durumun; kolon çıkışında analitlerin içerisinde bulunduğu eluentin sahip olduğu sıcaklık değeri ile ELSD programında uygulanan sıcaklık programının doğrudan bağlantılı olmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Diğer yandan, kullanılan kolonun yapısını bozucu etki gösterebilecek ve kullanma talimatına uygun olmayan daha yüksek sıcaklık uygulamalarına geçilmemiştir. En yüksek 50°C uygulaması yapılan analizlerden; 40°C'de kaydedilen kromatogramdan (Şekil 4.13), lipit türlerinin başarılı bir şekilde tayin edilebileceği görülmektedir. Sonuç olarak; kolondan daha geç elue edilen türlerin, istenilen düzeyde kromatografi pik şekline ve Rs değerine sahip olabilmeleri için, sıcaklık değerindeki artışın faydalı olacağı kanaatine varılmıştır.

#### 4.1.2.5. Sabit faz türü etkisi

Bitkisel yağ analizleri için önerilen On-line SPE-FIA-HPLC analiz sisteminin oluşturulmasında; lipit bileşenlerinin istenilen düzeyde ayrımını sağlayacak sabit faz yapılarının/ kolonların seçimi, büyük önem arz etmektedir. Geliştirilen sistem üzerinde genel itibariyle; normal-faz kromatografik ayrımların gerçekleştirildiği metotlar oluşturulmaktadır.

Farklı polarite değerine sahip lipit bileşenlerinin karışımı olan bitkisel yağ numunelerinde; geniş bir aralıktaki polarite değerine hitap edebilecek sabit faz ve hareketli faz seçimleri yapılmaktadır. Bunun için en yaygın kullanım alanına sahip kolon, silika kolonlar olmakla birlikte; alternatif olarak siyano, amino ve diol bağlı kolonlar kullanılmaya başlanmıştır. Nötral ve polar lipit türlerinin tayini için örnek alınan literatür çalışmasında (Silversand ve ark.; 1997) önerilen diol yapılı kolon, ve alternatif olarak düşündüğümüz silika kolon ile analizler yürütülmüştür. Silika kolon olarak Inertsil Sil 100A kolon (5µm,50x4.6mm)+(5µm, 250x4.6mm); diol kolon olarak ise LiChrospher 100A Diol kolon (5µm,75x4.0mm)+(5µm,250x4.0mm) kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kromatogramlar, karşılaştırmalı olarak Şekil 4.14.'de verilmiştir.




**Şekil 4. 14.** II. boyut ayrım analizleri üzerine sabit faz yapısı etkisinin, ham ayçiçek yağı numunesi kullanılarak incelendiği analizlerden elde edilen kromatogramlar

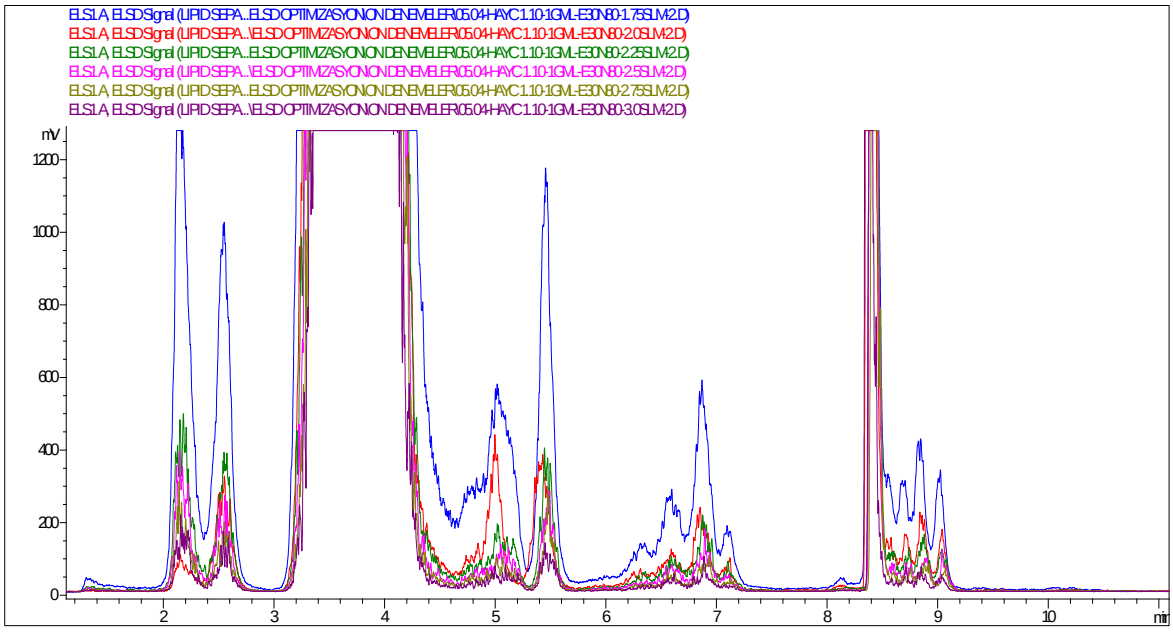
| | |
|---|---|
| Numune çözücüsü: | Nötral lipid çözücü sistemi [hekzan: asetik asit (99:1.0, v/v)] |
| Numune enjeksiyonu: | 5 µL (0.1 mg yağ/µL) (Otomatik enjeksiyon) |
| 2nd-D HPLC kolon: | **LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm)+LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 250x4.6mm)** |
| | **Inertsil Sil 100A kolon(5µm 50x4.6mm) + Inertsil Sil 100A kolon (5µm 250x4.6mm)** |
| Akış hızı: | 1 mL/dk |
| Sıcaklık: | 40°C |
| ELSD programı: | Neb. sıcaklığı 80°C, Buh.sıcaklığı 40 °C, Azot gazı akış 1.5 SLM |

*Şekil. 3.6.'da yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.5.'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

Şekil 4.14'de yer alan kromatogramlardan görüleceği üzere; her iki sabit faz yapısının, lipit türlerinin ayrımı için etkin olduğu ve farklı amaçlara göre kullanılabilecekleri görülmektedir. Silika yapılı sabit fazlar ile yapılan ayrımlar; I. boyut ayrım aşamasında belirtildiği gibi türlerin alıkonma sürelerinin geciktirilmesi, dolayısıyla bir sonraki aşmaya ($3^{rd}$-D ayrım aşamasına) fraksiyonların aktarımlarında kolaylık sağlayacaktır. Diol yapılı sabit fazlar ile gerçekleştirilen ayrımlarda ise; II. boyut ayrım aşamasında daha fazla lipit türünün, daha etkin ayrımlarının sağlanabileceğini görülmektedir. Normal-faz kromatografi ayrımlarında; silika yapılara alternatif olarak geliştirilen diol bağlı yapıların, geniş bir aralıktaki polarite değerine hitap edebileceği yapılan analizler ile kanıtlanmıştır. Sonuç olarak; diol yapılı sabit faz kolonlarının kullanımının, hedef lipit türlerinin ayrımı ve tayininde daha etkin olacağı kanaatine varılmıştır.

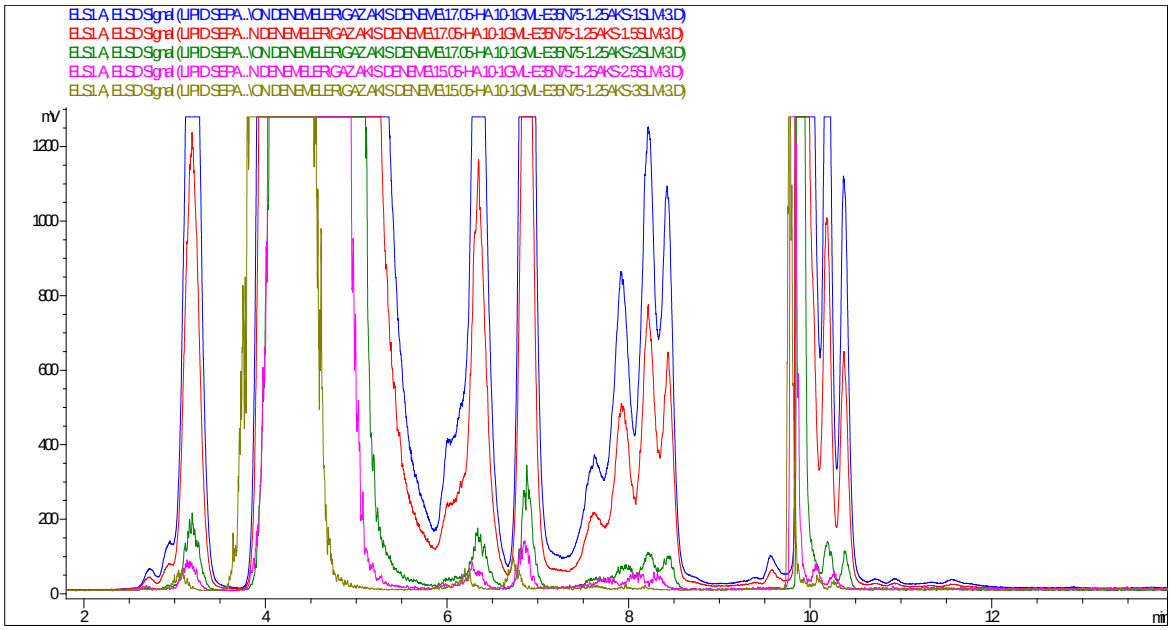
### 4.1.2.6. Azot gazı akış hızı etkisi

Lipit türlerinin dedeksiyonu için sistem üzerinde aktif olarak kullanılan ELSD sistemi ve çalışma prensibi hakkında, daha önceki aşamalarda detaylı olarak bilgi verilmeye çalışılmıştır (4.1.1.5.). Belirtilen sistem işleyişinde ilk olarak; HPLC kolonundan gelen ve analitleri içeren eluentin, aerosol haline getirilmesi söz konusudur. ELSD sisteminin çalışma prensibine dair literatürlerde (Megoulas, 2005; Karatapanis, 2011); sisleştirme oluşumunun elde edilecek sinyal kalitesini önemli derecede etkilediği, dolayısıyla istenilen düzeyde sinyal elde edebilmek için bu aşamada kullanılan gaz türünün ve akış hızının seçiminin önemli olduğu belirtilmektedir. Azot gazının akış hızının sinyaller üzerine etkisinin incelendiği analizler; 1.00; 1.50; 1.75; 2.00; 2.25; 2.50 ve 3.00 SLM gaz akışları ile gerçekleştirilmiş ve elde edilen kromatogramlar, karşılaştırmalı olarak Şekil 4.15 ve 4.16'da verilmiştir.




**Şekil 4. 15.** II. boyut ayrım analizleri üzerine azot gazı (sisleştirme gazı) akış hızı etkisinin, ham ayçiçek yağı numuneleri kullanılarak incelendiği analizlerden elde edilen kromatogramlar

| | |
|---|---|
| Numune çözücüsü: | Nötral lipid çözücü sistemi [hekzan: asetik asit (99:1.0, v/v)] |
| Numune enjeksiyonu: | 5 µL (0.1 mg yağ/ µL) (Otomatik enjeksiyon) |
| 2nd-D HPLC kolon: | LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm)+LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 250x4.6mm) |
| Akış hızı: | 1.25 mL/dk |
| Sıcaklık: | 40°C |
| ELSD programı: | Neb. sıcaklığı 80°C, Buh.sıcaklığı 30 °C |
| Azot gazı akış hızı; | – 1.75 SLM – 2.00 SLM – 2.25 SLM – 2.5 SLM – 2.75 SLM – 3.00 SLM |




**Şekil 4. 16.** II. boyut ayrım analizleri üzerine azot gazı (sisleştirme gazı) akış hızı etkisinin, ham ayçiçek yağı numuneleri kullanılarak incelendiği analizlerden elde edilen kromatogramlar

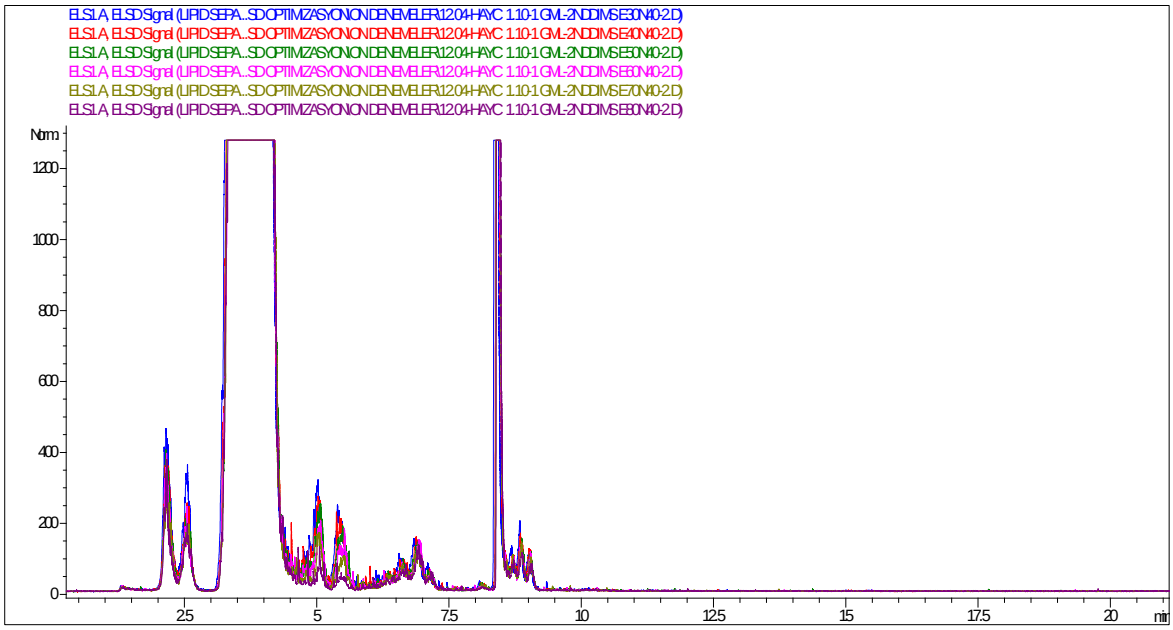
| | |
|---|---|
| Numune çözücüsü: | Nötral lipid çözücü sistemi [hekzan: asetik asit (99:1.0, v/v)] |
| Numune enjeksiyonu: | 5 µL (0.1mg yağ/ µL) (Otomatik enjeksiyon) |
| 2nd-D HPLC kolon: | LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm)+LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 250x4.6mm) |
| Akış hızı: | 1.25 mL/dk |
| Sıcaklık: | 40°C |
| ELSD programı: | Neb. sıcaklığı 75°C, Buh.sıcaklığı 35 °C |
| Azot gazı akış hızı; | — 1.0 SLM — 1.5 SLM — 2.0 SLM — 2.5 SLM — 3.0 SLM |

* Şekil. 3.6.'da yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.5.'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

Şekil 4.15 ve 4.16'da yer alan kromatogramlardan görüleceği üzere; sisleştirme gaz akışının değiştirilmesi, elde edilen sinyal/gürültü oranı değerini önemli derecede farklandırmaktadır. Optimum gaz akış hızının belirlenmesi için; elde edilen kromatogramların sinyal/gürültü oranı (S/N) değerleri esas alınarak değerlendirme yapılmıştır. ELSD için farklı sıcaklık programları uygulamalarında; gaz akış hızı denemelerinin yapılmasının uygun bir yaklaşım olacağı düşülmüş, ve çalışmalar bu yönde yürütülmüştür. Neb.80°C; Buh.30°C ve Neb.75°C; Buh.35°C uygulamalarının her ikisinde de düşük gaz akış hızlarının, sinyal kalitesi yönünden oldukça uygun sonuçlar verdiği tespit edilmiştir. Sonuç olarak; 1.75 SLM gaz akışından daha düşük uygulamaların, nötral ve polar lipit türlerinin eş zamanlı tayini için en doğru yaklaşım olacağı kanaatine varılmıştır.

### 4.1.2.7. ELSD sistemi nebülizasyon ve buharlaştırma sıcaklığı etkisi

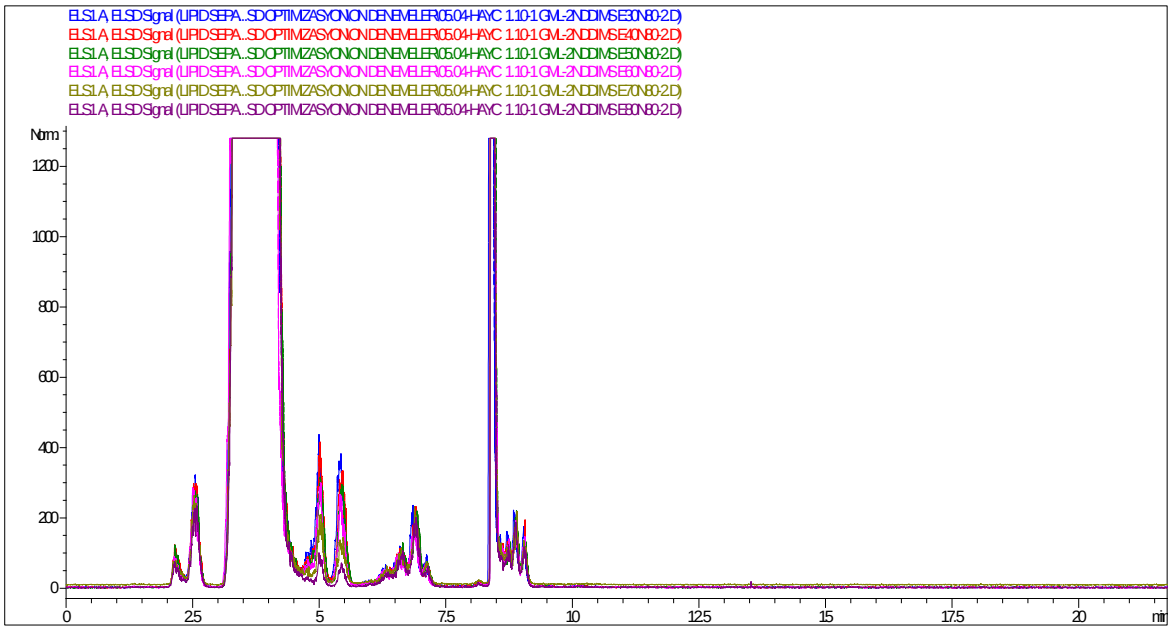
II. boyut ayrım aşamasına ait deneysel parametrelerin optimizasyonu için yürütülen bir diğer önemli çalışma ise; ELSD sıcaklık programlamalarının etkisi üzerine yapılan analizlerdir. Deneysel parametrelerin etkisinin uygun bir yaklaşımla değerlendirilebilmesi amacıyla gerçekleştirilecek deneysel tasarım/kemometrik öncesinde; bazı ön denemeler gerçekleştirilmiştir. Bu ön denemelerin en önemli kısmını; tasarım için kullanılacak nebülizasyon ve buharlaştırma sıcaklık değerlerinin belirlenmesi oluşturmaktadır. I. boyut ayrım aşamasında oldukça yüzeysel yapılan değerlendirmenin, deneysel tasarımın oluşturulabilmesi için yeterli/tatmin edici olmadığı görülmüştür. Nebülizasyon (sisleştirme) ve buharlaştırma sıcaklıklarının sinyaller üzerine olan etkisinin incelendiği analizler; ham ayçiçek yağı kullanılarak farklı sıcaklık değerleri ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kromatogramlar, karşılaştırmalı olarak Şekil 4.17 ve 4.18'de verilmiştir.




**Şekil 4. 17**. II. boyut ayrım analizleri üzerine nebülizasyon (sisleştirme) ve buharlaştırma sıcaklıklarının etkisinin, ham ayçiçek yağı numuneleri kullanılarak incelendiği analizlerden elde edilen kromatogramlar

| | |
|---|---|
| Numune çözücüsü: | Nötral lipid çözücü sistemi [hekzan: asetik asit (99:1.0, v/v)] |
| Numune enjeksiyonu: | 5 µL (0.1mg yağ/ µL) (Otomatik enjeksiyon) |
| 2nd-D HPLC kolon: | LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm)+LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 250x4.6mm) |
| Akış hızı: | 1.25 mL/dk |
| Sıcaklık: | 40°C |
| ELSD programı: : | – **N40 E30** – **N40 E40** – **N40 E50** – **40 E60** – **N40 E70** – **N40 E80** ; 2 SLM |

* Şekil. 3.6.'da yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.5.'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.




**Şekil 4. 18.** II. boyut ayrım analizleri üzerine nebülizasyon (sisleştirme) ve buharlaştırma sıcaklıklarının etkisinin, ham ayçiçek yağı numuneleri kullanılarak incelendiği analizlerden elde edilen kromatogramlar

| | |
|---|---|
| Numune çözücüsü: | Nötral lipid çözücü sistemi [hekzan: asetik asit (99:1.0, v/v)] |
| Numune enjeksiyonu: | 5 µL (0.1mg yağ/ µL çözücü) (Otomatik enjeksiyon) |
| 2nd-D HPLC kolon: | LiChrospher 100 Diol 5µm 75x4.6mm + LiChrospher 100 Diol 5µm 250x4.6mm |
| Akış hızı: | 1.25 mL/dk |
| Sıcaklık: | 40°C |
| ELSD programı: : | – **N80 E30** – **N80 E40** – **N80 E50** – **N80 E60** – **N80 E70** – **N80 E80 ;** 2 SLM |

* Şekil. 3.6.'da yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.5.'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

Şekil 4.17 ve 4.18'de yer alan kromatogramlardan görüleceği üzere; sabit gaz akışında yürütülen analizlerde önce nebülizasyon sıcaklığı 40°C'de, daha sonra 80°C'de sabit tutularak buharlaştırma sıcaklıkları değiştirilmiştir. Buharlaştırma aşamasında seçilen sıcaklık değerlerinin; numunede tayin edilecek analitlerin yapısına zarar vermeyen, ve hareketli faz çözüsünü tamamen uzaklaştıracak uygun bir sıcaklık olması istendiğinden; uygulanan sıcaklık değeri önem arz etmektedir. Elde edilen kromatogramlarda görüldüğü üzere; yüksek sıcaklıkta gerçekleştirilen buharlaştırma işlemlerinde, pik yapıları simetri ve sinyal değerleri bakımından istenmeyen sonuçlar elde edilmiştir. Bu durumun nedeninin; yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilen buharlaştırma işlemi ile, tayin edilecek lipit türlerinin yapısının bozulması, dolayısıyla elde edilen pik yapılarında farklılaşmaya neden olduğu düşünülmektedir. Nebülizasyon ve buharlaştırma sıcaklığı faktörünün etkisini belirlemeyi planladığımız ve ön deneme niteliği taşıyan bu uygulamalar neticesinde; yüksek sıcaklıktaki nebülizasyon, düşük

sıcaklıktaki buharlaştırma sıcaklığı uygulamalarının, sinyal kaliteleri bakımından daha uygun olduğu görülmektedir.

#### 4.1.2.8. ELSD parametrelerinin kemometrik yöntem/ tepki yüzeyi metodolojisi ile optimizasyonu

Optimizasyon çalışmalarında, deneysel gereksinimlerin en aza indirgenmesi ve çalışılan probleme ilişkin formülasyonun geliştirilmesi ve değişkenlerin optimumlarını elde etmek mümkündür. Optimumların belirlenmesinde, tepki yüzeyi metodolojisi gibi metodolojilerin kullanımı söz konusudur. Tepki yüzeyi metodolojisi (TYM), sistem optimizasyonunda kullanılan bir grup istatistiksel ve matematiksel teknikten meydana gelmektedir. Yöntemin mantığı, tasarım değişkenlerinin cevap değişkenleri üzerine etkilerini belirleyerek çıktıların gözlenmesi ve analiz edilmesidir. Deneysel tasarım çalışmalarının ortak amacı, optimize edilmeye çalışılan bağımsız değişkenler ve sistem tepkisinin belirlenmesine yöneliktir.

TYM gereği oluşturulan deneysel işlemler,

**1)** bağımsız değişken/ değişkenlerin seçimi
**2)** deneysel tasarım setinin/ tablosunun oluşturulması
**3)** bağımsız değişkenlerin sayısal değerlerinin kodlu değerlere dönüştürülmesi
**4)** tepki ölçüm yönteminin uygulanması
**5)** model denkleminin çıkartılması
**6)** model denkleminin uygunluğunun test edilmesi
**7)** denemelerin grafiksel gösterimi olmak üzere toplam 7 aşamadan oluşmaktadır.

Oluşturulan deneysel tasarımda; bağımsız değişkenlere ve değerlerine karar verme, önerilen model için analist tarafından verilmesi gereken en önemli karardır. Analist tarafından yapılacak bir hata, sistem için önemsiz bir değişkenin modele alınması yada önemli bir değişkenin modelin dışında kalmasına neden olabilir. Önerilen analiz sisteminde ELSD parametrelerinin optimizasyonu amacıyla; 5 seviyeli/3 faktörlü deneysel tasarımdan faydalanılarak dedektör parametreleri belirlenmeye çalışılmıştır.

Bu amaç doğrultusunda yürütülen çalışmalarda uygulanan prosedürler kısaca özetlenecek olursa;

– Yapılan ön-deneler neticesinde, ELSD sinyali üzerinde etkili olan bağımsız değişkenler belirlenmiştir. Deneysel tasarımda; 5 farklı seviye değeri için, 3 önemli

faktörün; *hareketli faz akış hızı*, *nebülizasyon sıcaklığı* ve *buharlaştırma sıcaklığı* etkisi incelenmiştir. Belirtilen faktörler (*Xi*) için; seviye değerlerini temsil etmek üzere; belirli limit değerleri verilmiştir. Hareketli faz akış hızı ($X_1$) için; 0.5 mL.dk$^{-1}$ ≤ $X_1$ ≤ 1.5 mL.dk$^{-1}$, nebülizasyon sıcaklığı ($X_2$) için; 70°C ≤ $X_2$ ≤ 90°C ve buharlaştırma sıcaklığı ($X_3$) için; 30°C ≤ $X_3$ ≤ 50°C değerleri sınır değerler olarak belirlenmiştir. Yürütülen çalışmalarda; numune miktarı (0.5 mg yağ) ve azot gazı akış hızı (1.5 ve 2.0 SLM) değerlerinde sabit tutularak analizler gerçekleştirilmiştir.

− Deneysel tasarım tablosunda, hareketli faz akış hızı, nebülizasyon sıcaklığı ve buharlaştırma sıcaklığı faktörleri için 5 farklı seviye değeri belirlenmiştir.

− Literatürde yer alan (Brereton, 1997) deneysel tasarım tablosuna ait kod değerleri yardımıyla, Çizelge 3.6 oluşturulmuştur. Deneyler için tanımlanan kod değerleri esas alınarak, 25 deneyin yer aldığı tasarım tablosu tamamlanmıştır.

− Deneysel tasarım setinde yer alan 25 farklı deneyin tamamlandıktan sonra; elde edilen analiz verilerinden sistem üzerinde tepki değeri olacak nitelikte bir '**cevap değeri**' oluşturulmuştur. Çalışmada; sinyal kalitesini belirlemede en önemli parametre olan ***sinyal/ gürültü (S/N) oranı***, ve analitlerin kantitatif tayinlerinde önemli bir parametre olan ***pik alanı*** değerleri, cevap değeri olarak tanımlanmıştır (Çizelge 4.2).

− Önerilen modele ait denklemin çıkartılabilmesi için; microsoft office excel (2007) dosyası üzerinde matriks oluşturulmuştur. Bağımsız değişkenlere ait kod değerleri ve cevap değerleri arasında oluşturulan matriks yardımıyla; denklemlere ait katsayı değerleri ($\beta_0$, $\beta_1$, $\beta_2$, ...gibi) elde edilmiştir. Katsayı değerlerinin belirtilen denklemde yerine koyulmasıyla birlikte, etki değerleri karşılaştırılacak faktörlere ait denklemler oluşturulmuş ve "***y* cevap değerleri**" elde edilmiştir. Teorik olarak elde edilen y ile deneysel cevap değerlerinin karşılaştırması yapılmıştır (Çizelge 4.2).

$$y = \beta_0 + \beta_1.X_1 + \beta_2.X_2 + \beta_3.X_3 + \beta_{11}.X_1^2 + \beta_{22}.X_2^2 + \beta_{33}.X_3^2 + \beta_{12}.X_1.X_2 + \beta_{13}.X_1.X_3 + \beta_{23}.X_2.X_3 + \beta_{123}.X_1.X_2.X_3 \quad (4.1.)$$

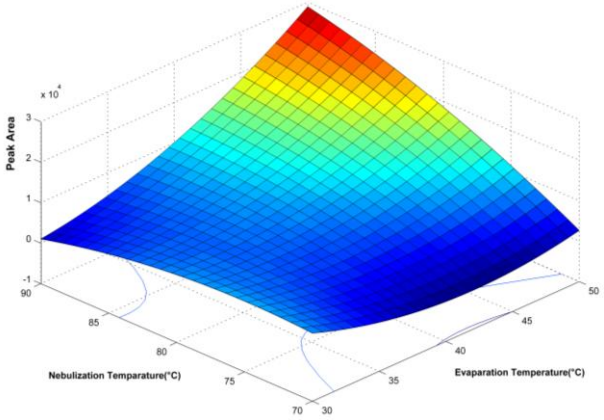
− Önerilen model denkleminin uygunluğu, anova testi ile değerlendirilmiştir.

− Son aşamada ise; deneysel tasarım sonucu elde edilen verilerin, görsel olarak grafikler ile modellenmesi yapılmıştır. MATLAB R2007b (MathWorks, United States) yazılım programına, elde edilen denklemler işlenmiş ve üç boyutlu (3B) yüzey grafikleri oluşturulmuştur. Pik alanı ve S/N değerleri cevap değeri olarak alınarak oluşturulan 3B-yüzey grafikleri, Şekil 4.19, 4.20, 4.21 ve 4.22'de verilmiştir.

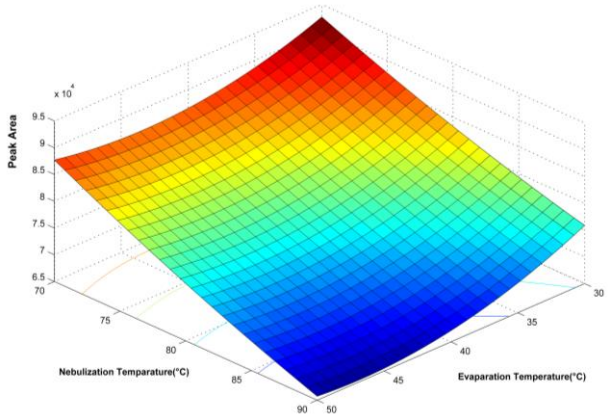
**Çizelge 4. 2.** ELSD deneysel tasarım çalışmasına ait analizlerden elde edilen veriler

| | **5 seviye / 3 faktör deneysel tasarım çalışmasına ait değişkenler ve elde edilen analiz verileri** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | $X_1$ | $X_2$ | $X_3$ | **Cevap değeri, S/N oranı** | | **Cevap değeri, Pik alanı** | |
| **Deney no** | **Akış hızı (mL/dk)** | **Nebulizasyon sıcaklığı (°C)** | **Buharlaştırma sıcaklığı (°C)** | **Deneysel veri** | **Hesaplanan veri** | **Deneysel veri** | **Hesaplanan veri** |
| **1** | 0 (1) | 0 (80) | 0 (40) | 52 | 34 | 21166 | 18849 |
| **2** | 0 (1) | -2 (70) | -2 (30) | 60 | 76 | 18346 | 18039 |
| **3** | -2 (0.5) | -2 (70) | 2 (50) | 223 | 230 | 17726 | 17939 |
| **4** | -2 (0.5) | 2 (90) | -1 (35) | 160 | 149 | 22266 | 18826 |
| **5** | 2 (1.5) | -1 (75) | 2 (50) | 200 | 203 | 9252 | 10187 |
| **6** | -1 (0.75) | 2 (90) | 0 (40) | 51 | 94 | 9754 | 15641 |
| **7** | 2 (1.5) | 0 (80) | -1 (35) | 151 | 183 | 12762 | 15526 |
| **8** | 0 (1) | -1 (75) | -1 (35) | 100 | 39 | 15527 | 19420 |
| **9** | -1 (0.75) | -1 (75) | 1 (45) | 59 | 54 | 16888 | 19048 |
| **10** | -1 (0.75) | 1 (85) | 2 (50) | 49 | 15 | 10869 | 15316 |
| **11** | 1 (1.25) | 2 (90) | 1 (45) | 209 | 233 | 11615 | 12959 |
| **12** | 2 (1.5) | 1 (85) | 0 (40) | 311 | 263 | 14049 | 14725 |
| **13** | 1 (1.25) | 0 (80) | 2 (50) | 93 | 118 | 15479 | 13999 |
| **14** | 0 (1) | 2 (90) | 2 (50) | 129 | 120 | 14832 | 11851 |
| **15** | 2 (1.5) | 2 (90) | -2 (30) | 415 | 390 | 9635 | 10015 |
| **16** | 2 (1.5) | -2 (70) | 1 (45) | 155 | 175 | 9442 | 8388 |
| **17** | -2 (0.5) | 1 (85) | -2 (30) | 183 | 155 | 21790 | 23719 |
| **18** | 1 (1.25) | -2 (70) | 0 (40) | 128 | 92 | 12870 | 13097 |
| **19** | -2 (0.5) | 0 (80) | 1 (45) | 6 | 49 | 28081 | 21280 |
| **20** | 0 (1) | 1 (85) | 1 (45) | 95 | 61 | 16931 | 16326 |
| **21** | 1 (1.25) | 1 (85) | -1 (35) | 67 | 152 | 22430 | 16214 |
| **22** | 1 (1.25) | -1 (75) | -2 (30) | 80 | 77 | 17946 | 17456 |
| **23** | -1 (0.75) | -2 (70) | -1 (35) | 81 | 105 | 22949 | 20101 |
| **24** | -2 (0.5) | -1 (75) | 0 (40) | 117 | 107 | 19933 | 23573 |
| **25** | -1 (0.75) | 0 (80) | -2 (30) | 51 | 76 | 22665 | 22731 |

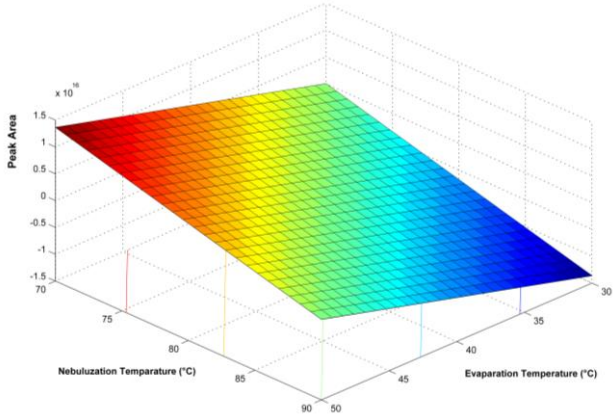
**0.50 mL/min akış hızı**



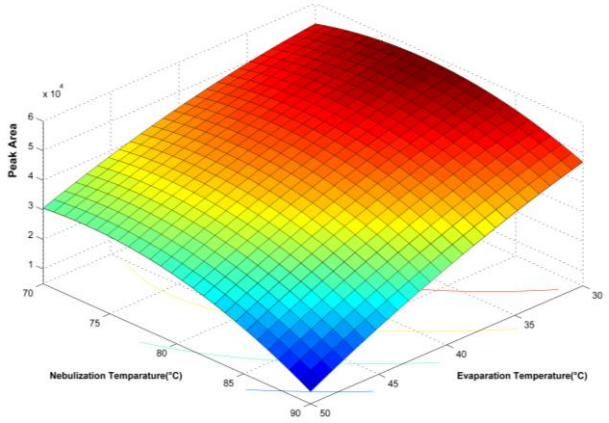

**0.75 mL/min akış hızı**



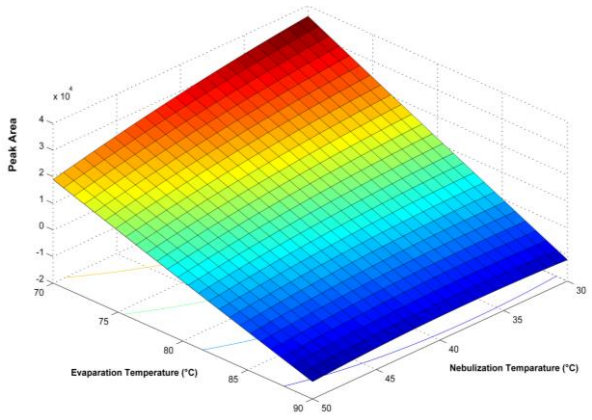

**1.00 mL/min akış hızı**




**1.25 mL/min akış hızı**

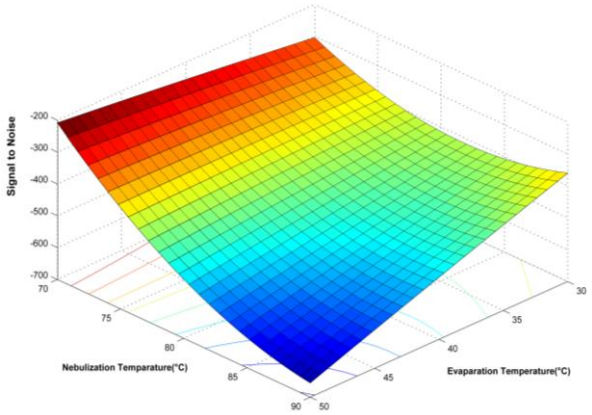


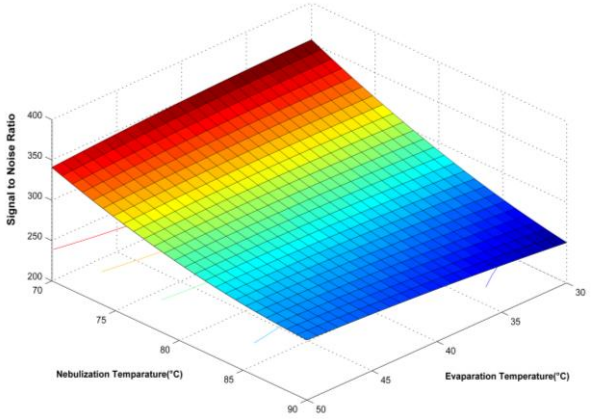

**1.50 mL/min akış hızı**

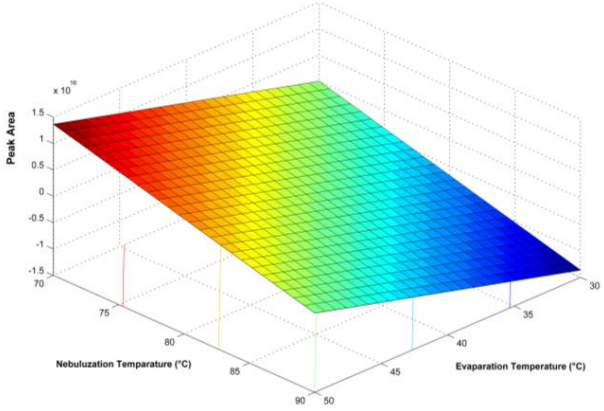



**Şekil 4. 19.** ELSD sistemi optimizasyonu için 1.5 SLM gaz akışında uygulanan deneysel tasarım çalışması sonucu elde edilen 3-B yüzey grafiği grafikleri
**Cevap değeri PİK ALANI**

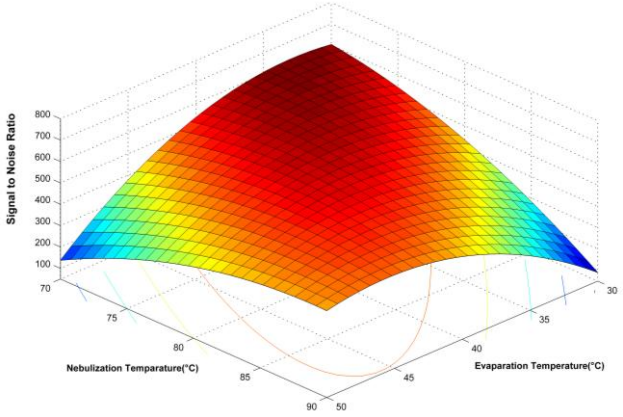
| 0.50 mL/min akış hızı | 0.75 mL/min akış hızı | 1.00 mL/min akış hızı |
|---|---|---|

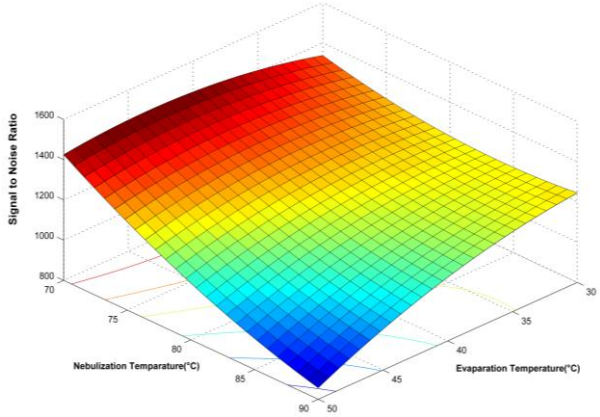


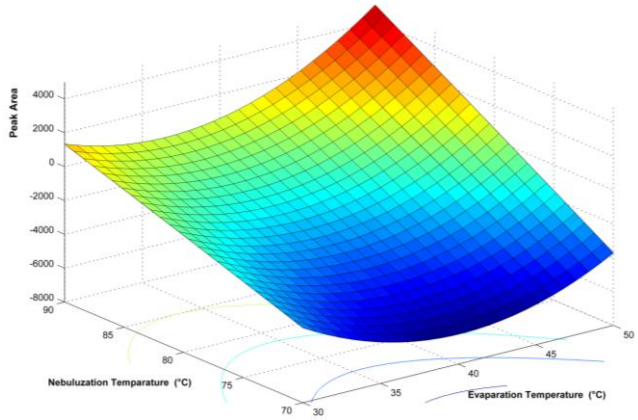

| 1.25 mL/min akış hızı | 1.50 mL/min akış hızı |
|---|---|

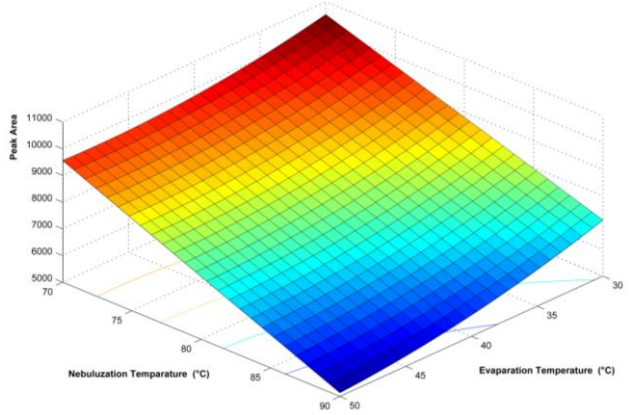


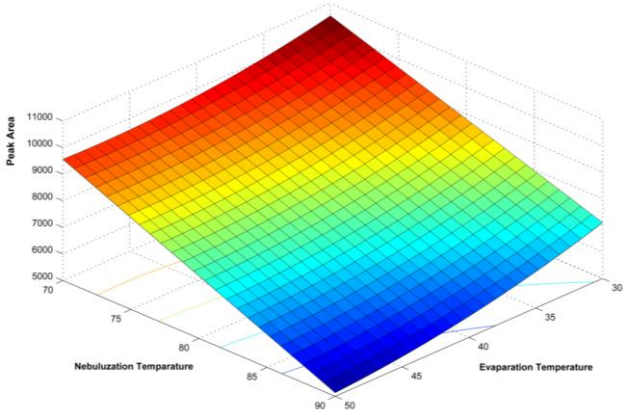




**Şekil 4. 20.** ELSD sistemi optimizasyonu için 1.5 SLM gaz akışında uygulanan deneysel tasarım çalışması sonucu elde edilen 3-B yüzey grafiği grafikleri
**Cevap değeri S/N ORANI**

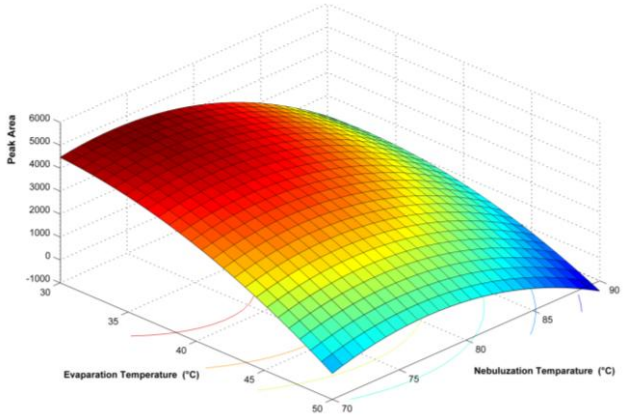
| 0.50 mL/min akış hızı | 0.75 mL/min akış hızı | 1.00 mL/min akış hızı |
|---|---|---|

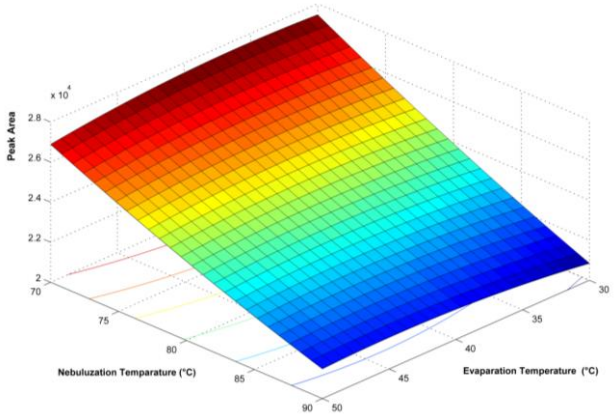


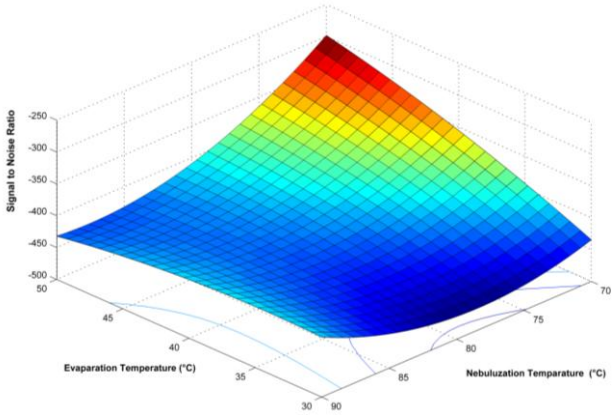

| 1.25 mL/min akış hızı | 1.50 mL/min akış hızı |
|---|---|

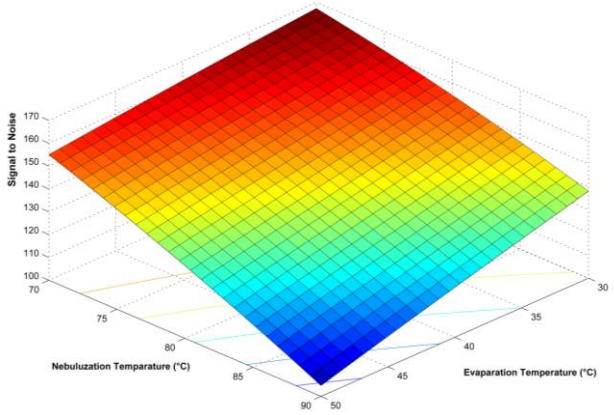


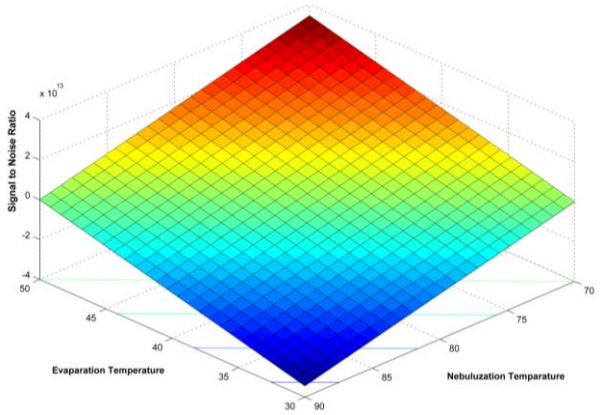




**Şekil 4. 21.** ELSD sistemi optimizasyonu için 2 SLM gaz akışında uygulanan deneysel tasarım çalışması sonucu elde edilen 3-B yüzey grafiği grafikleri
**Cevap değeri PİK ALANI**

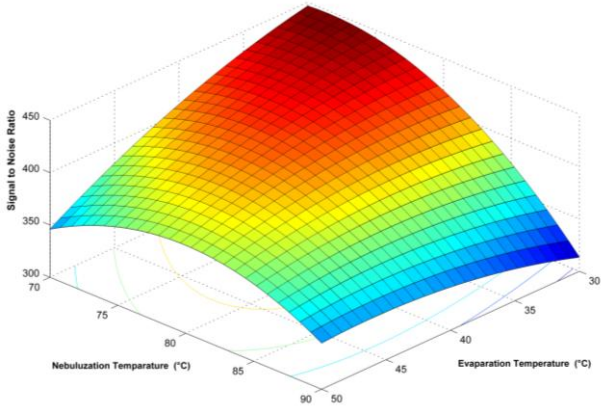
| 0.50 mL/min akış hızı | 0.75 mL/min akış hızı | 1.00 mL/min akış hızı |
|---|---|---|

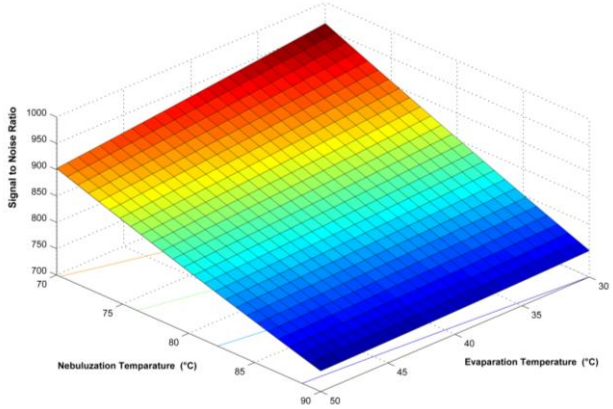



| 1.25 mL/min akış hızı | 1.50 mL/min akış hızı |
|---|---|




**Şekil 4. 22.** ELSD sistemi optimizasyonu için 2 SLM gaz akışında uygulanan deneysel tasarım çalışması sonucu elde edilen 3-B yüzey grafiği grafikleri
**Cevap değeri S/N ORANI**

Şekil 4.19, 4.20, 4.21 ve 4.22'de yer alan 3B-yüzey grafikleri; sabit gaz akışında, yani 1.5 ve 2.0 SLM akışlarda gerçekleştirilen deneysel tasarım çalışmalarının modellenmesi sonucu elde edilmiştir. 0.5, 0.75, 1.0, 1.25 ve 1.5 mL/dk akış hızlarında gerçekleştirilen deneylere ait veriler sırayla kullanılarak; Eşitlik 4.2; 4.3; 4.4; 4.5 ve 4.6'da yer alan polinomal denklemler oluşturulmuş ve 3B-yüzey grafikleri çizilmiştir (Şekil 4.19, 4.20, 4.21 ve 4.22).

$$y_{peak\ area} = 98304+1792.X_2-9728.X_3-28.X_2.X_2+49.X_3.X_3+80.X_2.X_3 \quad (4.2.)$$

$$y_{S/N\ ratio} = 2880-106.X_2+75.X_3+0.828125.X_2.X_2-0.0234375.X_3.X_3-0.9765625.X_2.X_3$$

$$y_{peak\ area} = 249856-2048.X_2-2296.X_3+10.X_2.X_2+37.X_3.X_3-13.X_2.X_3 \quad (4.3.)$$

$$y_{S/N\ ratio} = 1680-28.X_2-5.03125.X_3+0.125.X_2.X_2-0.02734375.X_3.X_3+0.09375.X_2.X_3$$

$$y_{peak\ area} = 2.73E+16-6.82E+14.X_2+6.82E+14.X_3-52.5X_2.X_2+95.0938.X_3.X_3-52.8125.X_2.X_3 \quad (4.4.)$$

$$y_{S/N\ ratio} = 1.41E+14-3.52E+12.X_2+3.52E+12.X_3-0.5840.X_2.X_2+1.781.X_3.X_3-1.0064.X_2.X_3$$

$$y_{peak\ area} = -507904+13312.X_2+3936.X_3-78.X_2.X_2-30.X_3.X_3-38.X_2.X_3 \quad (4.5.)$$

$$y_{S/N\ ratio} = -512+52.X_2-37.5.X_3-0.875.X_2.X_2-1.640625.X_3.X_3+2.078125.X_2.X_3$$

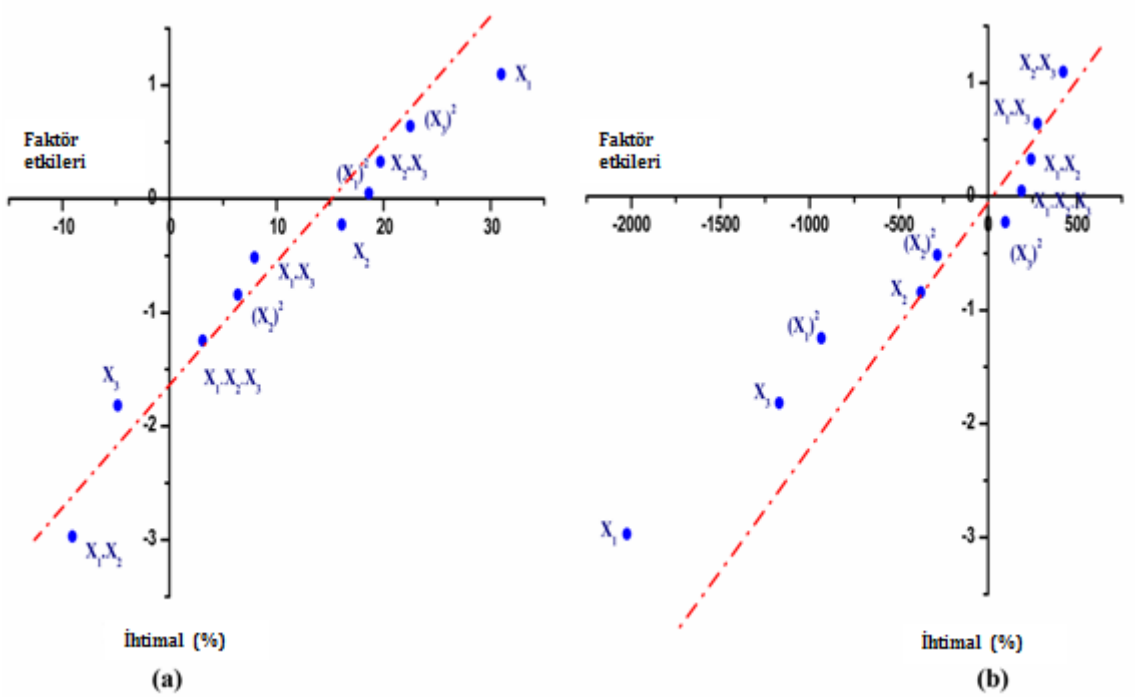
$$y_{peak\ area} = 303104-3968.X_2-2304.X_3+2.5.X_2.X_2-16.X_3.X_3+39.X_2.X_3 \quad (4.6.)$$

$$y_{S/N\ ratio} = 1792-64.X_2+140.X_3+0.59375.X_2.X_2-0.65625.X_3.X_3-1.1875.X_2.X_3$$

3B-yüzey grafiklerinde üç farklı eksen bulunmaktadır; birinci eksen nebülizasyon sıcaklığını, ikinci eksen buharlaştırma sıcaklığını, üçüncü eksen ise cevap değerini temsil etmektedir. Grafikler üzerinde kırmızı renk yoğunluğu olan bölgeler uygun değerleri; mavi renk yoğunluğu olan bölgeler ise uygun olmayan deneysel parametreleri temsil etmektedir. Kırmızı renk yoğunluğunun fazla olduğu 3B-yüzey grafikleri, optimum deneysel parametrelere karar verme açısından daha doğru bir yaklaşım sunmaktadır. Bununla birlikte; grafiklerde içe ya da dışarı doğru bükülme gösteren grafikler, doğru parametrelere karar aşamasında tercih edilmektedir. Yüksek akış hızında yürütülen deneylerden (1,25 ve 1,50 mL/dk) elde edilen 3B-yüzey grafiklerinde; nebülizasyon ve buharlaştırma sıcaklığı değerleri için kırmızı renk yoğunluğu olan bölgelerin fazla olduğu ve cevap değerlerinin yüksek olduğu tespit

edilmiştir. Sonuç olarak; 1.25 mL/dk akış hızı için elde edilen 3B-yüzey grafiklerinin, optimum deneysel parametrelere karar verme açısından daha doğru bir yaklaşım sergilediğine karar verilmiş ve nebülizasyon sıcaklığı için 80°C, buharlaştırma sıcaklığı için ise 40°C'in optimum değer olduğu kanaatine varılmıştır. Cevap değeri olarak pik alanı ve sinyal/gürültü (S/N) oranı esas alındığında, benzer sonuçların elde edildiği görülmektedir.

ELSD parametrelerinin elde edilen sinyal kalitesine olan etkilerinin önem değeri ve önerilen deneysel tasarım modelinin uygunluğu; normal dağılım grafikleri (Şekil 4.23) ve ANOVA testi ile değerlendirilmiştir.




**Şekil 4. 23.** ELSD sistemi optimizasyonu için uygulanan faktörlerin cevap değerleri (S/N oranı ve pik alanı) üzerine olan etkilerinin, normal dağılım grafikleri ile gösterimi

Şekil 4.23'de yer alan normal dağılım grafiklerinden görüleceği üzere; tasarımda önerilen hareketli faz akış hızı ($X_1$), nebülizasyon sıcaklığı ($X_2$) ve buharlaştırma sıcaklığı ($X_3$) değerlerinin tümünün, elde edilen sinyal kalitesine etki dereceleri önemlidir. Grafiklerde kırmızı renkle gösterilen normal dağılım ekseninden sapma gösteren bu faktörlerin, belirgin bir etki değerleri bulunduğu açıkça görülmektedir. Ayrıca bu durum, ANOVA testi ile valide edilerek yorumlanmıştır (Çizelge 4.3).

**Çizelge 4. 3.** ELSD sistemi optimizasyonu için uygulanan faktörlerin, cevap değerleri (S/N oranı ve pik alanı) üzerine olan etki derecelerinin ANOVA testi ile değerlendirilmesi

| | | **ANOVA testi** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | ***Kaynak*** | ***S.d.*** | ***Etki değeri*** | ***S.S.*** | ***M.S.*** | ***Varyans oranı*** |
| **Cevap değeri; Signal / Noise Oranı** | ***Ana etkiler*** | $X_1$ | 1 | 31.00 | 1922.00 | 1922.00 | **21.90** ( > $F_{critical}$) | ***Önemli*** |
| | | $X_2$ | 1 | 16.09 | 517.78 | 517.78 | 5.90 ( < $F_{critical}$) | ***Önemsiz*** |
| | | $X_1^2$ | 1 | 18.62 | 693.41 | 693.41 | **7.90** ( > $F_{critical}$) | ***Önemli*** |
| | | $X_3^2$ | 1 | 22.51 | 1013.40 | 1013.40 | **11.55** ( > $F_{critical}$) | ***Önemli*** |
| | | $X_2.X_3$ | 1 | 19.72 | 777.76 | 777.76 | **8.86** ( > $F_{critical}$) | ***Önemli*** |
| | ***artık değer*** | $X_3$ | *5* | -4.83 | 46.66 | 87.76 | | |
| | | $X_2^2$ | | 6.40 | 81.92 | | | |
| | | $X_1.X_2$ | | -9.08 | 164.89 | | | |
| | | $X_1.X_3$ | | 7.94 | 126.09 | | | |
| | | $X_1.X_2.X_3$ | | 3.10 | 19.22 | | | |
| | ***toplam*** | | 10 | | | | ***P=0.05; $df_1/df_2$= 1/5$F_{critical}$=6.61*** | |
| **Cevap değeri; Pik alanı** | ***Ana etkiler*** | $X_1$ | 1 | -2023.62 | 8190075.81 | 8190075.81 | **49.43** ( > $F_{critical}$) | ***Önemli*** |
| | | $X_3$ | 1 | -1171.03 | 2742622.52 | 2742622.52 | **16.55** ( > $F_{critical}$) | ***Önemli*** |
| | | $X_1^2$ | 1 | -934.11 | 1745122.98 | 1745122.98 | **10.53** ( > $F_{critical}$) | ***Önemli*** |
| | ***artık değer*** | $X_2$ | 7 | -376.22 | 283082.98 | 165698.38 | | |
| | | $X_2^2$ | | -284.02 | 161334.72 | | | |
| | | $X_3^2$ | | 97.67 | 19078.86 | | | |
| | | $X_1.X_2$ | | 241.97 | 117098.96 | | | |
| | | $X_1.X_3$ | | 277.26 | 153746.22 | | | |
| | | $X_2.X_3$ | | 421.13 | 354700.95 | | | |
| | | $X_1.X_2.X_3$ | | 188.21 | 70846.01 | | | |
| | ***toplam*** | | 10 | | | | ***P=0.05; $df_1/df_2$= 1/7$F_{critical}$=5.59*** | |

**Çizelge 4. 4.** Cevap değeri S/N alındığında, ELSD sistemi optimizasyonu için uygulanan deneysel tasarım modelinin uygunluğunun ANOVA testi ile değerlendirilmesi

| **ANOVA testi** | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ***Kaynak*** | ***S.d.*** | ***Etki değeri*** | ***S.S.*** | ***M.S.*** | ***Varyans oranı*** | |
| ***model*** | 9 | 14387.49 | $4.14 \times 10^8$ | $0.46 \times 10^8$ | **3.068** ( > $F_{critical}$) | ***Önemli*** |
| ***artık değer*** | *15* | 10606.60 | $2.25 \times 10^8$ | $0.15 \times 10^8$ | | |
| ***toplam*** | 24 | | | | | |
| | | | | | ***P=0.05; $df_1/df_2$= 9/15$F_{critical}$=2.59*** | |

Çizelge 4.3'de yer alan ANOVA testi verilerin, normal dağılım grafiğinde elde edilen veriler ile oldukça uyumlu olduğu görülmektedir. ANOVA testinde $F_{kritik}$ değerinden daha büyük olan varyans değerleri, deneysel çalışmalarda etki dereceleri önemli kabul edilen parametreleri temsil etmektedir. Cevap değeri olarak S/N oranı ve pik alan değerleri esas alınarak yapılan ANOVA testlerinde, faktörlerin etkilerinin önem sıralamasının; hareketli faz akış hızı ($X_1$)> buharlaştırma sıcaklığı ($X_3$)> nebülizasyon sıcaklığı ($X_2$) şeklinde olduğu görülmüştür. Çizelge 4.4'de yer alan ANOVA testinde ise; deneysel tasarım modellemesinin uygunluğunun test edilmesi ile ilgili oluşturulmuştur. Kaynak değeri olarak sadece model ve artık değerlerin test edildiği bu veriler, $F_{kritik}$ değerinden (2,59) büyük elde edilen varyans değeri ile (3,068) modelin uygunluğunu kanıtlamıştır. Sonuç olarak, ELSD optimizasyonu için önerilen deneysel tasarım model uygulaması, optimizasyon çalışmaları açısından uygun bir yaklaşım göstermektedir.

Deneysel tasarım çalışmasının tamamlanmasıyla birlikte; II. boyut ayrım aşaması analizleri için optimimum deney parametreleri netleştirilmiştir. Belirlenen deneysel parametreler kullanılarak; önce lipit standartları ile kalibrasyon çalışmaları, daha sonra farklı bitkisel yağ numuneleri için analizler yürütülmüştür.

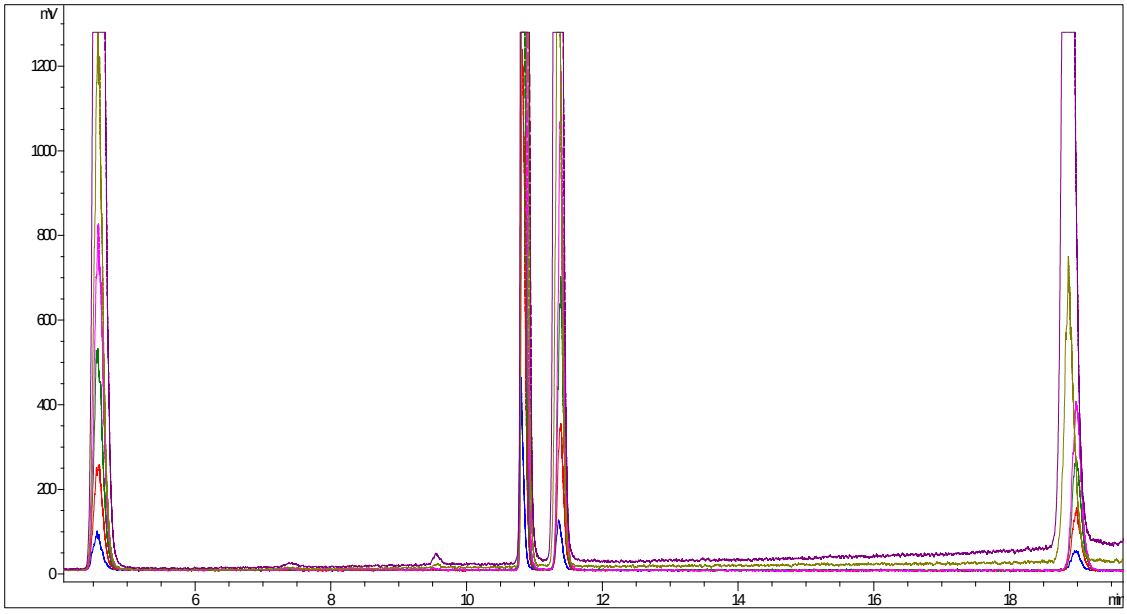
#### 4.1.2.9. Lipit standartları ile yürütülen kalibrasyon çalışmaları

II. boyut ayrım aşaması için tespit edilen parametre değerleri ve sistem işleyişi (Şekil 3.6) kullanılarak; lipit standart maddeleri için analizler gerçekleştirilmiştir. Lipit türlerinin kalitatif ve kantitatif tayinleri için; *trigliserit kit, digliserit (1,2 diolein,1,3 diolein), monogliserit (monoolein)* için 1,6 µg $\mu L^{-1}$; *serbest yağ asidi (oleik asit, stearik asit)* için 0,4 µg $\mu L^{-1}$; *tokoferol (α-T, β-T, γ-T, δ-T), tokotrienol (α-TT, β-TT, γ-TT, δ-TT), sterol (stigma sterol)* ve *ester (stearyl stearate)* için 1,0 µg $\mu L^{-1}$ şeklinde, hekzan içerisinde stok çözeltiler hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözeltilerden; 0,2- 20,0 µL şeklinde enjeksiyonlar gerçekleştirilerek, farklı konsantrasyonlardaki standart materyaller için kalibrasyon grafikleri oluşturulmuştur.

Nötral çözücü ve hekzanda hazırlanan lipit türleri için; pik alanı, yüksekliği ve yarı genişliği esas alınarak kalibrasyon grafikleri çizilmiştir. Analiz verilerinin lineer aralık, üs ve polinom denklemleri ile korelasyon değerleri tespit edilmiştir (Şekil 4.24─ 4.53).

Lipit standartlarının herbirisi için oluşturulan kalibrasyon grafiği ve korelasyon değerlerine ait tablolar, ilgili başlıklarda detaylı olarak yer almaktadır.

- **Trigliserit** (triolein) + **digliserit** (1,2 diolein,1,3 diolein) + **monogliserit** (monoolein) **standart lipit türlerinden oluşan karışımın analizlerine ait pikler & kalibrasyon grafikleri;**




**Şekil 4. 24.** Standart triolein + 1,2 diolein + 1,3 diolein + monoolein 4'lü karışımı konsantrasyon çalışmalarına ait analizlerden elde edilen kromatogramlar

**Triolein tR= 4.5 dk; 1,3- diolein tR=10.8 dk; 1,2-diolein tR=11.4 dk; monoolein tR=18.9 dk**

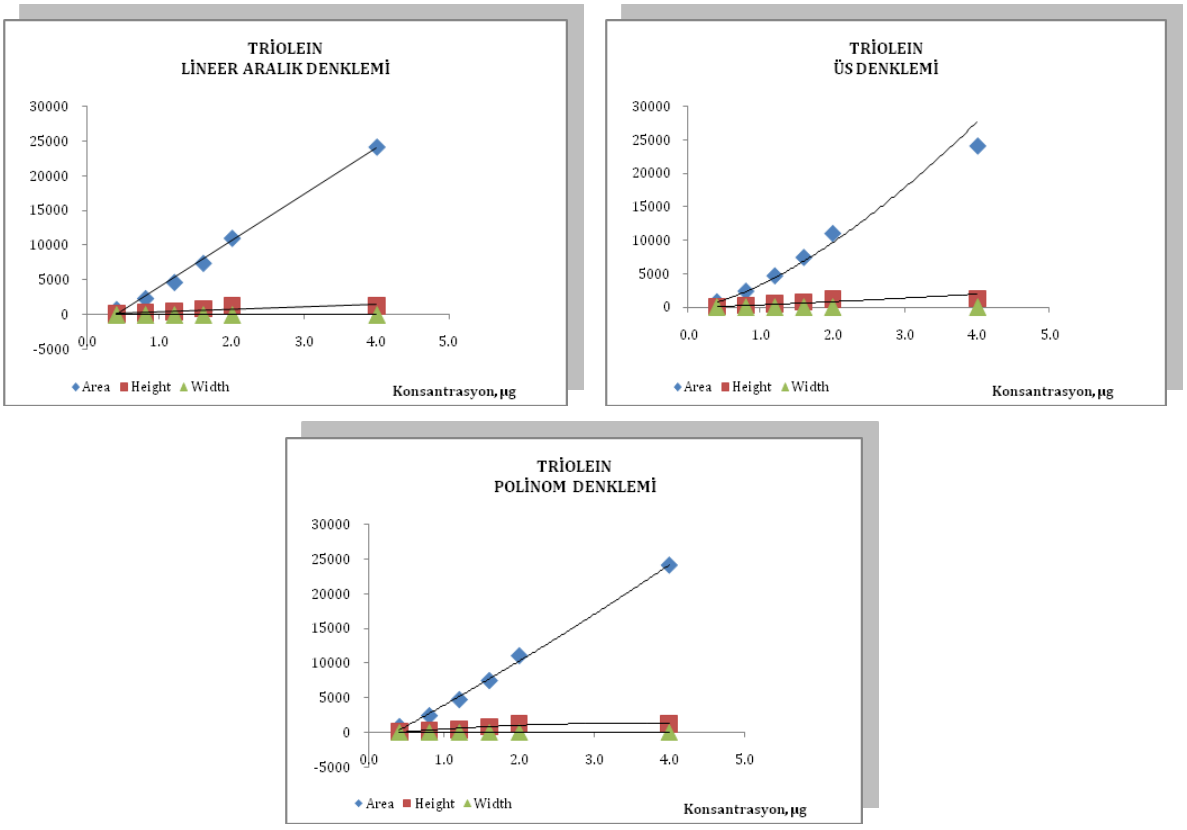
| | |
|---|---|
| Numune çözücüsü: | **Nötral lipid çözücü [hekzan: asetik asit (99.0:1.0, v/v)]** |
| Numune enjeksiyonu: | 1- 2- 3- 4- 5 µL (Otomatik enjeksiyon) |
| Numune konsantrasyonu: | **— 0.4 µg — 0.8 µg — 1.2 µg — 1.6 µg — 2.0 µg — 4.0 µg** |
| 2nd-D HPLC Kolon: | LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm)+ (5µm 250x4.6mm) |
| Akış hızı**:** | 1.25 mL/dk, |
| Sıcaklık: | 40°C |
| ELSD programı: | Neb. 80°C, Buh. sıcaklığı 40°C, Azot gazı akış hızı; 1.5 SLM |

* Şekil. 3.6.'da yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.5.'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

**Çizelge 4. 5.** Triolein standardı için gerçekleştirilen konsantrasyon çalışmalarına ait analiz verileri

| II. BOYUT AYRIM ANALİZLERİ<br>TRİGLİSERİT (TRİOLEİN) TAYİNİ | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Miktar, µg** | **Time** | **Area** | **Height** | **Width** | **Area%** | **Symmetry** |
| **0.4** | 4.5497 | 812.1667 | 85.5333 | 0.1405 | 20.9320 | 0.8230 |
| **0.8** | 4.5707 | 2391.2333 | 252.6333 | 0.1332 | 21.2663 | 0.8450 |
| **1.2** | 4.5610 | 4705.6667 | 488.6333 | 0.1357 | 24.5510 | 0.6287 |
| **1.6** | 4.4020 | 7459.4667 | 812.9667 | 0.1357 | 27.9460 | 0.7103 |
| **2.0** | 4.5667 | 11060.4000 | 1197.5000 | 0.1279 | 29.7963 | 0.7113 |
| **4.0** | 4.7003 | 24170.1333 | 1266.5333 | 0.3060 | 29.2213 | 2.9043 |

| | **LİNEER ARALIK DENKLEMİ** | **ÜS DENKLEMİ** | **POLİNOM DENKLEMİ** |
|---|---|---|---|
| **ALAN** | $y = 6674.9x - 2691.7$ | $y = 3440.6x^{1.5051}$ | $y = 201.12x^2 + 5758.3x - 1995.3$ |
| | **$R^2 = 0.9956$** | **$R^2 = 0.9937$** | **$R^2 = 0.9967$** |
| **YÜKSEKLİK** | $y = 337.49x + 121.49$ | $y = 347.12x^{1.2605}$ | $y = -151.33x^2 + 1027.2x - 402.46$ |
| | $R^2 = 0.7706$ | $R^2 = 0.9119$ | $R^2 = 0.9541$ |
| **YARI PİK GENİŞLİĞİ** | $y = 0.048x + 0.0831$ | $y = 0.1435x^{0.2735}$ | $y = 0.0239x^2 - 0.0609x + 0.1659$ |
| | $R^2 = 0.7647$ | $R^2 = 0.4118$ | $R^2 = 0.9889$ |



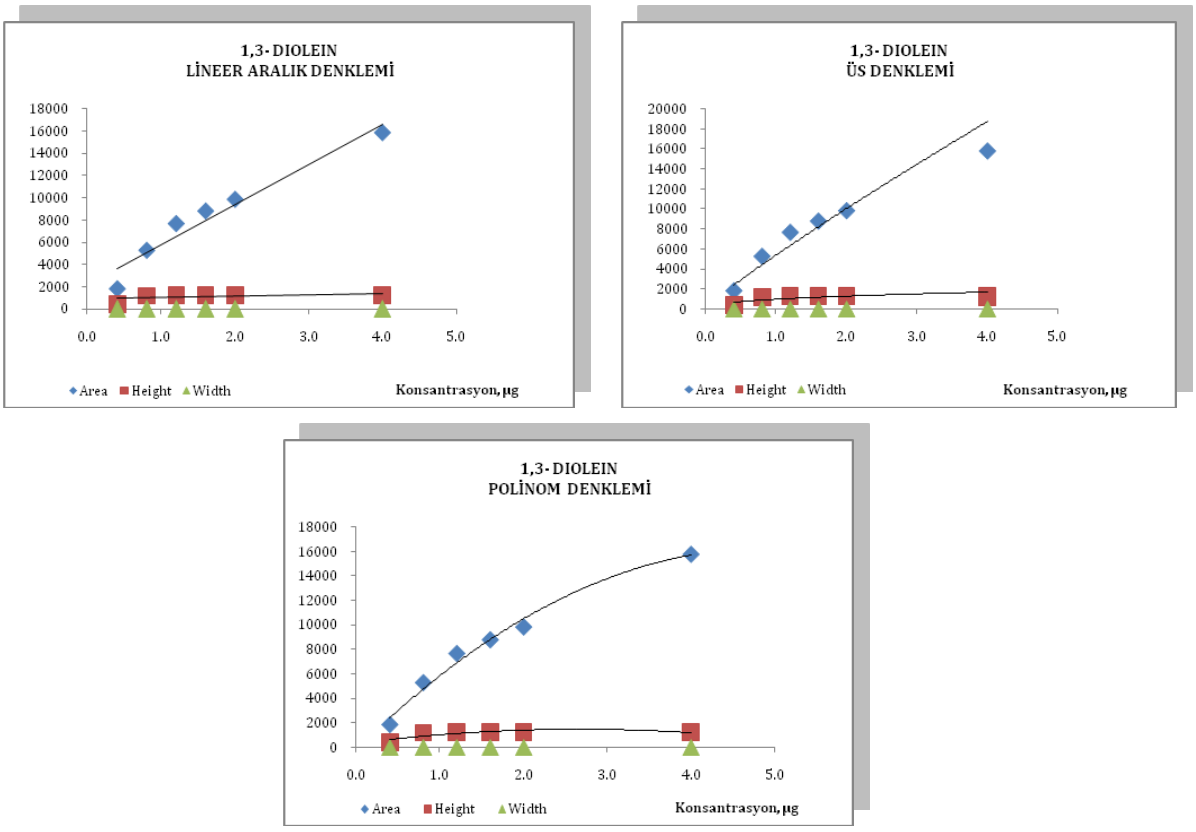

**Şekil 4. 25.** Triolein standart maddesi konsantrasyon çalışmalarına ait kalibrasyon grafikleri

| | |
|---|---|
| Numune çözücüsü: | **Nötral lipid çözücü [hekzan: asetik asit (99.0:1.0, v/v)]** |
| Numune enjeksiyonu: | 1- 2- 3- 4- 5 µL (Otomatik enjeksiyon) |
| Numune konsantrasyonu: | — 0.4 µg — 0.8 µg — 1.2 µg — 1.6 µg — 2.0 µg — 4.0 µg |
| 2nd-D HPLC Kolon: | LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm)+ (5µm 250x4.6mm) |
| Akış hızı: | 1.25 mL/dk |
| Sıcaklık: | 40°C |
| ELSD programı: | Neb 80°C, Buh sıcaklığı 40°C, Azot gazı akış hızı; 1.5 SLM |

**Çizelge 4. 6.** 1,3 Diolein standardı için gerçekleştirilen konsantrasyon çalışmalarına ait analiz verileri

| II. BOYUT AYRIM ANALİZLERİ<br>1,3-DiGLİSERİT (1,3- DİOLEİN) TAYİNİ | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Miktar, µg** | **Time** | **Area** | **Height** | **Width** | **Area%** | **Symmetry** |
| **0.4** | 10.7907 | 1827.7000 | 423.4000 | 0.0679 | 47.0560 | 0.6263 |
| **0.8** | 10.8220 | 5279.0667 | 1206.3333 | 0.0691 | 46.9537 | 0.6680 |
| **1.2** | 10.8330 | 7673.4333 | 1271.0333 | 0.0978 | 40.0397 | 0.8020 |
| **1.6** | 10.8263 | 8800.4667 | 1270.9000 | 0.1121 | 32.9703 | 1.0550 |
| **2.0** | 10.8643 | 9850.7000 | 1264.2667 | 0.1256 | 26.5430 | 1.3263 |
| **4.0** | 10.9377 | 15827.3333 | 1236.8667 | 0.2049 | 19.1547 | 2.1603 |

| | **LİNEER ARALIK DENKLEMİ** | **ÜS DENKLEMİ** | **POLİNOM DENKLEMİ** |
|---|---|---|---|
| **ALAN** | $y = 3584.8x + 2235.2$ | $y = 5373.3x^{0.9044}$ | $y = -684.17x^2 + 6702.8x - 133.63$ |
| | **$R^2 = 0.9444$** | **$R^2 = 0.9383$** | **$R^2 = 0.9851$** |
| **YÜKSEKLİK** | $y = 128.82x + 897.43$ | $y = 934.92x^{0.4136}$ | $y = -164.66x^2 + 879.23x + 327.33$ |
| | $R^2 = 0.2358$ | $R^2 = 0.5461$ | $R^2 = 0.6919$ |
| **YARI PİK GENİŞLİĞİ** | $y = 0.0395x + 0.0471$ | $y = 0.0917x^{0.501}$ | $y = 0.0001x^2 + 0.0389x + 0.0475$ |
| | $R^2 = 0.9897$ | $R^2 = 0.9186$ | $R^2 = 0.9897$ |



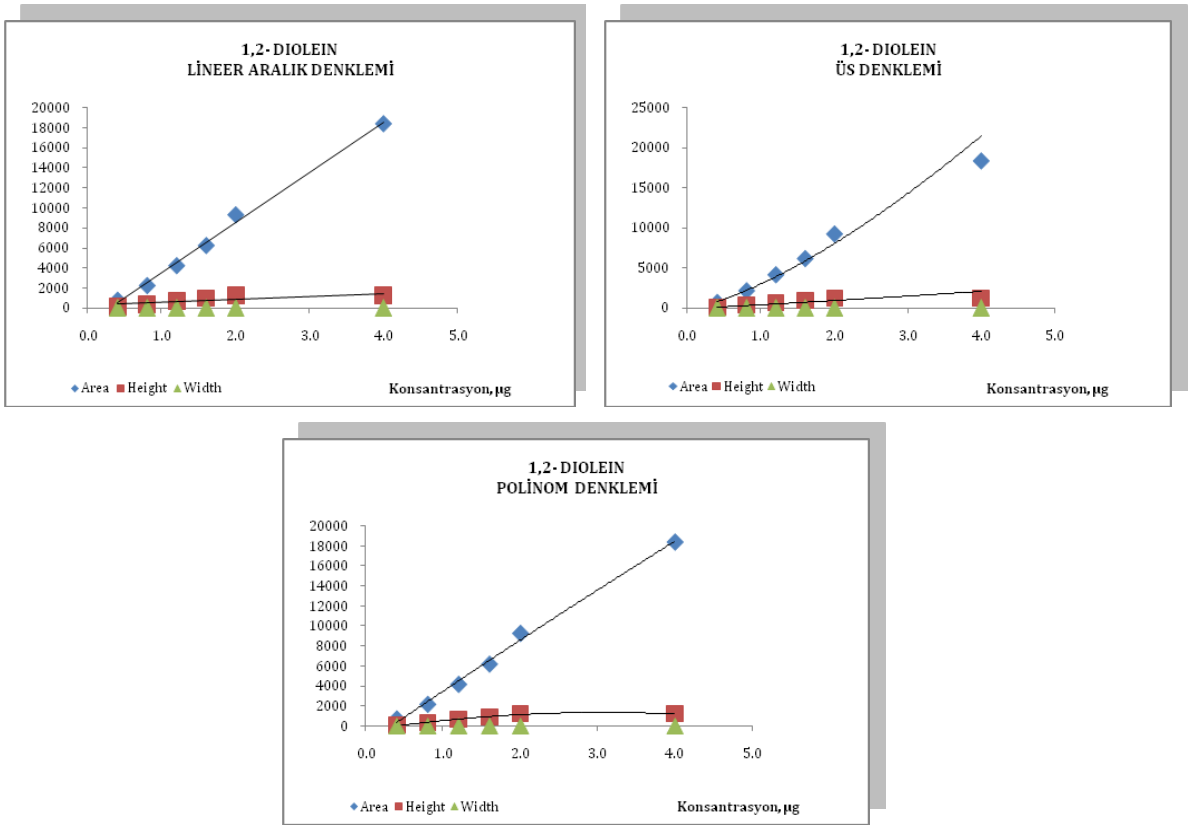

**Şekil 4. 26.** 1,3-Diolein standart maddesi konsantrasyon çalışmalarına ait kalibrasyon grafikleri

| | |
|---|---|
| Numune çözücüsü: | **Nötral lipid çözücü [hekzan: asetik asit (99.0:1.0, v/v)]** |
| Numune enjeksiyonu: | 1- 2- 3- 4- 5 µL (Otomatik enjeksiyon) |
| Numune konsantrasyonu: | — 0.4 µg — 0.8 µg — 1.2 µg — 1.6 µg — 2.0 µg — 4.0 µg |
| 2nd-D HPLC Kolon: | LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm)+ (5µm 250x4.6mm) |
| Akış hızı: | 1.25 mL/dk |
| Sıcaklık: | 40°C |
| ELSD programı: | Neb 80°C, Buh sıcaklığı 40°C, Azot gazı akış hızı; 1.5 SLM |

**Çizelge 4. 7.** 1,2 Diolein standardı için gerçekleştirilen konsantrasyon çalışmalarına ait analiz verileri

| II. BOYUT AYRIM ANALİZLERİ<br>1,2- DİGLİSERİT (1,2- DİOLEİN) TAYİNİ | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Miktar, µg** | **Time** | **Area** | **Height** | **Width** | **Area%** | **Symmetry** |
| **0.4** | 11.3500 | 754.0667 | 112.4000 | 0.1070 | 19.4313 | 0.7703 |
| **0.8** | 11.3750 | 2212.6333 | 352.6000 | 0.1026 | 19.6793 | 0.7583 |
| **1.2** | 11.3847 | 4205.4667 | 661.7667 | 0.0982 | 21.9443 | 0.8717 |
| **1.6** | 11.3903 | 6221.2000 | 970.9667 | 0.1006 | 23.3030 | 0.9020 |
| **2.0** | 11.3513 | 9288.2333 | 1263.2000 | 0.1131 | 25.0243 | 0.8467 |
| **4.0** | 11.4377 | 18400.8333 | 1225.9667 | 0.2415 | 22.2877 | 2.4747 |

| | **LİNEER ARALIK DENKLEMİ** | **ÜS DENKLEMİ** | **POLİNOM DENKLEMİ** |
|---|---|---|---|
| **ALAN** | $y = 5014.1x - 1509.7$ | $y = 3036.8x^{1.4146}$ | $y = -60.024x^2 + 5287.6x - 1717.6$ |
| | **$R^2 = 0.9954$** | **$R^2 = 0.9903$** | **$R^2 = 0.9956$** |
| **YÜKSEKLİK** | $y = 302.48x + 260.36$ | $y = 435.23x^{1.1042}$ | $y = -189.06x^2 + 1164.1x - 394.22$ |
| | $R^2 = 0.6706$ | $R^2 = 0.8676$ | $R^2 = 0.9807$ |
| **YARI PİK GENİŞLİĞİ** | $y = 0.0399x + 0.0607$ | $y = 0.1105x^{0.3046}$ | $y = 0.0173x^2 - 0.0391x + 0.1207$ |
| | $R^2 = 0.8166$ | $R^2 = 0.4815$ | $R^2 = 0.9993$ |



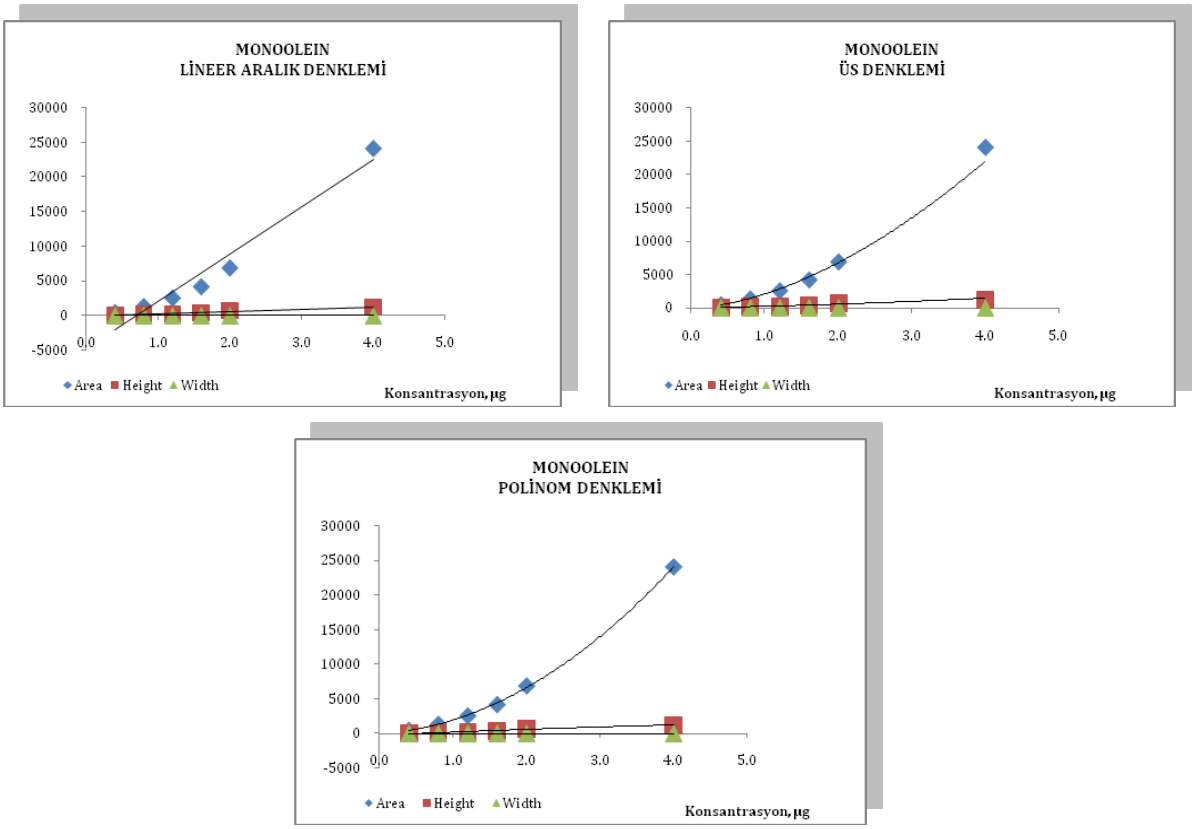

**Şekil 4. 27.** 1,2- Diolein standart maddesi konsantrasyon çalışmalarına ait kalibrasyon grafikleri

| | |
|---|---|
| Numune çözücüsü: | **Nötral lipid çözücü [hekzan: asetik asit (99.0:1.0, v/v)]** |
| Numune enjeksiyonu: | 1- 2- 3- 4- 5 µL (Otomatik enjeksiyon) |
| Numune konsantrasyonu: | — 0.4 µg — 0.8 µg — 1.2 µg — 1.6 µg — 2.0 µg — 4.0 µg |
| 2nd-D HPLC Kolon: | LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm)+ (5µm 250x4.6mm) |
| Akış hızı: | 1.25 mL/dk |
| Sıcaklık: | 40°C |
| ELSD programı: | Neb 80°C, Buh sıcaklığı 40°C, Azot gazı akış hızı; 1.5 SLM |

**Çizelge 4. 8.** Monolein standardı için gerçekleştirilen konsantrasyon çalışmalarına ait analiz verileri

| II. BOYUT AYRIM ANALİZLERİ<br>MONOGLİSERİT (MONOOLEİN) TAYİNİ | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Miktar, µg** | **Time** | **Area** | **Height** | **Width** | **Area%** | **Symmetry** |
| **0.4** | 18.9547 | 488.3333 | 44.8667 | 0.1575 | 12.5803 | 0.8423 |
| **0.8** | 18.9813 | 1360.6000 | 139.2667 | 0.1348 | 12.1007 | 0.9020 |
| **1.2** | 18.9810 | 2581.0000 | 249.5667 | 0.1480 | 13.4653 | 0.7693 |
| **1.6** | 18.9940 | 4211.3333 | 432.4333 | 0.1378 | 15.7803 | 0.8133 |
| **2.0** | 18.8613 | 6915.4667 | 685.6333 | 0.1331 | 18.6360 | 0.7267 |
| **4.0** | 18.9730 | 24131.8667 | 1187.9667 | 0.3195 | 29.3367 | 2.2567 |

| | **LİNEER ARALIK DENKLEMİ** | **ÜS DENKLEMİ** | **POLİNOM DENKLEMİ** |
|---|---|---|---|
| **ALAN** | $y = 6802.9x - 4723.3$ | $y = 2078x^{1.6994}$ | $y = 1351.4x^2 + 643.83x - 44.237$ |
| | **$R^2 = 0.955$** | **$R^2 = 0.9955$** | **$R^2 = 0.9996$** |
| **YÜKSEKLİK** | $y = 329.22x - 92.075$ | $y = 193.48x^{1.4749}$ | $y = -22.282x^2 + 430.77x - 169.22$ |
| | $R^2 = 0.9784$ | $R^2 = 0.9803$ | $R^2 = 0.9837$ |
| **YARI PİK GENİŞLİĞİ** | $y = 0.0486x + 0.0908$ | $y = 0.1521x^{0.2481}$ | $y = 0.027x^2 - 0.0745x + 0.1843$ |
| | $R^2 = 0.722$ | $R^2 = 0.3379$ | $R^2 = 0.986$ |

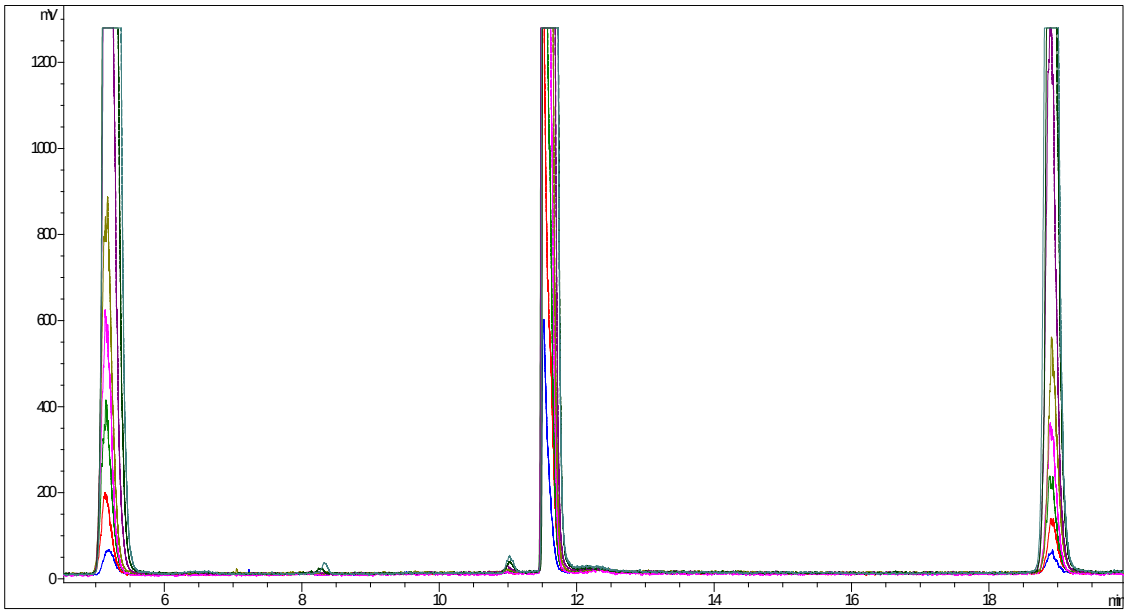



**Şekil 4. 28.** Monoolein standart maddesi konsantrasyon çalışmalarına ait kalibrasyon grafikleri

| | |
|---|---|
| Numune çözücüsü: | **Nötral lipid çözücü [hekzan: asetik asit (99.0:1.0, v/v)]** |
| Numune enjeksiyonu: | 1- 2- 3- 4- 5 µL (Otomatik enjeksiyon) |
| Numune konsantrasyonu: | **— 0.4 µg — 0.8 µg — 1.2 µg — 1.6 µg — 2.0 µg — 4.0 µg** |
| 2nd-D HPLC Kolon: | LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm)+ (5µm 250x4.6mm) |
| Akış hızı: | 1.25 mL/dk |
| Sıcaklık: | 40°C |
| ELSD programı: | Neb 80°C, Buh sıcaklığı 40°C, Azot gazı akış hızı; 1.5 SLM |

Nötral çözücü sistemi ile hazırlanan lipit standartları için oluşturulan kalibrasyon grafiklerinden; analiz verilerinin lineer aralık, üs ve polinom denklemleri korelasyon değerlerinin oldukça yüksek olduğu görülmektedir (~$R^2$ = 0.9996). Özellikle pik alanı verilerinin, denklemler ile uyumunun daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak; bitkisel yağlarda mevcut trigliserit, digliserit ve monogliserit lipit türlerinin kantitatif tayinleri için; pik alanının esas alındığı polinom denklemleri ile oluşturulan kalibrasyon grafiklerinin, daha uygun bir yaklaşım olacağı kanaatine varılmıştır. Standart maddeler için kullanılan çözücü sistemi etkisini değerlendirmek amacıyla; hekzan ile standart maddelere ait çözeltiler tekrar hazırlanmış ve analizler tekrar edilmiştir.

- **Trigliserit** (triolein) + **digliserit** (1,2 diolein,1,3 diolein) + **monogliserit** (monoolein) **standart lipit türlerinden oluşan karışımın analizlerine ait pikler & kalibrasyon grafikleri;**



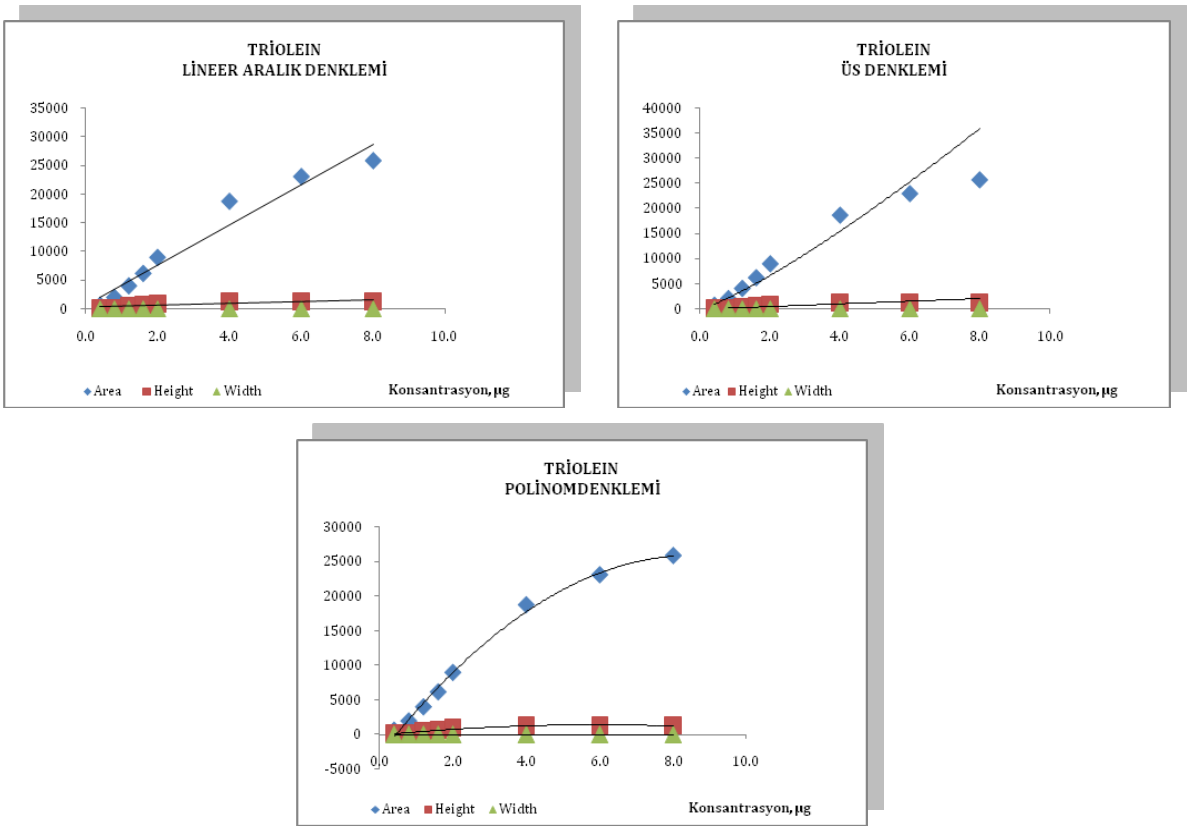

**Şekil 4. 29.** Standart triolein + 1,2 diolein + 1,3 diolein + monoolein 4'lü karışımı konsantrasyon çalışmalarına ait analizlerden elde edilen kromatogramlar

**Triolein tR= 5.2 dk; 1,3- ve 1,2- diolein tR=11.5 dk; monoolein tR=18.9 dk**

| | |
|---|---|
| Numune çözücüsü: | **Hekzan** |
| Numune enjeksiyonu: | 1- 2- 3- 4- 5- 10- 15 ve 20 µL (Otomatik enjeksiyon) |
| Numune konsantrasyonu: | **– 0.4 µg – 0.8 µg – 1.2 µg– 1.6 µg – 2.0 µg– 4.0 µg– 6.0 µg– 8.0 µg** |
| 2nd-D HPLC Kolon: | LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm)+ (5µm 250x4.6mm) |
| Akış hızı**:** | 1.25 mL/dk |
| Sıcaklık: | 40°C |
| ELSD programı: | Neb 80°C, Buh sıcaklığı 40°C, Azot gazı akış hızı; 1.5 SLM |

**Çizelge 4. 9.** Triolein standardı için gerçekleştirilen konsantrasyon çalışmalarına ait analiz verileri

| II. BOYUT AYRIM ANALİZLERİ<br>TRİGLİSERİT (TRİOLEİN) TAYİNİ | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Miktar, µg** | **Time** | **Area** | **Height** | **Width** | **Area%** | **Symmetry** |
| **0.4** | 5.1643 | 705.6667 | 62.3000 | 0.1521 | 14.2630 | 0.7983 |
| **0.8** | 5.1463 | 2039.0000 | 189.4000 | 0.1503 | 16.5047 | 0.6740 |
| **1.2** | 5.1500 | 4061.3333 | 402.2000 | 0.1351 | 20.5300 | 0.7240 |
| **1.6** | 5.1533 | 6216.9333 | 595.6000 | 0.1446 | 25.0300 | 0.7590 |
| **2.0** | 5.1663 | 9006.1000 | 866.4333 | 0.1440 | 29.5430 | 0.9220 |
| **4.0** | 5.2270 | 18747.6000 | 1270.7667 | 0.2301 | 36.7597 | 1.6513 |
| **6.0** | 5.2953 | 23071.6000 | 1269.9333 | 0.2900 | 37.4210 | 2.6043 |
| **8.0** | 5.3400 | 25832.9333 | 1270.8333 | 0.3285 | 37.8570 | 3.2007 |
| | **LİNEER ARALIK DENKLEMİ** | | **ÜS DENKLEMİ** | | **POLİNOM DENKLEMİ** | |
| **ALAN** | $y = 3518.7x + 654.1$ | | $y = 2884.8x^{1.2146}$ | | $y = -396.81x^2 + 6765.3x - 2895.5$ | |
| | **$R^2 = 0.952$** | | **$R^2 = 0.9653$** | | **$R^2 = 0.9959$** | |
| **YÜKSEKLİK** | $y = 159.69x + 261.85$ | | $y = 262.31x^{0.9906}$ | | $y = -43.688x^2 + 517.14x - 128.96$ | |
| | $R^2 = 0.7661$ | | $R^2 = 0.8729$ | | $R^2 = 0.9742$ | |
| **YARI PİK GENİŞLİĞİ** | $y = 0.027x + 0.1158$ | | $y = 0.1518x^{0.2942}$ | | $y = 0.0009x^2 + 0.0199x + 0.1236$ | |
| | $R^2 = 0.9492$ | | $R^2 = 0.7204$ | | $R^2 = 0.9528$ | |



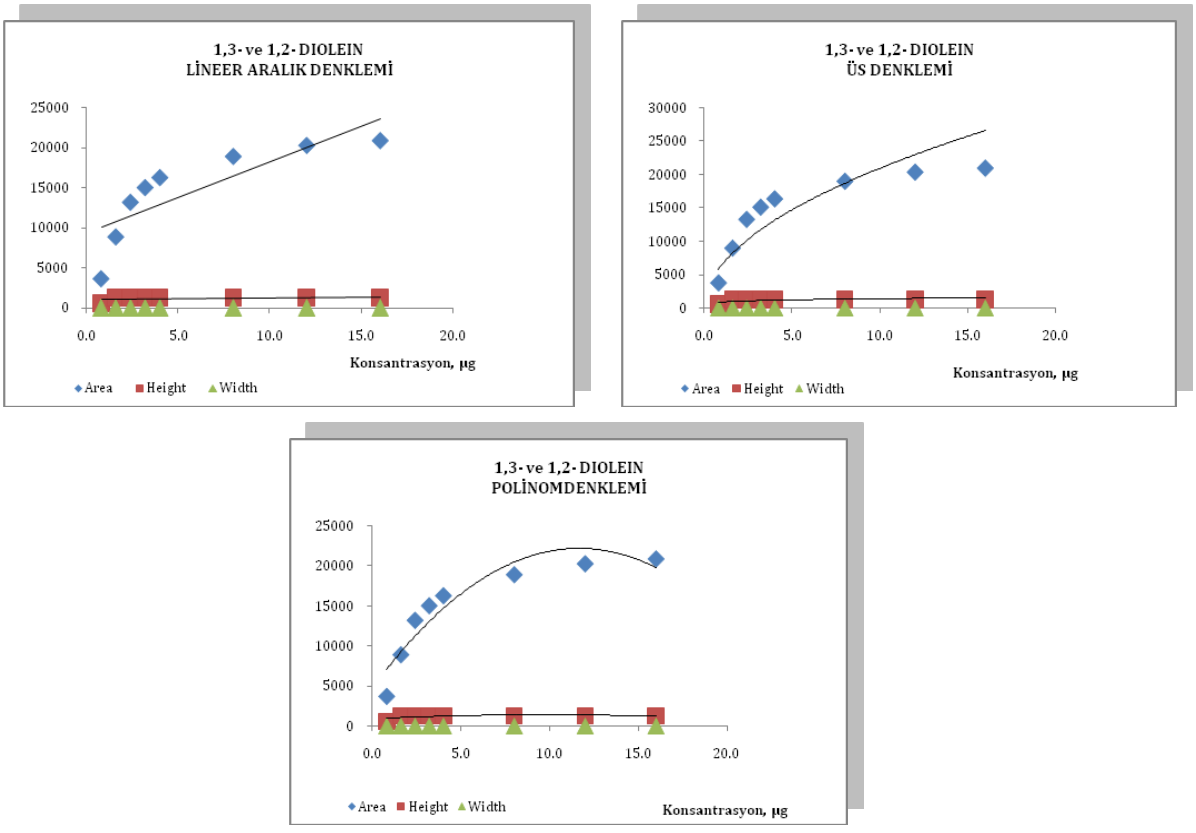

**Şekil 4. 30.** Triolein standart maddesi konsantrasyon çalışmalarına ait kalibrasyon grafikleri

| | |
|---|---|
| Numune çözücüsü: | **Hekzan** |
| Numune enjeksiyonu: | 1- 2- 3- 4- 5- 10- 15 ve 20 µL (Otomatik enjeksiyon) |
| Numune konsantrasyonu: | **– 0.4 µg – 0.8 µg – 1.2 µg– 1.6 µg – 2.0 µg– 4.0 µg– 6.0 µg– 8.0 µg** |
| 2nd-D HPLC Kolon: | LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm)+ (5µm 250x4.6mm) |
| Akış hızı: | 1.25 mL/dk, Sıcaklık: 40°C |
| ELSD programı: | Neb 80°C, Buh sıcaklığı 40°C, Azot gazı akış hızı; 1.5 SLM |

**Çizelge 4. 10.** 1,3- ve 1,2-Diolein standardı için gerçekleştirilen konsantrasyon çalışmalarına ait analiz verileri

| II. BOYUT AYRIM ANALİZLERİ<br>DİGLİSERİT (1,3- ve 1,2- DİOLEİN) TAYİNİ | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Miktar, µg** | **Time** | **Area** | **Height** | **Width** | **Area%** | **Symmetry** |
| **0.4** | 11.5153 | 3702.0000 | 578.6667 | 0.0920 | 74.8510 | 0.3643 |
| **0.8** | 11.5213 | 8927.5333 | 1269.8000 | 0.0987 | 72.2637 | 0.3277 |
| **1.2** | 11.5490 | 13237.6333 | 1265.9333 | 0.1640 | 66.9233 | 0.6783 |
| **1.6** | 11.5953 | 15072.2667 | 1268.2667 | 0.1920 | 60.6843 | 1.4337 |
| **2.0** | 11.6223 | 16321.9000 | 1267.0000 | 0.2083 | 53.5413 | 2.0770 |
| **4.0** | 11.6600 | 18957.1667 | 1263.7333 | 0.2450 | 37.1700 | 2.8467 |
| **6.0** | 11.6977 | 20330.3333 | 1263.0333 | 0.2638 | 32.9750 | 3.2993 |
| **8.0** | 11.7110 | 20931.0000 | 1260.6333 | 0.2724 | 30.6733 | 3.3543 |

| | **LİNEER ARALIK DENKLEMİ** | **ÜS DENKLEMİ** | **POLİNOM DENKLEMİ** |
|---|---|---|---|
| **ALAN** | $y = 890.97x + 9339.2$ | $y = 6507.4x^{0.5085}$ | $y = -128.44x^2 + 2992.7x + 4743.4$ |
| | $R^2 = 0.6765$ | $R^2 = 0.8048$ | $R^2 = 0.8806$ |
| **YÜKSEKLİK** | $y = 16.446x + 1081$ | $y = 909.93x^{0.1686}$ | $y = -5.2375x^2 + 102.15x + 893.55$ |
| | $R^2 = 0.1384$ | $R^2 = 0.39$ | $R^2 = 0.3421$ |
| **YARI PİK GENİŞLİĞİ** | $y = 0.0111x + 0.1256$ | $y = 0.1045x^{0.3907}$ | $y = -0.0014x^2 + 0.0334x + 0.0767$ |
| | **$R^2 = 0.758$** | **$R^2 = 0.8916$** | **$R^2 = 0.9253$** |




**Şekil 4. 31.** 1,3- ve 1,2- Diolein standart maddesi konsantrasyon çalışmalarına ait kalibrasyon grafikleri

Numune çözücüsü: **Hekzan**

Numune enjeksiyonu: 1- 2- 3- 4- 5- 10- 15 ve 20 µL (Otomatik enjeksiyon)

Numune konsantrasyonu: **– 0.4 µg – 0.8 µg – 1.2 µg– 1.6 µg – 2.0 µg– 4.0 µg– 6.0 µg– 8.0 µg**

2nd-D HPLC Kolon: LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm)+ (5µm 250x4.6mm)

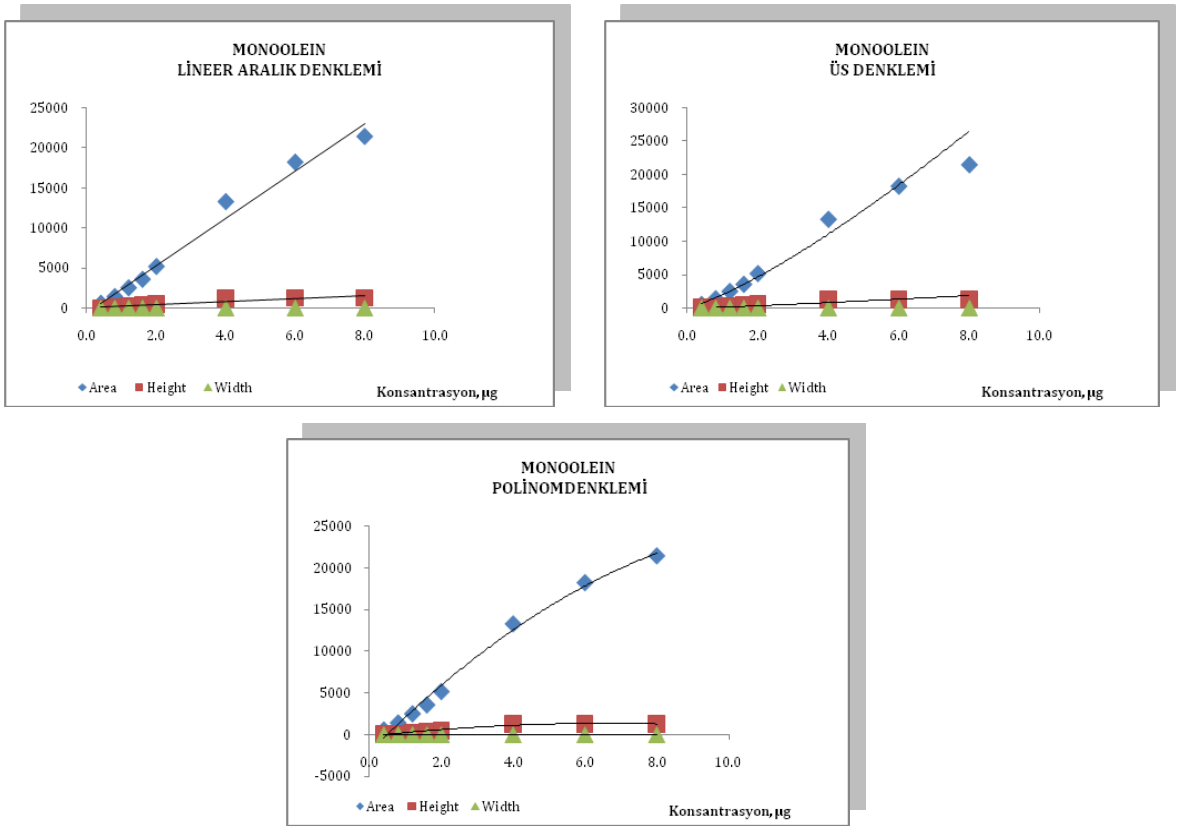
Akış hızı: 1.25 mL/dk, Sıcaklık: 40°C

ELSD programı: Neb 80°C, Buh sıcaklığı 40°C, Azot gazı akış hızı; 1.5 SLM

**Çizelge 4. 11.** Monoolein standardı için gerçekleştirilen konsantrasyon çalışmalarına ait analiz verileri

| II. BOYUT AYRIM ANALİZLERİ<br>MONOGLİSERİT (MONOOLEİN) TAYİNİ | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Miktar, µg** | **Time** | **Area** | **Height** | **Width** | **Area%** | **Symmetry** |
| **0.4** | 18.9043 | 538.2000 | 48.9333 | 0.1534 | 10.8860 | 0.5820 |
| **0.8** | 18.9193 | 1387.5667 | 122.1667 | 0.1539 | 11.2317 | 0.7870 |
| **1.2** | 18.9067 | 2482.2333 | 234.7000 | 0.1514 | 12.5463 | 0.6890 |
| **1.6** | 18.9047 | 3548.1000 | 348.9667 | 0.1346 | 14.2853 | 0.7603 |
| **2.0** | 18.9060 | 5156.8000 | 511.6333 | 0.1470 | 16.9157 | 0.6707 |
| **4.0** | 18.9043 | 13295.7667 | 1251.9667 | 0.1499 | 26.0703 | 0.8660 |
| **6.0** | 18.9577 | 18252.3000 | 1267.1333 | 0.2254 | 29.6040 | 1.6727 |
| **8.0** | 18.9823 | 21474.8000 | 1266.9333 | 0.2697 | 31.4697 | 2.2423 |

| | **LİNEER ARALIK DENKLEMİ** | **ÜS DENKLEMİ** | **POLİNOM DENKLEMİ** |
|---|---|---|---|
| **ALAN** | $y = 2961.8x - 618.4$ | $y = 1906.4x^{1.2667}$ | $y = -170.9x^2 + 4360x - 2147.2$ |
| | **$R^2 = 0.9815$** | **$R^2 = 0.991$** | **$R^2 = 0.9934$** |
| **YÜKSEKLİK** | $y = 181.24x + 87.839$ | $y = 176.91x^{1.1463}$ | $y = -36.617x^2 + 480.83x - 239.71$ |
| | $R^2 = 0.8488$ | $R^2 = 0.9527$ | $R^2 = 0.9746$ |
| **YARI PİK GENİŞLİĞİ** | $y = 0.0157x + 0.126$ | $y = 0.1501x^{0.1674}$ | $y = 0.0034x^2 - 0.0121x + 0.1565$ |
| | $R^2 = 0.8145$ | $R^2 = 0.4938$ | $R^2 = 0.953$ |

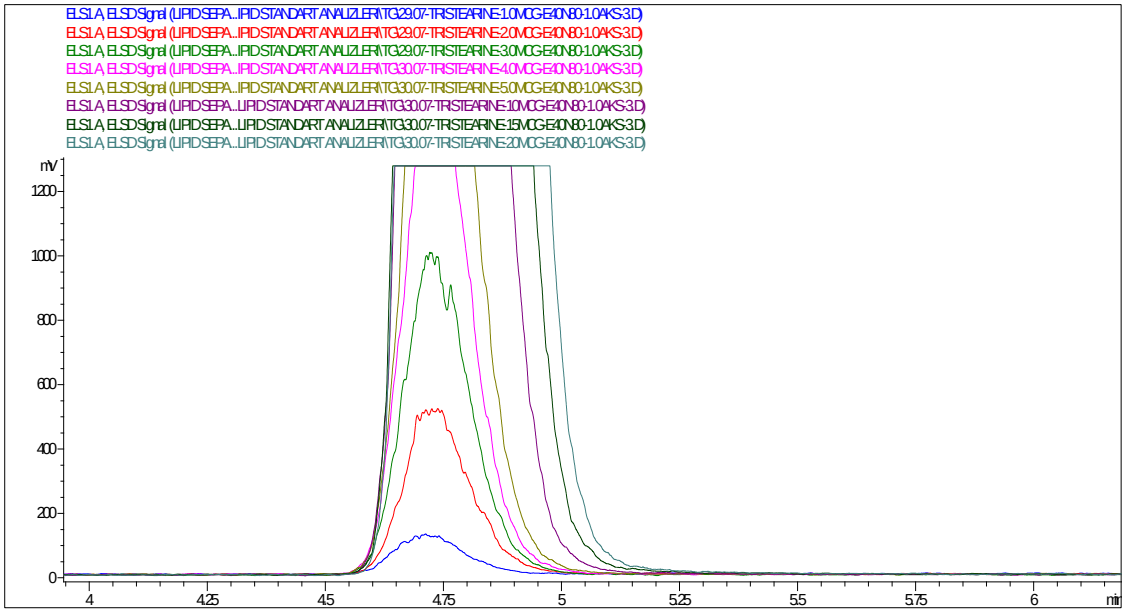



**Şekil 4. 32.** Monoolein standart maddesi konsantrasyon çalışmalarına ait kalibrasyon grafikleri

| | |
|---|---|
| Numune çözücüsü: | **Hekzan** |
| Numune enjeksiyonu: | 1- 2- 3- 4- 5- 10- 15 ve 20 µL (Otomatik enjeksiyon) |
| Numune konsantrasyonu: | – **0.4 µg** – **0.8 µg** – **1.2 µg**– **1.6 µg** – **2.0 µg**– **4.0 µg**– **6.0 µg**– **8.0 µg** |
| 2nd-D HPLC Kolon: | LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm)+ (5µm 250x4.6mm) |
| Akış hızı: | 1.25 mL/dk |
| Sıcaklık: | 40°C |
| ELSD programı: | Neb 80°C, Buh sıcaklığı 40°C, Azot gazı akış hızı; 1.5 SLM |

Triolein, 1,3-diolein, 1,2-diolein ve monoolein lipit standartları kullanılarak yürütülen analizler sonucunda; nötral lipit çözücü sisteminde hazırlanan standartlara göre, hekzan ile hazırlanan standartların oldukça farklı kromatografik davranış sergiledikleri görülmüştür. Şekil 4.24 ve 4.29'da yer alan kromatogramlar karşılaştırıldığında; öncelikle hekzan sistemi analizlerinde digliserit türlerinin ayrımının sağlanamadığı ve tek bir pik halinde tayin edilebildiği görülmektedir. Diğer önemli bir farklılık ise; hekzan ile hazırlanan lipit türlerinin alıkonma süresi ve Rs değerlerinde önemli farklılığın oluşmasıdır. Nötral çözücü sisteminde var olan asetik asit çözücüsü, sistemin elüsyon gücünün farklanmasına ve türlerin alıkonma süresi ve Rs değerlerinin azalmasına neden olmaktadır. Hekzan sisteminde ise; bu değerlerin artmış olması [$t_R$=*5.2 dk (triolein),* $t_R$=*11.5 dk (1,3- ve 1,2-diolein) ve* $t_R$=*18.9 dk (monoolein)*] ve digliserit yapıları ayırma gücüne sahip olmaması gibi dezavantajlar bulunmaktadır.

- **Trigliserit** (tristearin) **standart madde analizlerine ait pikler & kalibrasyon grafikleri;**




**Şekil 4. 33.** Tristearin standart maddesi konsantrasyon çalışmalarına ait analizlerden elde edilen kromatogramlar

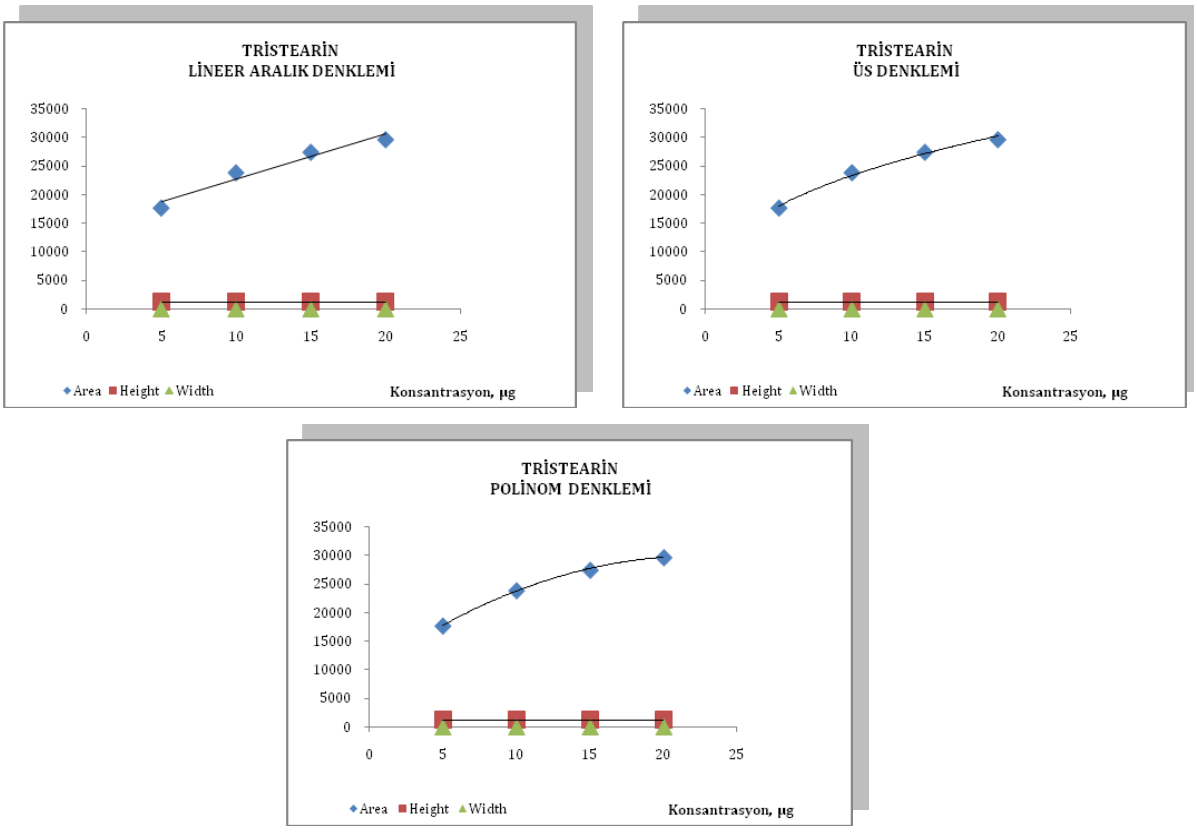
| | |
|---|---|
| Numune çözücüsü: | **Hekzan, Tristearin $t_R$= 4.8 dk** |
| Numune enjeksiyonu: | 1- 2- 3- 4- 5- 10- 15 ve 20 µL (Otomatik enjeksiyon) |
| Numune konsantrasyonu: | **– 1 µg –2 µg – 3 µg– 4 µg – 5 µg– 10 µg – 15 µg – 20 µg** |
| 2nd-D HPLC Kolon: | LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm)+ (5µm 250x4.6mm) |
| Akış hızı: | 1.25 mL/dk |
| Sıcaklık: | 40°C |
| ELSD programı: | Neb 80°C, Buh sıcaklığı 40°C, Azot gazı akış hızı; 1.5 SLM |

* Şekil. 3.6.'da yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.5.'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

**Çizelge 4. 12.** Tristearin standardı için gerçekleştirilen konsantrasyon çalışmalarına ait analiz verileri

| II. BOYUT AYRIM ANALİZLERİ<br>TRİGLİSERİT (TRİSTEARIN) TAYİNİ | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Miktar, µg** | **Time** | **Area** | **Height** | **Width** | **Area%** | **Symmetry** |
| **5** | 4.7870 | 17767.2000 | 1270.3000 | 0.2172 | 97.9970 | 1.6850 |
| **10** | 4.8670 | 23952.8000 | 1273.1000 | 0.3035 | 98.2360 | 3.0610 |
| **15** | 4.9130 | 27524.1000 | 1270.9000 | 0.3507 | 98.3200 | 3.6480 |
| **20** | 4.9470 | 29727.0000 | 1271.9000 | 0.3807 | 98.5430 | 4.1430 |

| | **LİNEER ARALIK DENKLEMİ** | **ÜS DENKLEMİ** | **POLİNOM DENKLEMİ** |
|---|---|---|---|
| **ALAN** | $y = 789.01x + 14880$ | $y = 9843.4x^{0.3758}$ | $y = -39.827x^2 + 1784.7x + 9901.7$ |
| | **$R^2 = 0.9506$** | **$R^2 = 0.9915$** | **$R^2 = 0.9991$** |
| **YÜKSEKLİK** | $y = 0.052x + 1270.9$ | $y = 1269.7x^{0.0006}$ | $y = -0.018x^2 + 0.502x + 1268.7$ |
| | $R^2 = 0.0749$ | $R^2 = 0.1464$ | $R^2 = 0.2545$ |
| **YARI PİK GENİŞLİĞİ** | $y = 0.0108x + 0.1786$ | $y = 0.1145x^{0.4094}$ | $y = -0.0006x^2 + 0.0248x + 0.1082$ |
| | $R^2 = 0.9465$ | $R^2 = 0.9885$ | $R^2 = 0.9984$ |




**Şekil 4. 34.** Tristearin standart maddesi konsantrasyon çalışmalarına ait kalibrasyon grafikleri

Numune çözücüsü: **Hekzan**

Numune enjeksiyonu: 5- 10- 15 ve 20 µL (Otomatik enjeksiyon)

Numune konsantrasyonu: **– 5 µg –10 µg – 15 µg– 20 µg**

2nd-D HPLC Kolon: LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm)+ (5µm 250x4.6mm)

Akış hızı**:** 1.25 mL/dk

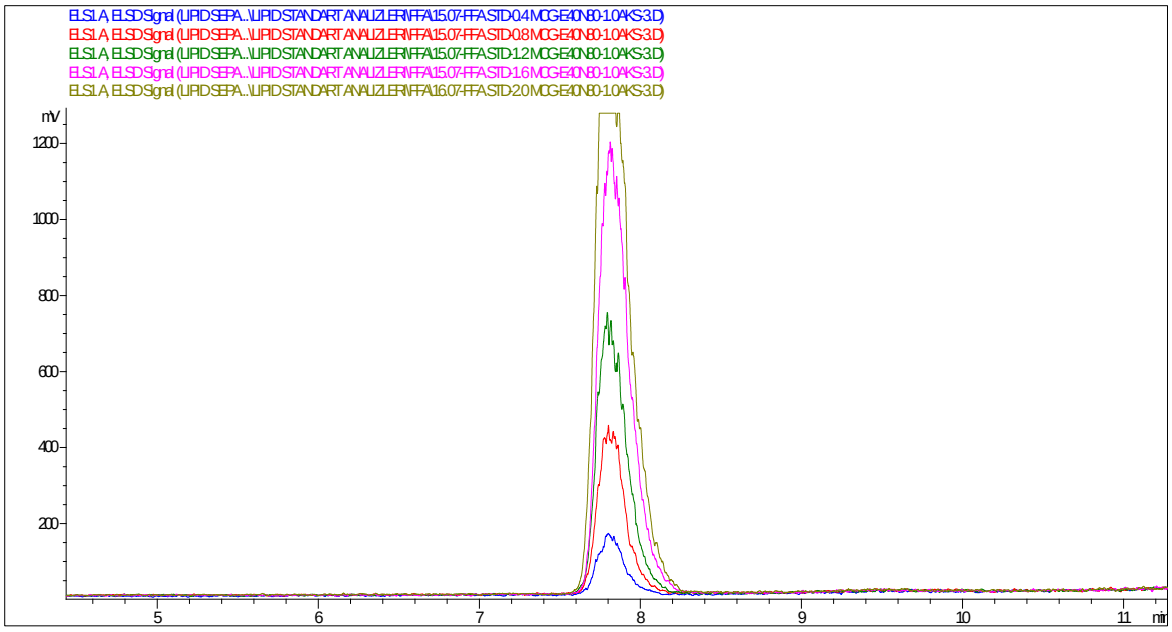
Sıcaklık: 40°C

ELSD programı: Neb 80°C, Buh sıcaklığı 40°C, Azot gazı akış hızı; 1.5 SLM

* Şekil. 3.6.'da yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.5.'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

Şekil 4.33'de yer alan kromatogramlardan görüleceği üzere; tristearin türüne ait alıkonma süresi, $t_R$=4.8 dk olarak tespit edilmiştir. Triolein bileşiğinin tayininde tespit edilen alıkonma süresinden farklı alıkonma süresinin nedeni; trigliserit türlerinin polaritelerindeki farklılıklar ile ilişkilendirilmiştir. Tristearin türünün kantitatif tayini için; pik alanı, yüksekliği ve yarı genişliği esas alınarak çizilen kalibrasyon grafiklerinden; analiz verilerinin lineer aralık, üs ve polinom denklemlerine ait korelasyon değerlerinin oldukça yüksek olduğu görülmektedir.

- **<u>Serbest yağ asidi, FFA</u>** (oleik asit, stearik asit) **<u>standart madde analizlerine ait pikler & kalibrasyon grafikleri;</u>**




**Şekil 4. 35.** Oleik asit standart maddesi konsantrasyon çalışmalarına ait analizlerden elde edilen kromatogramlar

**Oleik asit; $t_R$= 7.8 dk**

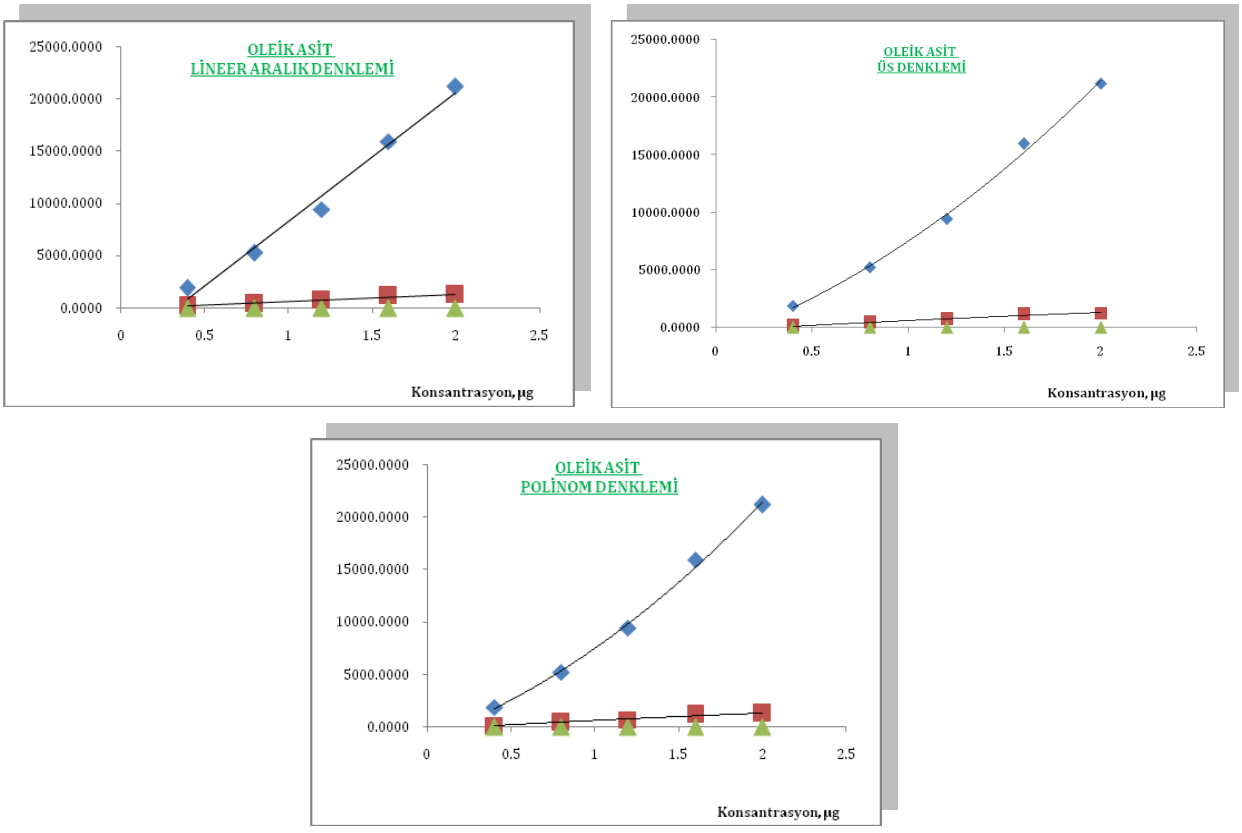
| | |
|---|---|
| <u>Numune çözücüsü</u>: | **Hekzan** |
| <u>Numune enjeksiyonu</u>: | 1- 2- 3- 4- 5 µL (Otomatik enjeksiyon) |
| <u>Numune konsantrasyonu</u>: | **– 0.4 µg –0.8 µg – 1.2 µg– 1.6 µg – 2.0 µg** |
| <u>2nd-D HPLC Kolon</u>: | LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm)+ (5µm 250x4.6mm) |
| <u>Akış hızı</u>**:** | 1.25 mL/dk |
| <u>Sıcaklık</u>: | 40°C |
| <u>ELSD programı</u>: | Neb 80°C, Buh sıcaklığı 40°C, Azot gazı akış hızı; 1.5 SLM |

* Şekil. 3.6.'da yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.5.'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

**Çizelge 4. 13.** Oleik asit standardı için gerçekleştirilen konsantrasyon çalışmalarına ait analiz verileri

| II. BOYUT AYRIM ANALİZLERİ<br>SERBEST YAG ASİDİ (OLEİK ASİT) TAYİNİ | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Miktar, µg** | **Time** | **Area** | **Height** | **Width** | **Area%** | **Symmetry** |
| **0.4** | 7.8010 | 1899.0000 | 161.5000 | 0.1471 | 100.0000 | 0.6670 |
| **0.8** | 7.8010 | 5256.3000 | 434.6000 | 0.1451 | 100.0000 | 0.6380 |
| **1.2** | 7.8150 | 9449.7000 | 715.0000 | 0.1742 | 100.0000 | 0.7410 |
| **1.6** | 7.8120 | 15957.2000 | 1172.8000 | 0.1707 | 100.0000 | 0.6020 |
| **2** | 7.8330 | 21208.3000 | 1264.3000 | 0.2277 | 100.0000 | 0.8480 |

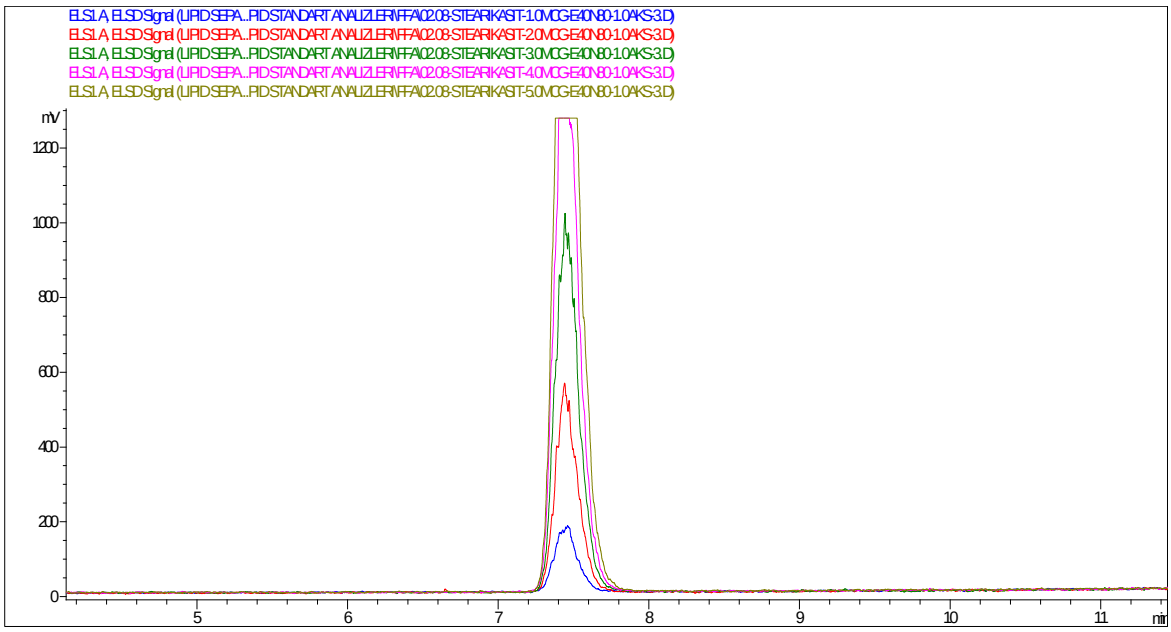
| | **LİNEER ARALIK DENKLEMİ** | **ÜS DENKLEMİ** | **POLİNOM DENKLEMİ** |
|---|---|---|---|
| **ALAN** | $y = 12330x - 4041.7$ | $y = 7477.4x^{1.5124}$ | $y = 2724x^2 + 5792.3x - 990.9$ |
| | **$R^2 = 0.986$** | **$R^2 = 0.9988$** | **$R^2 = 0.9967$** |
| **YÜKSEKLİK** | $y = 735.95x - 133.5$ | $y = 563.15x^{1.3246}$ | $y = -82.946x^2 + 935.02x - 226.4$ |
| | $R^2 = 0.9734$ | $R^2 = 0.9906$ | $R^2 = 0.9761$ |
| **YARI PİK GENİŞLİĞİ** | $y = 0.0467x + 0.1169$ | $y = 0.169x^{0.2328}$ | $y = 0.0381x^2 - 0.0448x + 0.1596$ |
| | $R^2 = 0.7845$ | $R^2 = 0.6636$ | $R^2 = 0.9016$ |




**Şekil 4. 36.** Oleik asit standart maddesi konsantrasyon çalışmalarına ait kalibrasyon grafikleri

Numune çözücüsü: **Hekzan**
Numune enjeksiyonu: 1- 2- 3- 4 ve 5 µL (Otomatik enjeksiyon)
Numune konsantrasyonu: **– 0.4 µg –0.8 µg – 1.2 µg– 1.6 µg – 2.0 µg**
2nd-D HPLC Kolon: LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm)+ (5µm 250x4.6mm)
Akış hızı: 1.25 mL/dk
Sıcaklık: 40°C
ELSD programı: Neb 80°C, Buh sıcaklığı 40°C, Azot gazı akış hızı; 1.5 SLM

* Şekil. 3.6.'da yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.5.'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.




**Şekil 4. 37.** Stearik asit standart maddesi konsantrasyon çalışmalarına ait analizlerden elde edilen kromatogramlar

**Stearik asit; tR= 7.45 dk**

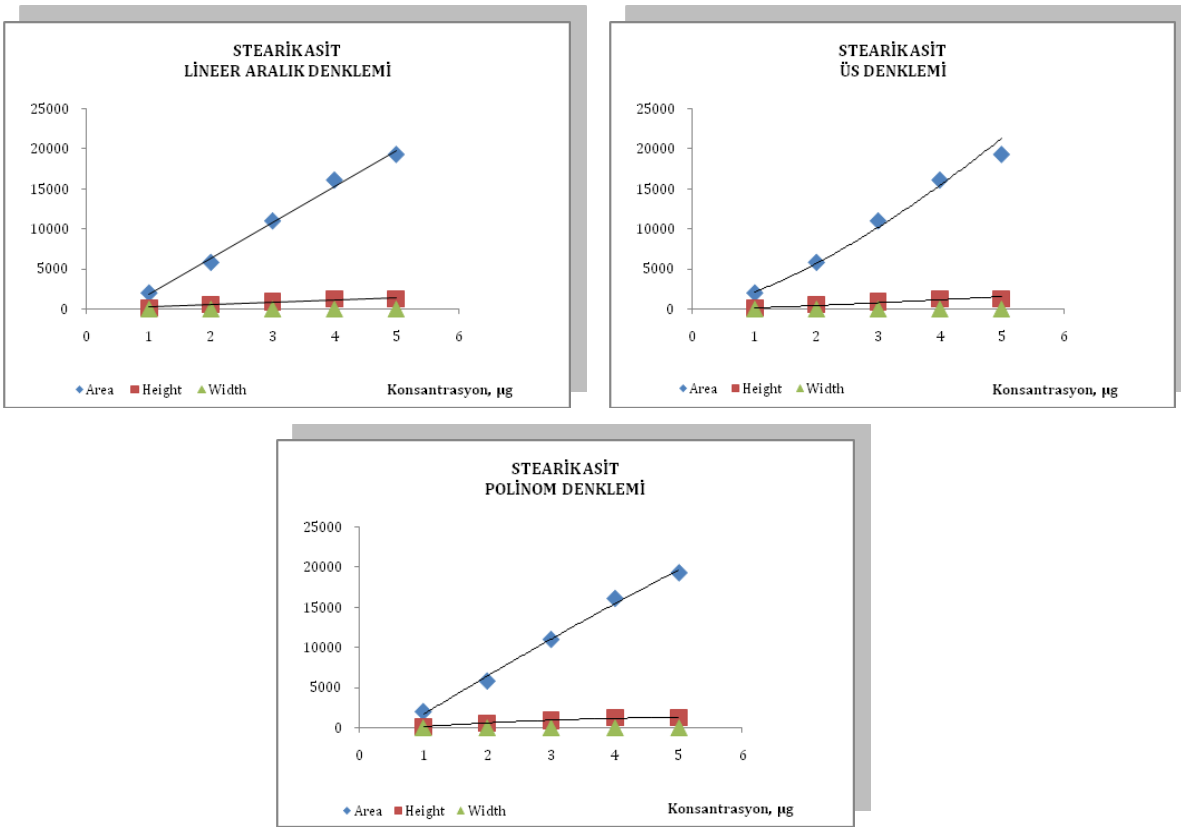
| | |
|---|---|
| Numune çözücüsü: | **Hekzan** |
| Numune enjeksiyonu: | 1- 2- 3- 4- 5 µL (Otomatik enjeksiyon) |
| Numune konsantrasyonu: | **– 1 µg –2 µg – 3 µg– 4 µg – 5 µg** |
| 2nd-D HPLC Kolon: | LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm)+ (5µm 250x4.6mm) |
| Akış hızı**:** | 1.25 mL/dk |
| Sıcaklık: | 40°C |
| ELSD programı: | Neb 80°C, Buh sıcaklığı 40°C, Azot gazı akış hızı; 1.5 SLM |

* Şekil. 3.6.'da yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.5.'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

**Çizelge 4. 14.** Stearik asit standardı için gerçekleştirilen konsantrasyon çalışmalarına ait analiz verileri

| II. BOYUT AYRIM ANALİZLERİ<br>SERBEST YAG ASİDİ (STEARİK ASİT) TAYİNİ | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Miktar, µg** | **Time** | **Area** | **Height** | **Width** | **Area%** | **Symmetry** |
| **1** | 7.9270 | 995.3000 | 79.3000 | 0.1724 | 100.0000 | 0.6180 |
| **2** | 7.9510 | 2915.7000 | 238.8000 | 0.1524 | 100.0000 | 0.7780 |
| **3** | 7.9590 | 5013.4000 | 349.9000 | 0.1892 | 100.0000 | 0.8170 |
| **4** | 7.9590 | 7486.8000 | 531.6000 | 0.1783 | 100.0000 | 0.6470 |
| **5** | 7.9760 | 9697.1000 | 585.4000 | 0.2013 | 100.0000 | 0.6050 |

| | **LİNEER ARALIK DENKLEMİ** | **ÜS DENKLEMİ** | **POLİNOM DENKLEMİ** |
|---|---|---|---|
| **ALAN** | $y = 4500.1x - 2666.4$ | $y = 2060.1x^{1.4531}$ | $y = -94.136x^2 + 5064.9x - 3325.3$ |
| | **$R^2 = 0.9941$** | **$R^2 = 0.9939$** | **$R^2 = 0.9947$** |
| **YÜKSEKLİK** | $y = 290.16x - 24.32$ | $y = 199.7x^{1.2867}$ | $y = -61.757x^2 + 660.7x - 456.62$ |
| | $R^2 = 0.9288$ | $R^2 = 0.959$ | $R^2 = 0.9877$ |
| **YARI PİK GENİŞLİĞİ** | $y = 0.0225x + 0.1086$ | $y = 0.134x^{0.266}$ | $y = 0.0086x^2 - 0.0291x + 0.1687$ |
| | $R^2 = 0.8278$ | $R^2 = 0.6504$ | $R^2 = 0.9971$ |




**Şekil 4. 38.** Stearik asit standart maddesi konsantrasyon çalışmalarına ait kalibrasyon grafikleri

Numune çözücüsü: **Hekzan**

Numune enjeksiyonu: 1- 2- 3- 4 ve 5 µL (Otomatik enjeksiyon)

Numune konsantrasyonu: **– 1 µg –2 µg – 3 µg– 4 µg – 5 µg**

2nd-D HPLC Kolon: LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm)+ (5µm 250x4.6mm)

Akış hızı**:** 1.25 mL/dk

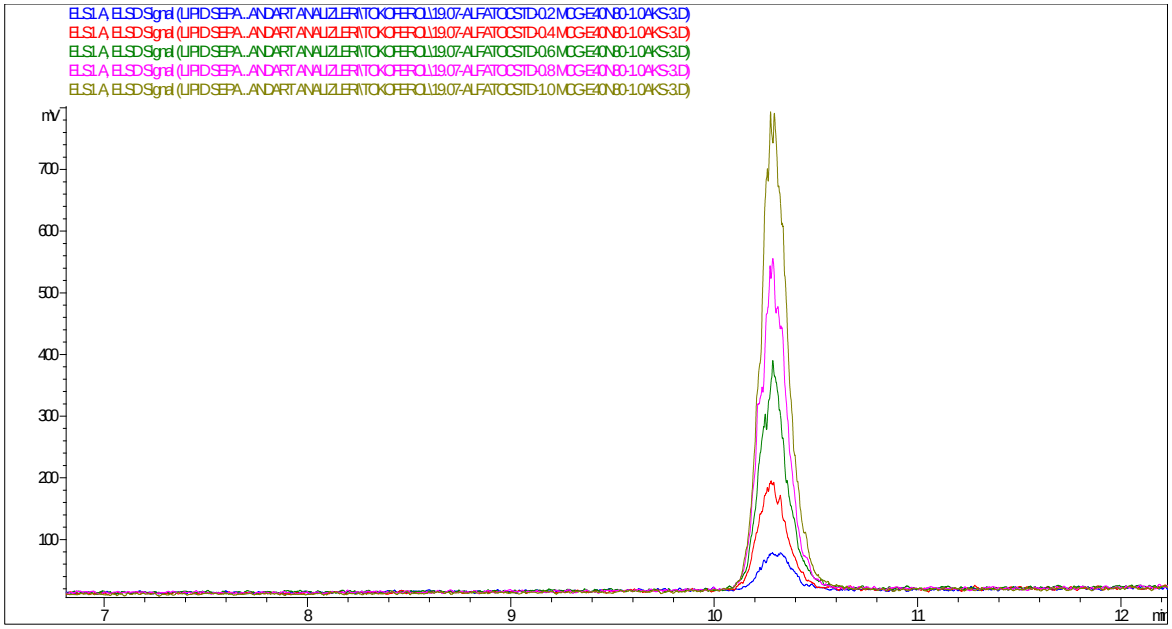
Sıcaklık: 40°C

ELSD programı: Neb 80°C, Buh sıcaklığı 40°C, Azot gazı akış hızı; 1.5 SLM

* Şekil. 3.6.'da yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.5.'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

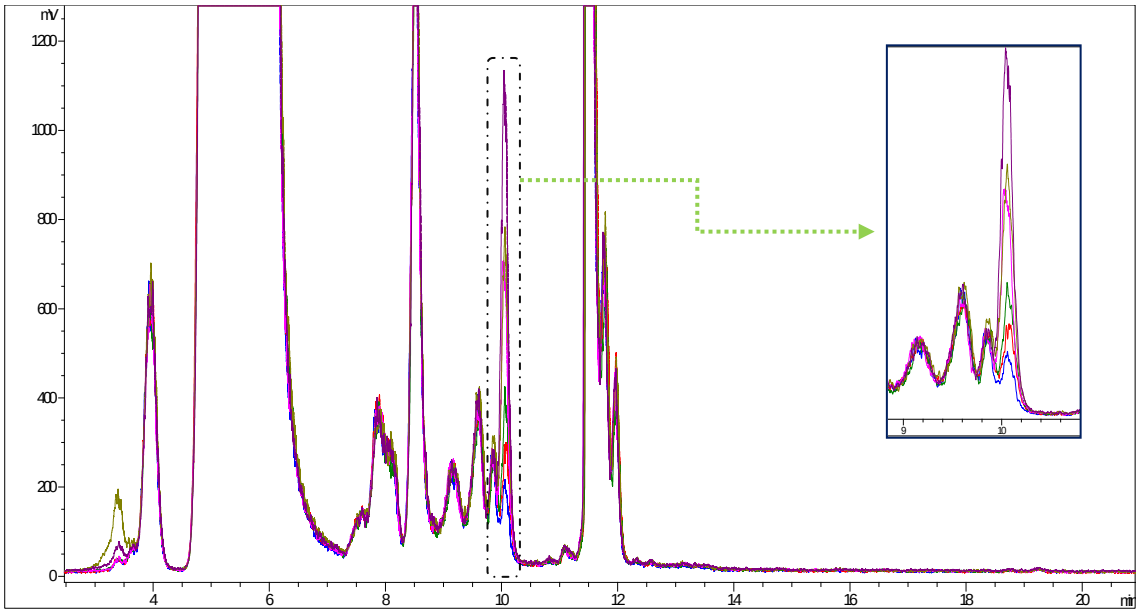
FFA standartları ile yürütülen analizlere ait sonuçlar incelendiğinde; pik alanı, yüksekliği ve yarı genişliği esas alınarak çizilen kalibrasyon grafiklerinden; analiz verilerinin, lineer aralık, üs ve polinom denklemlerine ait korelasyon değerlerinin oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Gerçekleştirilen analizlerde; oleik ve stearik asit standartlarına ait alıkonma süreleri sırasıyla; $t_R$=7.80 ve 7.45 dk olarak tespit edilmiştir. Oleik ve stearik asit için tespit edilen alıkonma süresindeki bu değişiklik; FFA türlerinin polaritelerindeki farklılık ile ilişkilendirilmiştir.

- **Tokoferol** (α-, β-, γ-ve δ- tokoferol ) **standart madde analizlerine ait pikler & kalibrasyon grafikleri;**
  - **α- tokoferol analizleri:**




**Şekil 4. 39.** Alfa (α) tokoferol standart maddesi konsantrasyon çalışmalarına ait analizlerden elde edilen kromatogramlar

| | |
|---|---|
| Numune çözücüsü: | **Hekzan ; Alfa tokoferol için tR= 10.3 dk** |
| Numune enjeksiyonu: | 0.2- 0.4-0.6-0.8-1.0 µL (Otomatik enjeksiyon) |
| Numune konsantrasyonu: | **– 0.2 µg –0.4 µg – 0.6 µg– 0.8 µg – 1.0 µg** |
| 2nd-D HPLC Kolon: | LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm)+ (5µm 250x4.6mm) |
| Akış hızı: | 1.25 mL/dk, Sıcaklık: 40°C |
| ELSD programı: | Neb 80°C, Buh sıcaklığı 40°C, Azot gazı akış hızı; 1.5 SLM |




**Şekil 4. 40.** Alfa (α-) tokoferol standart maddesi ile standart ekleme metoduna göre gerçekleştirilen konsantrasyon çalışmalarına ait analizlerden elde edilen kromatogramlar

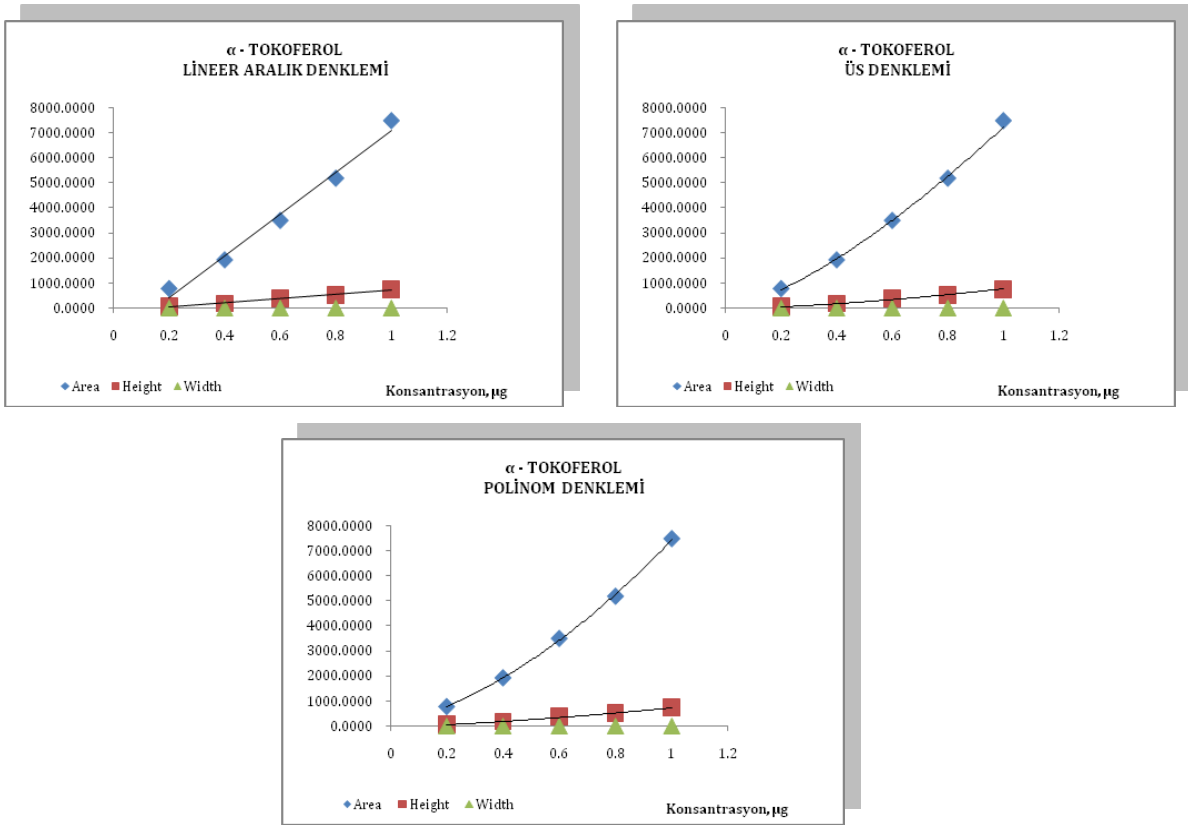
**Alfa tokoferol; tR= 10.3 dk**

| | |
|---|---|
| Numune çözücüsü: | **Hekzan** |
| Numune enjeksiyonu: | 5.0 µL (Otomatik enjeksiyon) |
| Numune konsantrasyonu: | **– 0.5 mg ham ayçiçeği yağı, +0.35 µg T – 0.70 µg T– 1.05 µg – 1.40 µg– 1.75 µgT** |
| 2nd-D HPLC Kolon: | LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm)+ (5µm 250x4.6mm) |
| Akış hızı**:** | 1.25 mL/dk, Sıcaklık: 40°C |
| ELSD programı: | Neb 80°C, Buh sıcaklığı 40°C, Azot gazı akış hızı; 1.5 SLM |

**Çizelge 4. 15.** Alfa (α-) tokoferol standardı için gerçekleştirilen konsantrasyon çalışmalarına ait analiz verileri

| II. BOYUT AYRIM ANALİZLERİ<br>TOKOFEROL (Alfa (α) tokoferol) TAYİNİ | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Miktar, µg** | **Time** | **Area** | **Height** | **Width** | **Area%** | **Symmetry** |
| **0.2** | 10.2890 | 762.2000 | 60.6000 | 0.1569 | 52.5620 | 0.5840 |
| **0.4** | 10.2800 | 1914.3000 | 177.1000 | 0.1441 | 72.1680 | 0.7730 |
| **0.6** | 10.2920 | 3493.5000 | 366.9000 | 0.1331 | 81.0730 | 0.9460 |
| **0.8** | 10.2850 | 5182.5000 | 520.4000 | 0.1302 | 85.1260 | 0.7700 |
| **1** | 10.2890 | 7490.2000 | 736.0000 | 0.1547 | 89.1690 | 0.7740 |

| | **LİNEER ARALIK DENKLEMİ** | **ÜS DENKLEMİ** | **POLİNOM DENKLEMİ** |
|---|---|---|---|
| **ALAN** | $y = 8362.1x - 1248.7$ | $y = 7234.6x^{1.4133}$ | $y = 4323.2x^2 + 3174.2x - 38.22$ |
| | **$R^2 = 0.9848$** | **$R^2 = 0.999$** | **$R^2 = 0.9995$** |
| **YÜKSEKLİK** | $y = 847.05x - 136.03$ | $y = 754.12x^{1.5602}$ | $y = 289.11x^2 + 500.12x - 55.08$ |
| | $R^2 = 0.9914$ | $R^2 = 0.9981$ | $R^2 = 0.9978$ |
| **YARI PİK GENİŞLİĞİ** | $y = -0.0091x + 0.1493$ | $y = 0.1383x^{-0.056}$ | $y = 0.1477x^2 - 0.1864x + 0.1906$ |
| | $R^2 = 0.0568$ | $R^2 = 0.174$ | $R^2 = 0.8848$ |

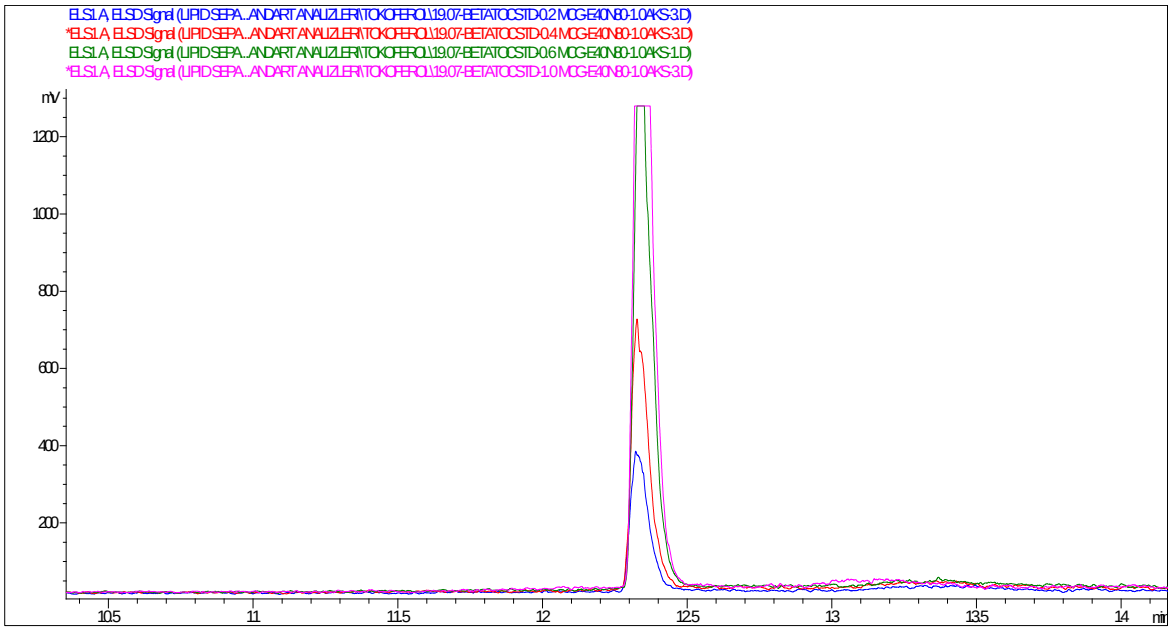



**Şekil 4. 41.** Alfa (α) tokoferol standart maddesi konsantrasyon çalışmalarına ait kalibrasyon grafikleri

| | |
|---|---|
| Numune çözücüsü: | **Hekzan** |
| Numune enjeksiyonu: | 0.2- 0.4-0.6-0.8-1.0 µL (Otomatik enjeksiyon) |
| Numune konsantrasyonu: | **– 0.2 µg –0.4 µg – 0.6 µg– 0.8 µg – 1.0 µg** |
| 2nd-D HPLC Kolon: | LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm)+ (5µm 250x4.6mm) |
| Akış hızı**:** | 1.25 mL/dk |
| Sıcaklık: | 40°C |
| ELSD programı: | Neb 80°C, Buh sıcaklığı 40°C, Azot gazı akış hızı; 1.5 SLM |

* Şekil. 3.6.'da yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.5.'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

- **β- tokoferol analizleri:**




**Şekil 4. 42.** Beta (β) tokoferol standart maddesi konsantrasyon çalışmalarına ait analizlerden elde edilen kromatogramlar

**Beta tokoferol; tR= 12.3 dk**

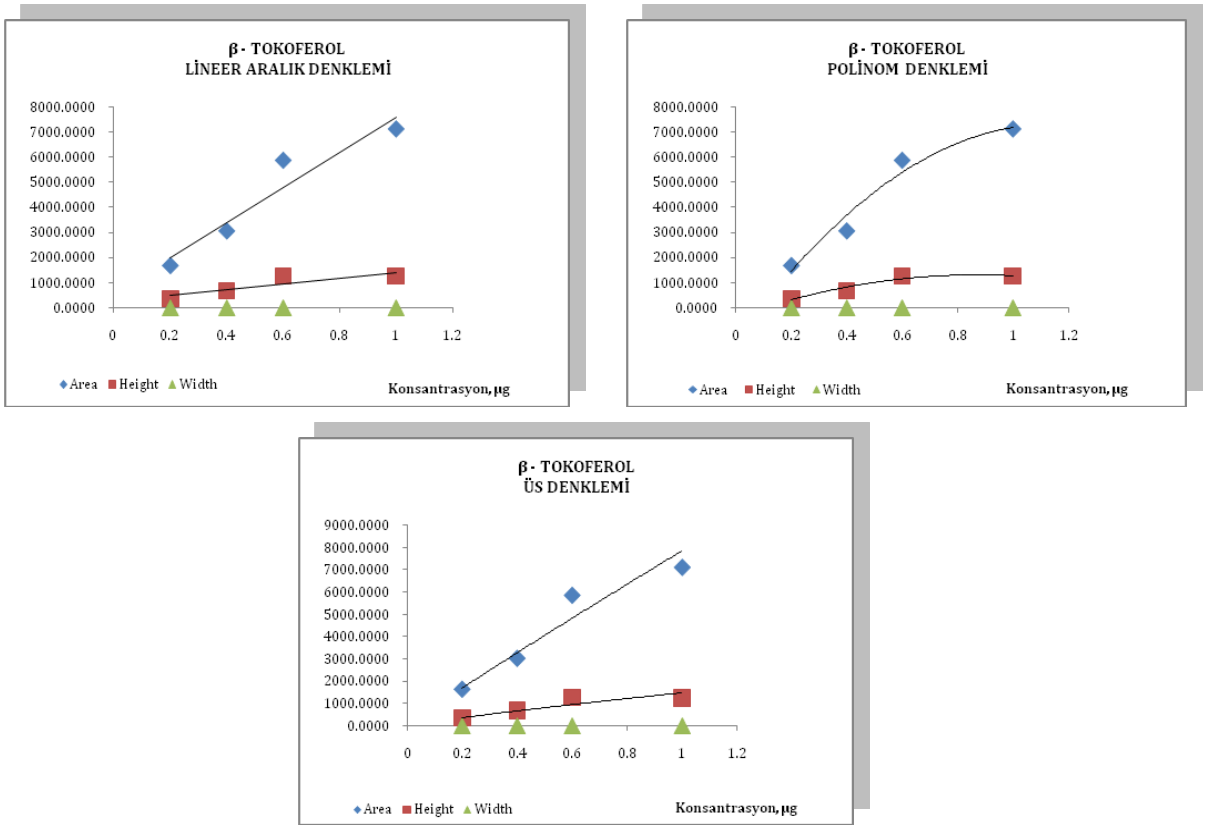
| | |
|---|---|
| Numune çözücüsü: | **Hekzan** |
| Numune enjeksiyonu: | 0.2- 0.4-0.6-1.0 µL (Otomatik enjeksiyon) |
| Numune konsantrasyonu: | **– 0.2 µg –0.4 µg – 0.6 µg– 1.0 µg** |
| 2nd-D HPLC Kolon: | LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm)+ (5µm 250x4.6mm) |
| Akış hızı**:** | 1.25 mL/dk |
| Sıcaklık: | 40°C |
| ELSD programı: | Neb 80°C, Buh sıcaklığı 40°C, Azot gazı akış hızı; 1.5 SLM |

* Şekil. 3.6.'da yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.4.'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

**Çizelge 4. 16.** Beta (β) tokoferol standardı için gerçekleştirilen konsantrasyon çalışmalarına ait analiz verileri

| II. BOYUT AYRIM ANALİZLERİ<br>TOKOFEROL (Beta (β) tokoferol) TAYİNİ | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Miktar, µg** | **Time** | **Area** | **Height** | **Width** | **Area%** | **Symmetry** |
| **0.2** | 12.3300 | 1666.1000 | 354.1000 | 0.0729 | 100.0000 | 0.6330 |
| **0.4** | 12.3370 | 3048.3000 | 671.9000 | 0.0709 | 100.0000 | 0.6110 |
| **0.6** | 12.3410 | 5870.2000 | 1253.9000 | 0.0726 | 100.0000 | 0.6140 |
| **1** | 11.5730 | 7120.8000 | 1251.1000 | 0.0904 | 100.0000 | 0.6910 |

| | **LİNEER ARALIK DENKLEMİ** | **ÜS DENKLEMİ** | **POLİNOM DENKLEMİ** |
|---|---|---|---|
| **ALAN** | $y = 7021.4x + 564.58$ | $y = 7868.9x^{0.953}$ | $y = -6754.6x^2 + 15320x - 1365.3$ |
| | **$R^2 = 0.9148$** | **$R^2 = 0.9592$** | **$R^2 = 0.9634$** |
| **YÜKSEKLİK** | $y = 1145.6x + 252.65$ | $y = 1485x^{0.8454}$ | $y = -2264x^2 + 3927.1x - 394.2$ |
| | $R^2 = 0.769$ | $R^2 = 0.9049$ | $R^2 = 0.9416$ |
| **YARI PİK GENİŞLİĞİ** | $y = 0.0233x + 0.0639$ | $y = 0.0836x^{0.1203}$ | $y = 0.0556x^2 - 0.045x + 0.0798$ |
| | $R^2 = 0.7532$ | $R^2 = 0.5182$ | $R^2 = 0.9996$ |

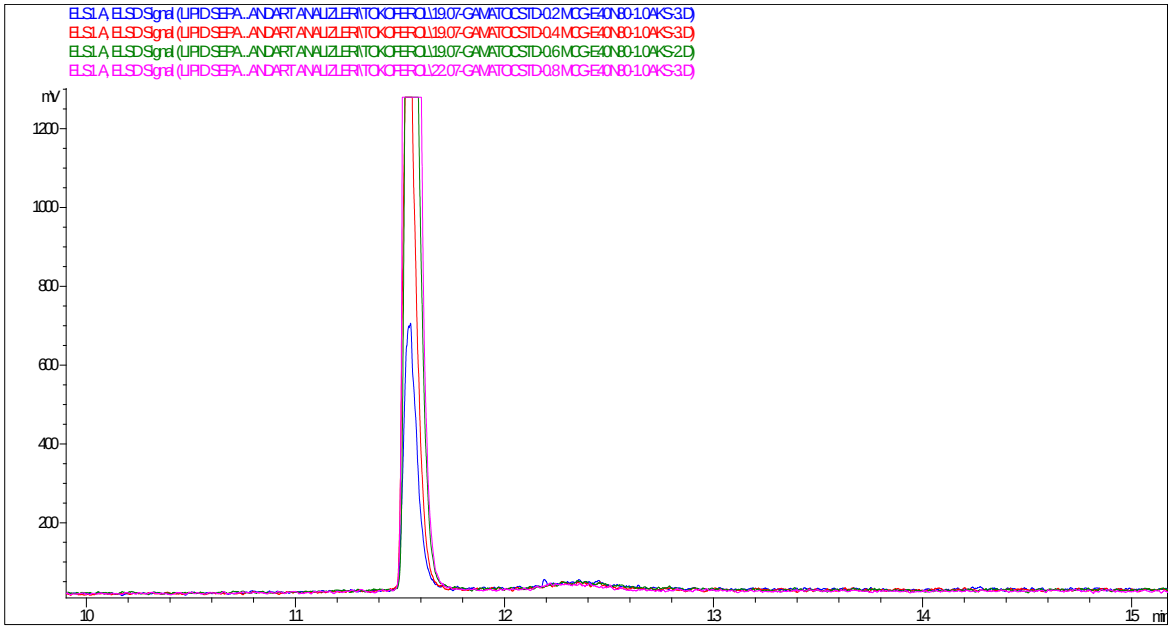



**Şekil 4. 43.** Beta (β) tokoferol standart maddesi konsantrasyon çalışmalarına ait kalibrasyon grafikleri

| | |
|---|---|
| Numune çözücüsü: | **Hekzan** |
| Numune enjeksiyonu: | 0.2- 0.4-0.6-1.0 µL (Otomatik enjeksiyon) |
| Numune konsantrasyonu: | **– 0.2 µg –0.4 µg – 0.6 µg– 1.0 µg** |
| 2nd-D HPLC Kolon: | LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm)+ (5µm 250x4.6mm) |
| Akış hızı: | 1.25 mL/dk, |
| Sıcaklık: | 40°C |
| ELSD programı: | Neb 80°C, Buh sıcaklığı 40°C, Azot gazı akış hızı; 1.5 SLM |

* Şekil. 3.6.'da yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.5.'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

- **<u>γ- tokoferol analizleri:</u>**




**Şekil 4. 44.** Gama (γ) tokoferol standart maddesi konsantrasyon çalışmalarına ait analizlerden elde edilen kromatogramlar

**Gama tokoferol; tR= 11.6 dk**

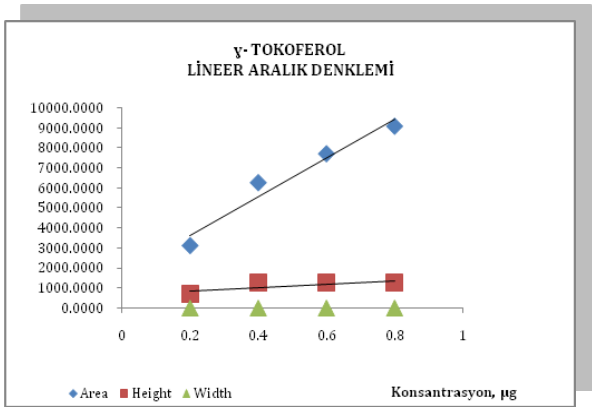
| | |
|---|---|
| <u>Numune çözücüsü</u>: | **Hekzan** |
| <u>Numune enjeksiyonu</u>: | 0.2- 0.4-0.6-0.8 µL (Otomatik enjeksiyon) |
| <u>Numune konsantrasyonu</u>: | **– 0.2 µg –0.4 µg – 0.6 µg– 0.8 µg** |
| <u>2nd-D HPLC Kolon</u>: | LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm)+ (5µm 250x4.6mm) |
| <u>Akış hızı</u>**:** | 1.25 mL/dk |
| <u>Sıcaklık</u>: | 40°C |
| <u>ELSD programı</u>: | Neb 80°C, Buh sıcaklığı 40°C, Azot gazı akış hızı; 1.5 SLM |

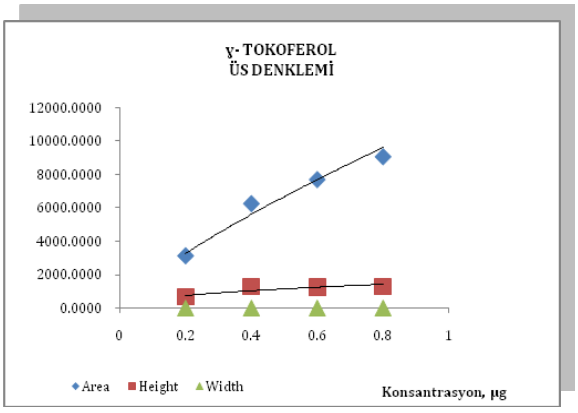
* Şekil. 3.6.'da yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.5.'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

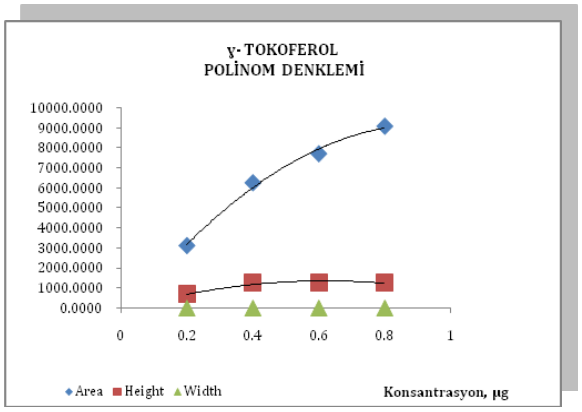
**Çizelge 4. 17.** Gama (ɣ) tokoferol standardı için gerçekleştirilen konsantrasyon çalışmalarına ait analiz verileri

| II. BOYUT AYRIM ANALİZLERİ<br>TOKOFEROL (Gama (ɣ) tokoferol) TAYİNİ | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Miktar, µg** | **Time** | **Area** | **Height** | **Width** | **Area%** | **Symmetry** |
| **0.2** | 11.5450 | 3112.9000 | 673.1000 | 0.0740 | 100.0000 | 0.6500 |
| **0.4** | 11.5420 | 6263.8000 | 1255.8000 | 0.0802 | 100.0000 | 0.6510 |
| **0.6** | 11.5600 | 7717.5000 | 1253.1000 | 0.0999 | 100.0000 | 0.7750 |
| **0.8** | 11.5730 | 9095.1000 | 1257.1000 | 0.1164 | 100.0000 | 1.2200 |

| | **LİNEER ARALIK DENKLEMİ** | **ÜS DENKLEMİ** | **POLİNOM DENKLEMİ** |
|---|---|---|---|
| **ALAN** | $y = 9700.1x + 1697.3$ | $y = 11434x^{0.7745}$ | $y = -11083x^2 + 20783x - 519.38$ |
| | **$R^2 = 0.9535$** | **$R^2 = 0.9734$** | **$R^2 = 0.9933$** |
| **YÜKSEKLİK** | $y = 874.65x + 672.45$ | $y = 1558.9x^{0.457}$ | $y = -3616.9x^2 + 4491.5x - 50.925$ |
| | $R^2 = 0.6018$ | $R^2 = 0.7771$ | $R^2 = 0.9311$ |
| **YARI PİK GENİŞLİĞİ** | $y = 0.0735x + 0.0559$ | $y = 0.1187x^{0.3239}$ | $y = 0.0644x^2 + 0.0091x + 0.0688$ |
| | $R^2 = 0.9639$ | $R^2 = 0.8884$ | $R^2 = 0.9875$ |



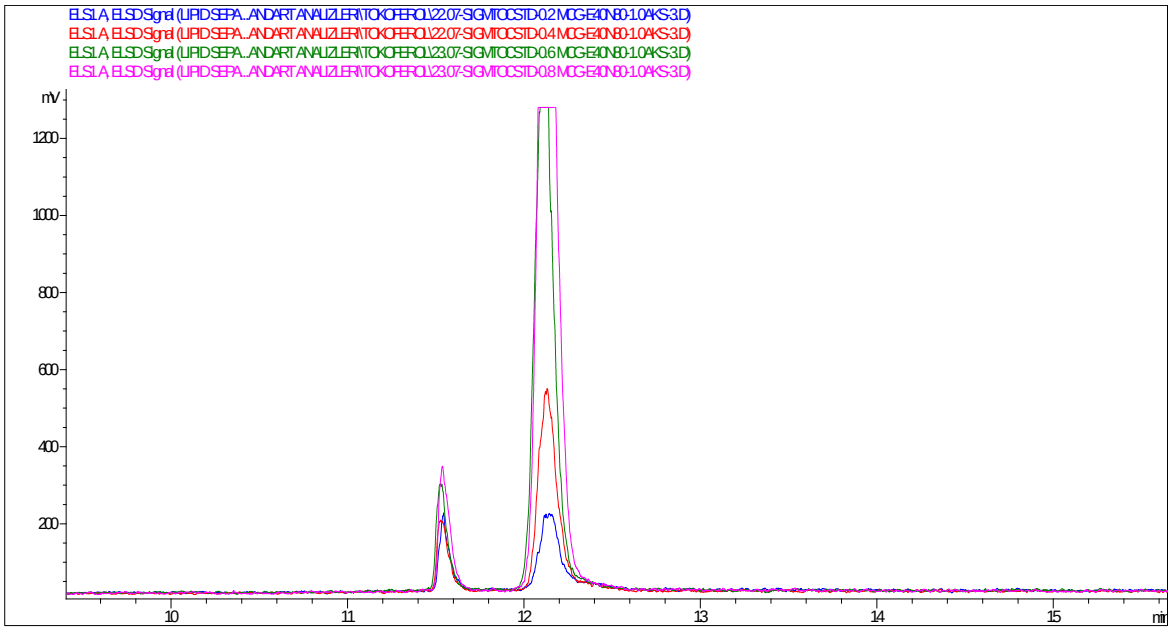




**Şekil 4. 45.** Gama(ɣ) tokoferol standart maddesi konsantrasyon çalışmalarına ait kalibrasyon grafikleri

Numune çözücüsü: **Hekzan**
Numune enjeksiyonu: 0.2- 0.4-0.6-0.8 µL (Otomatik enjeksiyon)
Numune konsantrasyonu: **– 0.2 µg –0.4 µg – 0.6 µg– 0.8 µg**
2nd-D HPLC Kolon: LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm)+ (5µm 250x4.6mm)
Akış hızı**:** 1.25 mL/dk,
Sıcaklık: 40°C
ELSD programı: Nebülizasyon 80°C, Buharlaştırma sıcaklığı 40°C, Azot gazı akış hızı; 1.5 SLM

* Şekil. 3.6.'da yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.5.'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

- **δ- tokoferol analizleri:**




**Şekil 4. 46.** Sigma (***δ***) tokoferol standart maddesi konsantrasyon çalışmalarına ait analizlerden elde edilen kromatogramlar

**Sigma tokoferol; tR= 12.1 dk**

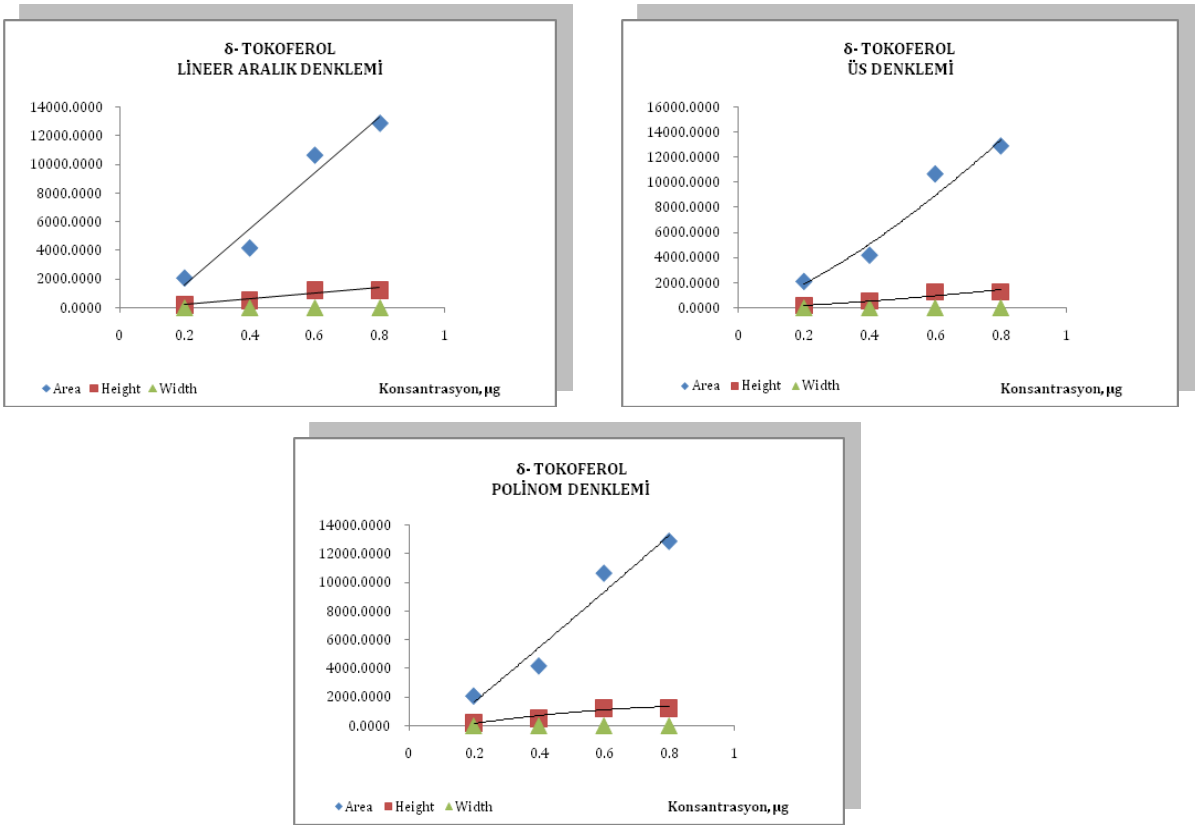
| | |
|---|---|
| Numune çözücüsü: | **Hekzan** |
| Numune enjeksiyonu: | 0.2- 0.4-0.6-0.8 µL (Otomatik enjeksiyon) |
| Numune konsantrasyonu: | **– 0.2 µg –0.4 µg – 0.6 µg– 0.8 µg** |
| 2nd-D HPLC Kolon: | LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm)+ (5µm 250x4.6mm) |
| Akış hızı**:** | 1.25 mL/dk |
| Sıcaklık: | 40°C |
| ELSD programı: | Neb 80°C, Buh sıcaklığı 40°C, Azot gazı akış hızı; 1.5 SLM |

* Şekil. 3.6.'da yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.5.'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

**Çizelge 4. 18.** Sigma (***δ***) tokoferol standardı için gerçekleştirilen konsantrasyon çalışmalarına ait analiz verileri

| II. BOYUT AYRIM ANALİZLERİ<br>TOKOFEROL (Sigma (***δ***) tokoferol) TAYİNİ | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Miktar, µg** | **Time** | **Area** | **Height** | **Width** | **Area%** | **Symmetry** |
| **0.2** | 12.1440 | 2071.1000 | 199.8000 | 0.1509 | 71.1990 | 0.5500 |
| **0.4** | 12.1300 | 4169.3000 | 520.5000 | 0.1235 | 82.1440 | 0.7020 |
| **0.6** | 12.1140 | 10650.1000 | 1254.5000 | 0.1290 | 88.9520 | 0.8120 |
| **0.8** | 12.1530 | 12881.5000 | 1256.4000 | 0.1616 | 89.0490 | 1.3100 |

| | **LİNEER ARALIK DENKLEMİ** | **ÜS DENKLEMİ** | **POLİNOM DENKLEMİ** |
|---|---|---|---|
| **ALAN** | $y = 19456x - 2285$ | $y = 18233x^{1.3915}$ | $y = 832.5x^2 + 18623x - 2118.5$ |
| | **$R^2 = 0.953$** | **$R^2 = 0.9652$** | **$R^2 = 0.9531$** |
| **YÜKSEKLİK** | $y = 1951.9x - 168.15$ | $y = 2039.5x^{1.4294}$ | $y = -1992.5x^2 + 3944.4x - 566.65$ |
| | $R^2 = 0.8933$ | $R^2 = 0.9607$ | $R^2 = 0.9231$ |
| **YARI PİK GENİŞLİĞİ** | $y = 0.0188x + 0.1319$ | $y = 0.1418x^{0.0121}$ | $y = 0.375x^2 - 0.3562x + 0.2069$ |
| | $R^2 = 0.0727$ | $R^2 = 0.0033$ | $R^2 = 0.9983$ |




**Şekil 4. 47.** Sigma (***δ***) tokoferol standart maddesi konsantrasyon çalışmalarına ait kalibrasyon grafikleri

Numune çözücüsü: **Hekzan**

Numune enjeksiyonu: 0.2- 0.4-0.6-0.8-1.0 µL (Otomatik enjeksiyon)

Numune konsantrasyonu: **– 0.2 µg –0.4 µg – 0.6 µg– 0.8 µg**

2nd-D HPLC Kolon: LiChrospher 100 Diol 5µm 75x4.0mm+ LiChrospher 100 Diol 5µm 250x4.0mm

Akış hızı**:** 1.25 mL/dk,

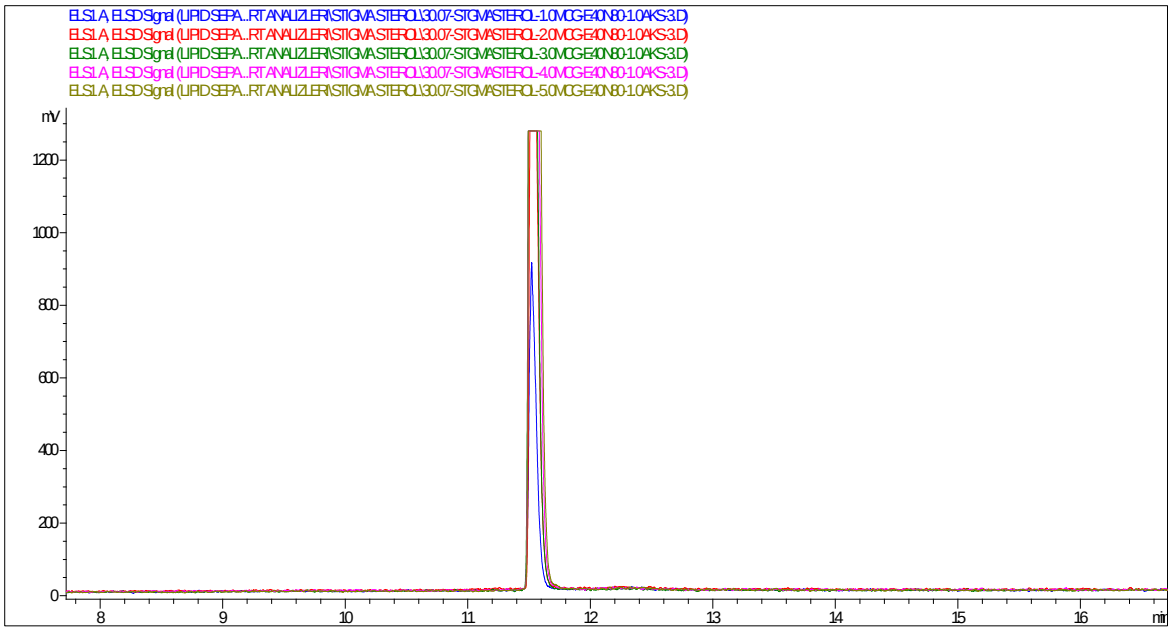
Sıcaklık: 40°C

ELSD programı: Neb 80°C, Buh sıcaklığı 40°C, Azot gazı akış hızı; 1.5 SLM

* Şekil. 3.6.'da yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.5.'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

Yağların sabunlaşmayan maddeleri arasında yer alan tokoferollerin, kalitatif ve kantitatif tayinleri için gerçekleştirilen analizlerde; α, β, γ ve δ tokoferol izomerlerine ait standart maddeler kullanılmıştır. Hekzanda çözülerek hazırlanan standart maddelerin farklı konsantrasyonları için analizler gerçekleştirilmiştir. α, β, γ ve δ tokoferol türleri için alıkonma süreleri sırasıyla; $t_R$=10.3 dk; 12.3 dk; 11.6 dk ve 12.1 dk olarak tespit edilmiştir. Pik alanı, yüksekliği ve yarı genişliği esas alınarak çizilen kalibrasyon grafiklerinden; analiz verilerinin, lineer aralık, üs ve polinom denklemlerine ait korelasyon değerlerinin oldukça yüksek olduğu görülmüştür.

- **Sterol** (stigma sterol) **standart madde analizlerine ait pikler & kalibrasyon grafikleri;**




**Şekil 4. 48.** Stigma sterol standart maddesi konsantrasyon çalışmalarına ait analizlerden elde edilen kromatogramlar

**Stigma sterol; tR= 11.5 dk**

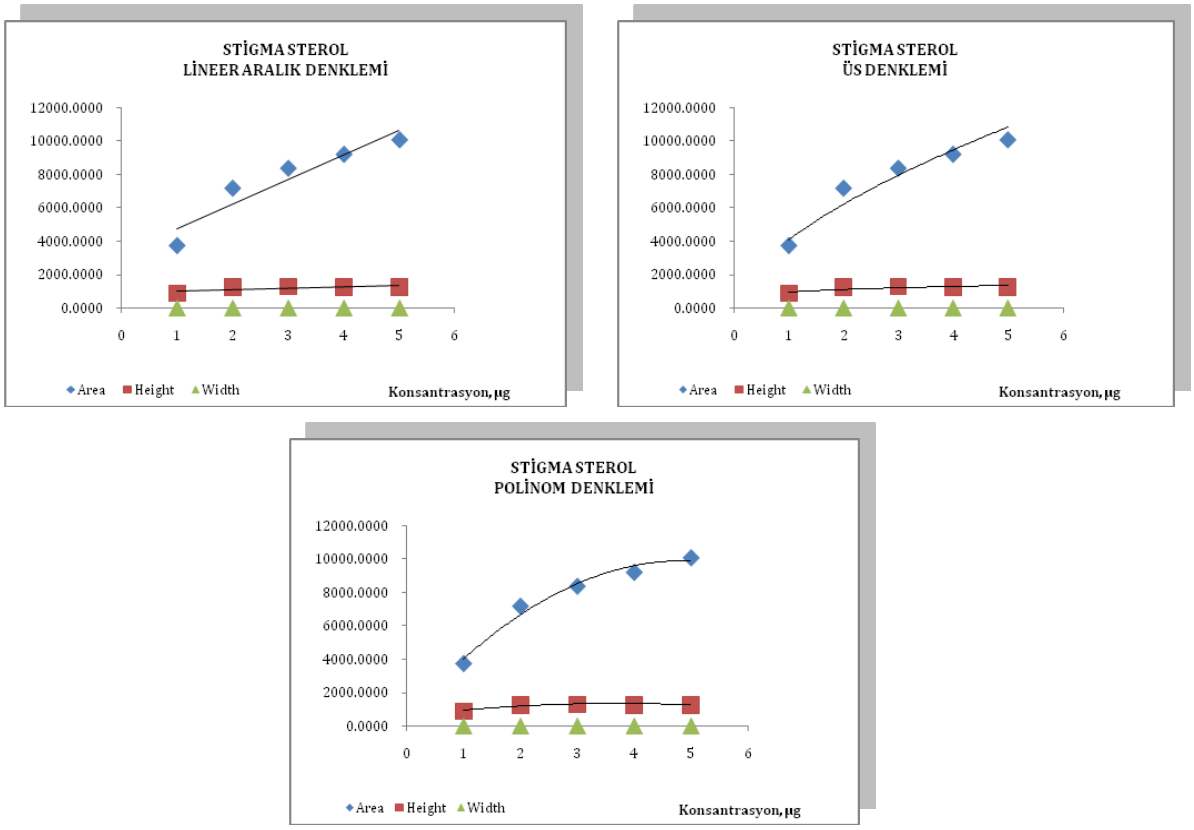
| | |
|---|---|
| Numune çözücüsü: | **Hekzan** |
| Numune enjeksiyonu: | 1- 2- 3- 4- 5 µL (Otomatik enjeksiyon) |
| Numune konsantrasyonu: | **– 1 µg –2 µg –3 µg – 4 µg – 5 µg** |
| 2nd-D HPLC Kolon: | LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm)+ (5µm 250x4.6mm) |
| Akış hızı**:** | 1.25 mL/dk, |
| Sıcaklık: | 40°C |
| ELSD programı: | Neb 80°C, Buh sıcaklığı 40°C, Azot gazı akış hızı; 1.5 SLM |

* Şekil. 3.6.'da yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.5.'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

**Çizelge 4. 19.** Stigma sterol standardı için gerçekleştirilen konsantrasyon çalışmalarına ait analiz verileri

| II. BOYUT AYRIM ANALİZLERİ<br>STEROL (Stigma sterol) TAYİNİ | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Miktar, µg** | **Time** | **Area** | **Height** | **Width** | **Area%** | **Symmetry** |
| **1** | 11.5250 | 3723.3000 | 889.8000 | 0.0668 | 100.0000 | 0.6070 |
| **2** | 11.5330 | 7178.1000 | 1261.7000 | 0.0904 | 100.0000 | 0.6050 |
| **3** | 11.5400 | 8379.1000 | 1268.4000 | 0.1071 | 100.0000 | 0.9140 |
| **4** | 11.5530 | 9220.6000 | 1264.4000 | 0.1171 | 100.0000 | 1.0490 |
| **5** | 11.5670 | 10092.6000 | 1265.7000 | 0.1290 | 100.0000 | 1.2740 |

| | **LİNEER ARALIK DENKLEMİ** | **ÜS DENKLEMİ** | **POLİNOM DENKLEMİ** |
|---|---|---|---|
| **ALAN** | $y = 1478.1x + 3284.4$ | $y = 4088.4x^{0.6066}$ | $y = -394.65x^2 + 3846x + 521.86$ |
| | $R^2 = 0.8888$ | $R^2 = 0.9404$ | $R^2 = 0.9775$ |
| **YÜKSEKLİK** | $y = 75.45x + 963.65$ | $y = 964.97x^{0.2093}$ | $y = -53.707x^2 + 397.69x + 587.7$ |
| | $R^2 = 0.5052$ | $R^2 = 0.7143$ | $R^2 = 0.8636$ |
| **YARI PİK GENİŞLİĞİ** | $y = 0.0151x + 0.0568$ | $y = 0.0675x^{0.4063}$ | $y = -0.0022x^2 + 0.028x + 0.0417$ |
| | **$R^2 = 0.9688$** | **$R^2 = 0.9976$** | **$R^2 = 0.9963$** |



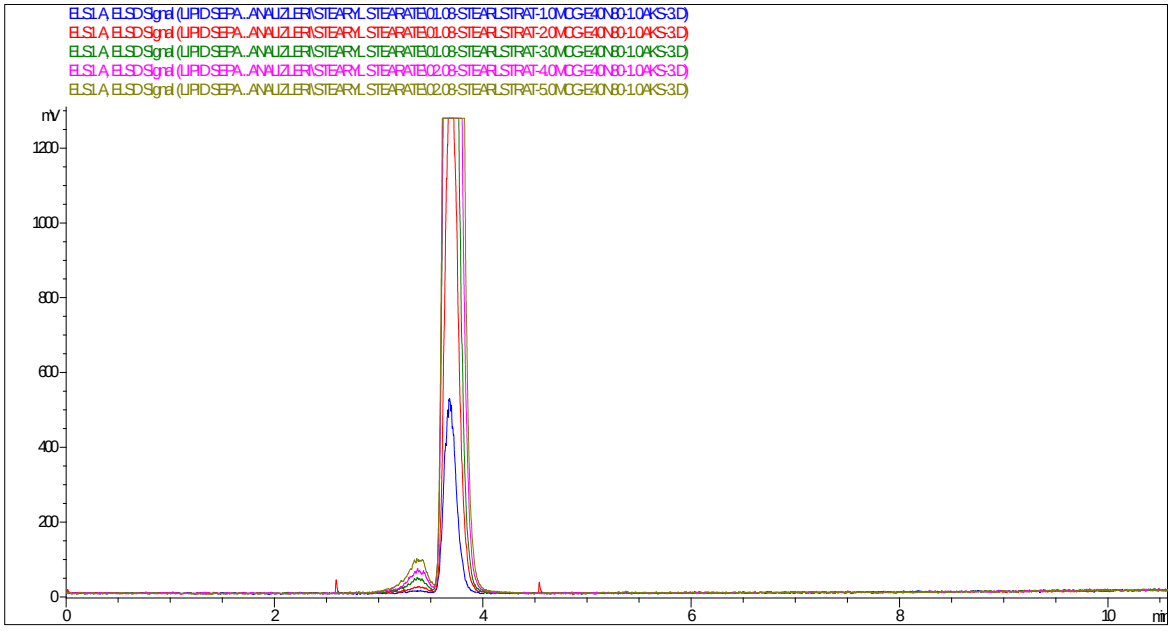

**Şekil 4. 49.** Stigma sterol standart maddesi konsantrasyon çalışmalarına ait kalibrasyon grafikleri

| | |
|---|---|
| Numune çözücüsü: | **Hekzan** |
| Numune enjeksiyonu: | 1-2-3-4-5 µL (Otomatik enjeksiyon) |
| Numune konsantrasyonu: | **– 1 µg –2 µg –3 µg – 4 µg – 5 µg** |
| 2nd-D HPLC Kolon: | LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm)+ (5µm 250x4.6mm) |
| Akış hızı: | 1.25 mL/dk, |
| Sıcaklık: | 40°C |
| ELSD programı: | Neb 80°C, Buh sıcaklığı 40°C, Azot gazı akış hızı; 1.5 SLM |

* Şekil. 3.6.'da yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.5.'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

Yenilebilir katı ve sıvı yağlarda önemli minör bileşik yapılardan birisi olarak tanımlanan steroller; yağlarda serbest veya yağ asitleriyle esterleşmiş halde, çok düşük konsantrasyonlarda (~0.1-5.6%) bulunmaktadırlar. Yağlarda bulunan sterollerin tayini; muhtemel yağ tağşişinin tespiti ve beslenme fizyolojisi açısından değerlerin belirlenmesi için büyük önem arz etmektedir. Hekzanda çözülerek hazırlanan stigma sterol standart maddesinin farklı konsantrasyonları için analizler gerçekleştirilmiş ve alıkonma süresi; $t_R$=11.5 dk olarak tespit edilmiştir. Pik alanı, yüksekliği ve yarı genişliği esas alınarak çizilen kalibrasyon grafiklerinden; analiz verilerinin, lineer aralık, üs ve polinom denklemlerine ait korelasyon değerlerinin oldukça yüksek olduğu görülmektedir.

- **Ester** (stearyl stearate) **standart madde analizlerine ait pikler & kalibrasyon grafikleri;**




**Şekil 4. 50.** Stearyl stearate standart maddesi konsantrasyon çalışmalarına ait analizlerden elde edilen kromatogramlar

**Stearyl stearate; tR= 3.7 dk**

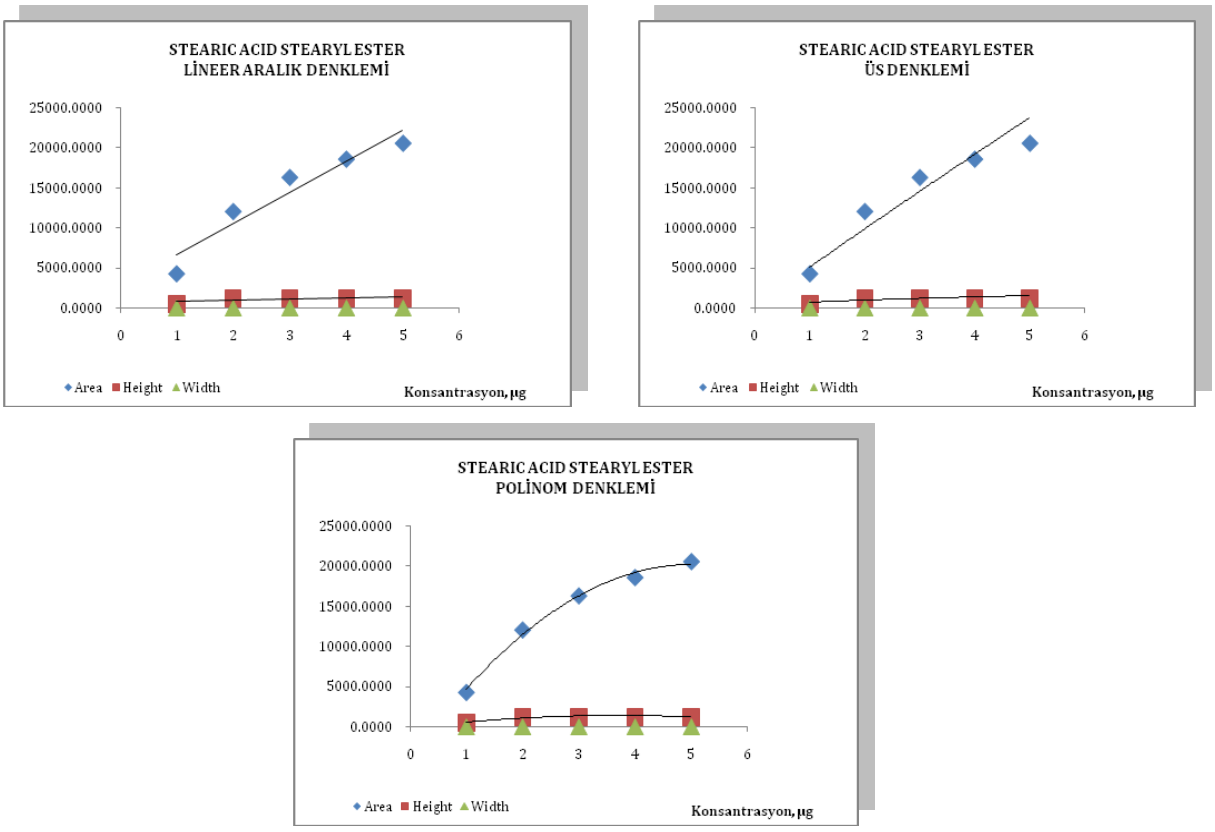
| | |
|---|---|
| Numune çözücüsü: | **Hekzan** |
| Numune enjeksiyonu: | 1- 2- 3- 4- 5 µL (Otomatik enjeksiyon) |
| Numune konsantrasyonu: | **– 1 µg –2 µg –3 µg – 4 µg – 5 µg** |
| 2nd-D HPLC Kolon: | LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm)+ (5µm 250x4.6mm) |
| Akış hızı**:** | 1.25 mL/dk |
| Sıcaklık: | 40°C |
| ELSD programı: | Neb 80°C, Buh sıcaklığı 40°C, Azot gazı akış hızı; 1.5 SLM |

* Şekil. 3.6.'da yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.5.'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

**Çizelge 4. 20.** Stearyl stearate standardı için gerçekleştirilen konsantrasyon çalışmalarına ait analiz verileri

| II. BOYUT AYRIM ANALİZLERİ<br>ESTER (Stearyl stearate) TAYİNİ | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Miktar, µg** | **Time** | **Area** | **Height** | **Width** | **Area%** | **Symmetry** |
| **1** | 3.6820 | 4345.0000 | 516.1000 | 0.1342 | 92.1800 | 0.7950 |
| **2** | 3.6940 | 12101.9000 | 1267.6000 | 0.1514 | 96.8610 | 0.7840 |
| **3** | 3.7400 | 16340.7000 | 1264.9000 | 0.2067 | 97.8000 | 1.9150 |
| **4** | 3.7730 | 18613.9000 | 1263.8000 | 0.2378 | 95.2580 | 2.4940 |
| **5** | 3.7930 | 20600.6000 | 1271.1000 | 0.2611 | 92.3790 | 2.7670 |

| | **LİNEER ARALIK DENKLEMİ** | **ÜS DENKLEMİ** | **POLİNOM DENKLEMİ** |
|---|---|---|---|
| **ALAN** | $y = 3902.3x + 2693.5$ | $y = 5051.3x^{0.9623}$ | $y = -964.71x^2 + 9690.6x - 4059.5$ |
| | **$R^2 = 0.9154$** | **$R^2 = 0.9371$** | **$R^2 = 0.9937$** |
| **YÜKSEKLİK** | $y = 150.62x + 664.84$ | $y = 635.63x^{0.5327}$ | $y = -106.2x^2 + 787.82x - 78.56$ |
| | $R^2 = 0.5031$ | $R^2 = 0.7106$ | $R^2 = 0.8533$ |
| **YARI PİK GENİŞLİĞİ** | $y = 0.034x + 0.0962$ | $y = 0.1262x^{0.4384}$ | $y = -0.0009x^2 + 0.0392x + 0.0902$ |
| | $R^2 = 0.974$ | $R^2 = 0.9398$ | $R^2 = 0.9748$ |




**Şekil 4. 51.** Stearyl stearate standart maddesi konsantrasyon çalışmalarına ait kalibrasyon grafikleri

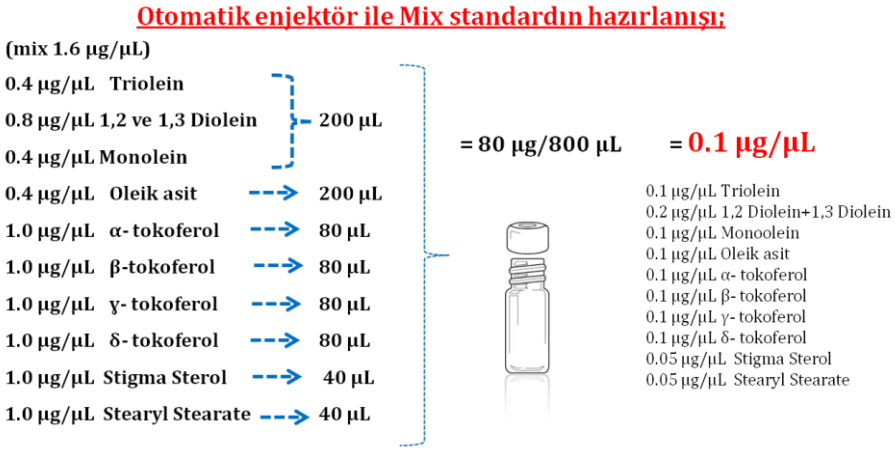
Numune çözücüsü: **Hekzan**
Numune enjeksiyonu: 1-2-3-4-5 µL (Otomatik enjeksiyon)
Numune konsantrasyonu: **– 1 µg –2 µg –3 µg – 4 µg – 5 µg**
2nd-D HPLC Kolon: LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm)+ (5µm 250x4.6mm)
Akış hızı**:** 1.25 mL/dk,
Sıcaklık: 40°C
ELSD programı: Neb 80°C, Buh sıcaklığı 40°C, Azot gazı akış hızı; 1.5 SLM

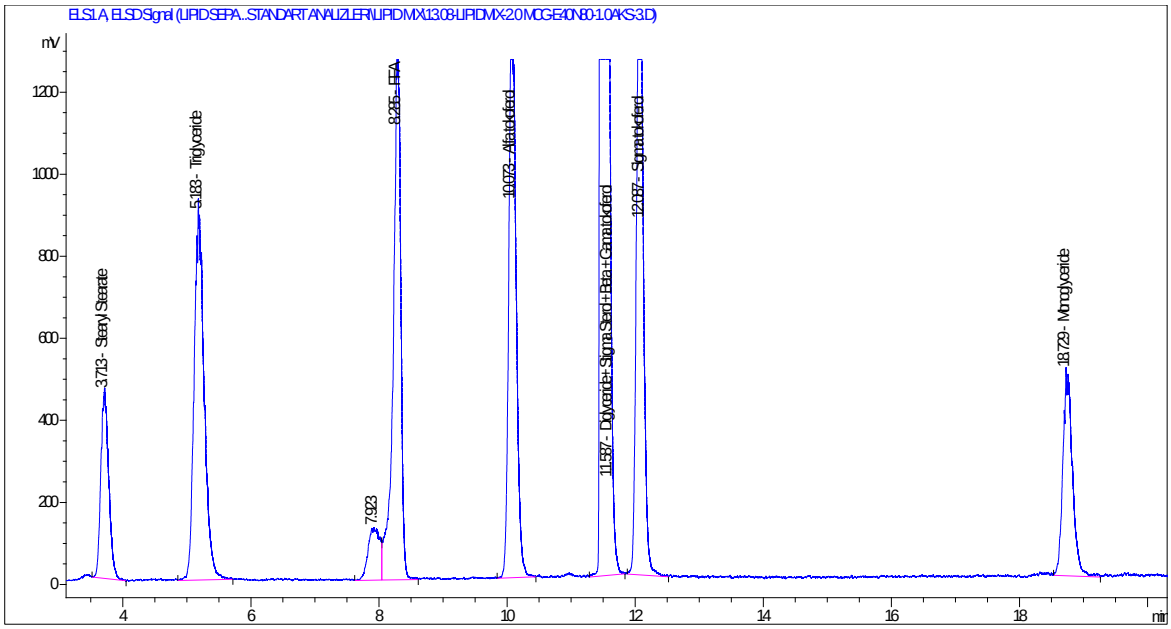
* Şekil. 3.6.'da yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.5.'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

Farklı lipit bileşenlerinin esterlerleşmesi sonucu oluşan ester türlerinin tayini için; stearik asitin ester formu standart madde ile analizler gerçekleştirilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltiler ile gerçekleştirilen analizlerde; ester lipit türü için alıkonma süresi $t_R$=3.7 dk olarak tespit edilmiştir. Oldukça düşük polariteye sahip ester türlerinin analizlerine ait veriler kullanılarak, kalibrasyon grafikleri oluşturulmuş ve elde edilen verilerin; lineer aralık, üs ve polinom denklemlerine ait korelasyon değerlerinin oldukça yüksek olduğu görülmüştür.

- **Lipit standart maddelerini içeren karışım analizine ait pikler & kalibrasyon grafikleri;**

Gerçekleştirilen tekli standart madde analizlerinin ardından; otomatik enjektör yardımıyla stearyl stearate, triolein, oleik asit, α- tokoferol, 1,2 diolein, 1,3 diolein, β-tokoferol, γ-tokoferol, stigma sterol, δ-tokoferol ve monoolein standart maddeler ile belirli konsantrasyonda karışım hazırlanmış ve karışım tespit edilen optimum parametreler kullanılarak analiz edilmiştir. Standart karışım analizleri sonucu elde edilen kromatogramlar, karşılaştırmalı olarak Şekil 4.52 ve 4.53'de verilmiştir.






**Şekil 4. 52.** Lipit standart maddeleri kullanılarak hazırlanan karışım analizine ait kromatogram

**Stearyl stearate $t_R$= 3.7 dk; Triolein $t_R$= 5.2 dk; Oleik asit $t_R$= 8.3 dk; α- tokoferol $t_R$= 10.1 dk; 1,2 diolein+1,3 diolein+ β- tokoferol+ γ- tokoferol+ stigma sterol $t_R$=11.6 dk; δ- tokoferol $t_R$=12.1 dk; monoolein $t_R$=18.7 dk**

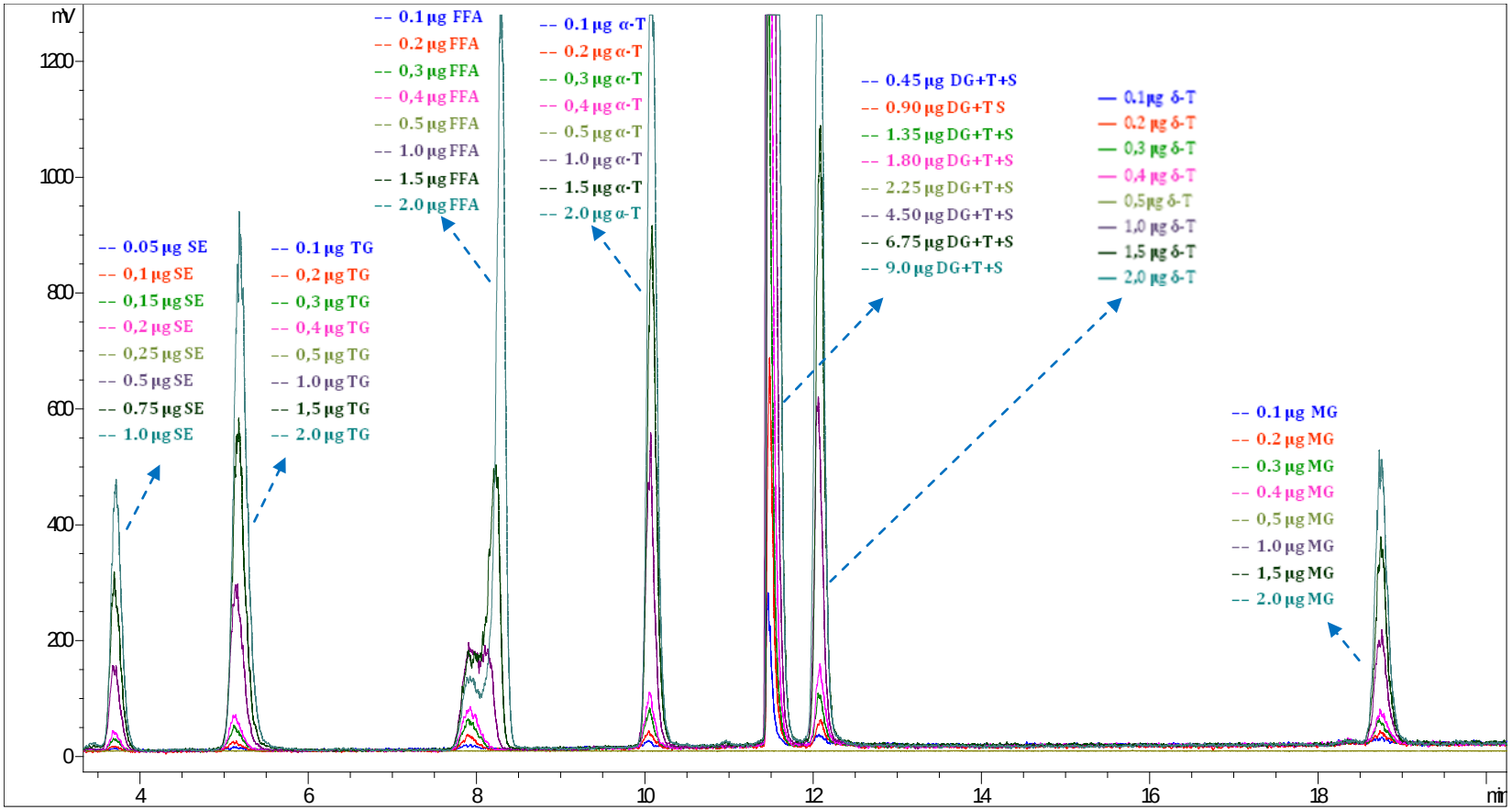
| | |
|---|---|
| Numune çözücüsü: | **Hekzan** |
| Numune enjeksiyonu: | 1- 2- 3- 4- 5- 10- 15- 20 µL (Otomatik enjeksiyon, 0.1 µg/ µL) |
| 2nd-D HPLC Kolon: | LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm)+ (5µm 250x4.6mm) |
| Akış hızı**:** | 1.25 mL/dk |
| Sıcaklık: | 40°C |
| ELSD programı: | Neb 80°C, Buh sıcaklığı 40°C, Azot gazı akış hızı; 1.5 SLM |

* Şekil. 3.6.'da yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.5.'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

Şekil 4.52'de yer alan kromatogramdan görüleceği üzere; belirlenen optimum parametreler kullanılarak gerçekleştirilen analizler ile, türler için yüksek verimlilikte ayrımlar gerçekleştirilebilmiştir. Bitkisel yağlarda mevcut lipit bileşenlerinin, oldukça farklı polarite değerlerine sahip oldukları bilinmektedir. Literatürde önerilen çalışmaların pekçoğunda; lipit bileşenlerinin tayini için normal-faz kromatografi tekniği ile silika kolonlar ile gerçekleştirilen analizler yer almaktadır. Silika kolonlara alternatif olarak önerilen diol bağlı sabit faz kolonlarında ise; geniş polarite aralığında değerlere sahip lipit türlerinin, ayrımı ve tayinde oldukça etkin sonuçların alınabildiği görülmektedir. Polaritelerindeki farklılıklara göre ayrımı gerçekleştirilen lipit türlerinden; stearyl stearate, triolein, oleik asit, α- tokoferol, δ- tokoferol ve monoolein türlerinin ayrımları istenilen düzeyde gerçekleştirilebilmiş; 1,2 diolein, 1,3 diolein, β-tokoferol, γ- tokoferol ve stigma sterol türleri ise toplu bir pik halinde gözlemlenmiştir. Toplu bir şekilde elde edilen bu türlerin çok yakın polarite değerine sahip oldukları bilinmektedir. Belirtilen lipit türlerinin ayrı ayrı tayin edilebilmesi için; hareketli faz

sistemlerinde (polarite indeks değerlerinde) değişiklik yapılması ya da ELSD dedektör öncesinde bu türlere karşı cevap değeri yüksek bir dedektörün adapte edilmesi gerektiği kanaatine varılmıştır. Lipit türlerinin karışımı için gerçekleştirilen analiz sonuçlarına ait; alıkonma süresi, konsantrasyon aralıkları, regresyon eşitlikleri, korelasyon değerleri ve geri kazanım değerleri Çizelge 4.28'de verilmiştir. Çizelge 4.28'de yer alan veriler incelendiğinde; standartların tümü için lineer aralık, üs yada polinom denklemlerine ait korelasyon değerlerinin oldukça yüksek olduğu görülmektedir.

Standart maddelerin tümünü içeren karışım stok çözeltilerden; 0,2- 20,0 µL şeklinde enjeksiyonlar gerçekleştirilerek, farklı konsantrasyonlardaki standart materyaller için kalibrasyon grafikleri oluşturulmuştur. Hekzan ile hazırlanan lipit türleri için; pik alanı, yüksekliği ve yarı genişliği esas alınarak kalibrasyon grafikleri çizilmiştir. Analiz verilerinin lineer aralık, üs ve polinom denklemleri ile korelasyon değerleri tespit edilmiştir (Çizelge 4.21─ 4.27 ve Şekil 4.54─ 4.60).




**Şekil 4. 53.** Lipit türlerinin tümünü içeren standart karışım için yürütülen konsantrasyon çalışmasına ait analizlerden elde edilen kromatogramlar

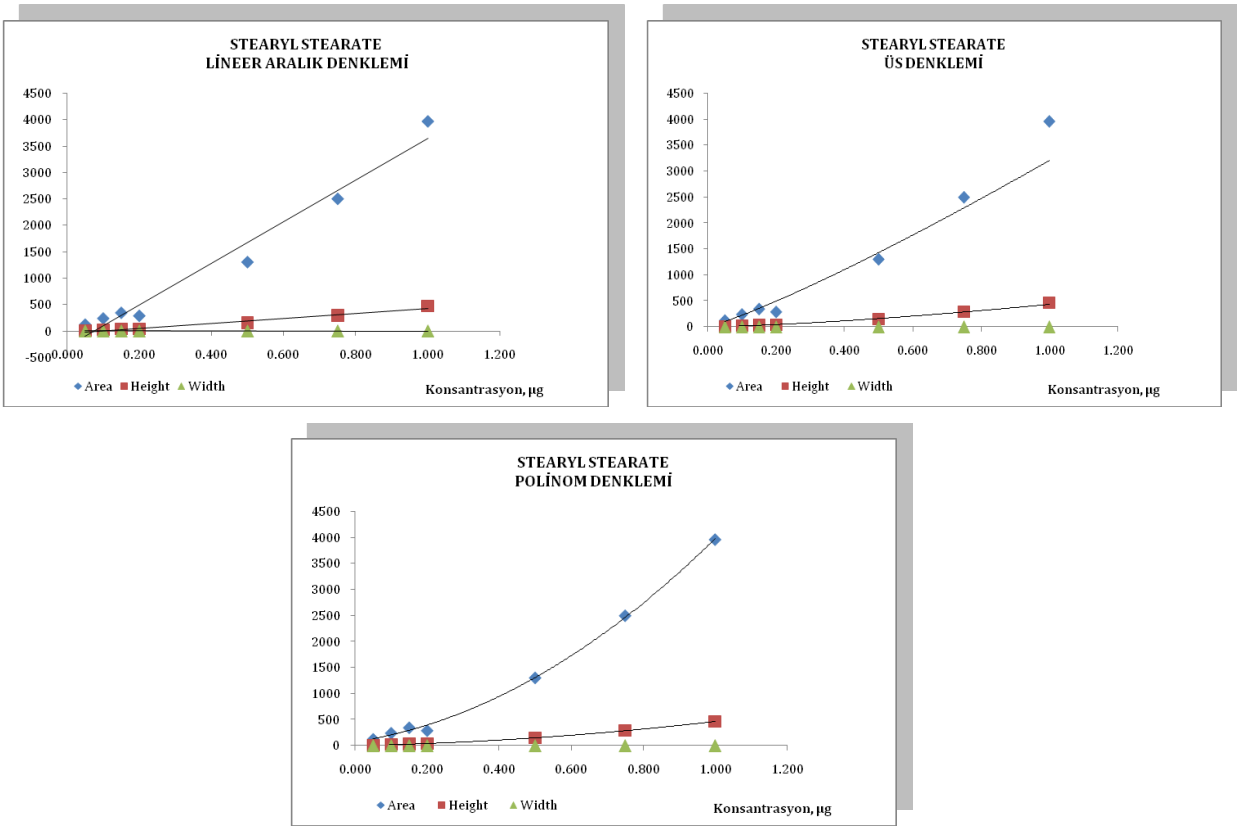
**Numune çözücüsü:** Hekzan
**Numune enjeksiyonu:** 1- 2- 3- 4- 5- 10- 15- 20 µL (Otomatik enjeksiyon)
**2nd-D HPLC Kolon:** LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm)+ (5µm 250x4.6mm)
**Akış hızı:** 1.25 mL/dk, **Sıcaklık:** 40°C
**ELSD programı:** Nebülizasyon 80°C, Buharlaştırma sıcaklığı 40°C, Azot gazı akış hızı; 1.5 SLM

* Şekil. 3.6.'da yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.5.'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

**Çizelge 4. 21.** Standartların tümünü içeren karışımda, stearyl stearate standardı için gerçekleştirilen konsantrasyon çalışmalarına ait analiz verileri

| II. BOYUT AYRIM ANALİZLERİ<br>STANDART KARIŞIMDA MEVCUT<br>ESTER (Stearyl stearate) TAYİNİ | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Miktar, µg** | **Time** | **Area** | **Height** | **Width** | **Area%** | **Symmetry** |
| **0.05** | 3.7155 | 121.3500 | 5.9000 | 0.3406 | 5.5130 | 0.6610 |
| **0.10** | 3.7060 | 238.5000 | 15.5667 | 0.2549 | 4.3257 | 0.6820 |
| **0.15** | 3.6900 | 344.3000 | 29.3333 | 0.1973 | 3.7127 | 0.5667 |
| **0.20** | 3.6827 | 287.2000 | 31.0000 | 0.1153 | 2.3067 | 0.5480 |
| **0.25** | 3.6870 | 1303.4333 | 147.9667 | 0.1128 | 4.1370 | 0.6533 |
| **0.50** | 3.7030 | 2499.7000 | 291.9000 | 0.1126 | 5.0770 | 0.7767 |
| **0.75** | 3.7130 | 3964.7667 | 467.0333 | 0.1085 | 5.7987 | 0.8117 |

| | **LİNEER ARALIK DENKLEMİ** | **ÜS DENKLEMİ** | **POLİNOM DENKLEMİ** |
|---|---|---|---|
| **ALAN** | $y = 3951.x - 300.9$ | $y = 3200.x^{1.169}$ | $y = 2883.x^2 + 1029.x + 69.41$ |
| | **$R^2 = 0.970$** | **$R^2 = 0.961$** | **$R^2 = 0.998$** |
| **YÜKSEKLİK** | $y = 475.7x - 45.64$ | $y = 425.9x^{1.453}$ | $y = 336.4x^2 + 134.7x - 2.436$ |
| | $R^2 = 0.973$ | $R^2 = 0.993$ | $R^2 = 0.999$ |
| **YARI PİK GENİŞLİĞİ** | $y = -0.177x + 0.247$ | $y = 0.093x^{-0.38}$ | $y = 0.527x^2 - 0.711x + 0.314$ |
| | $R^2 = 0.509$ | $R^2 = 0.823$ | $R^2 = 0.750$ |



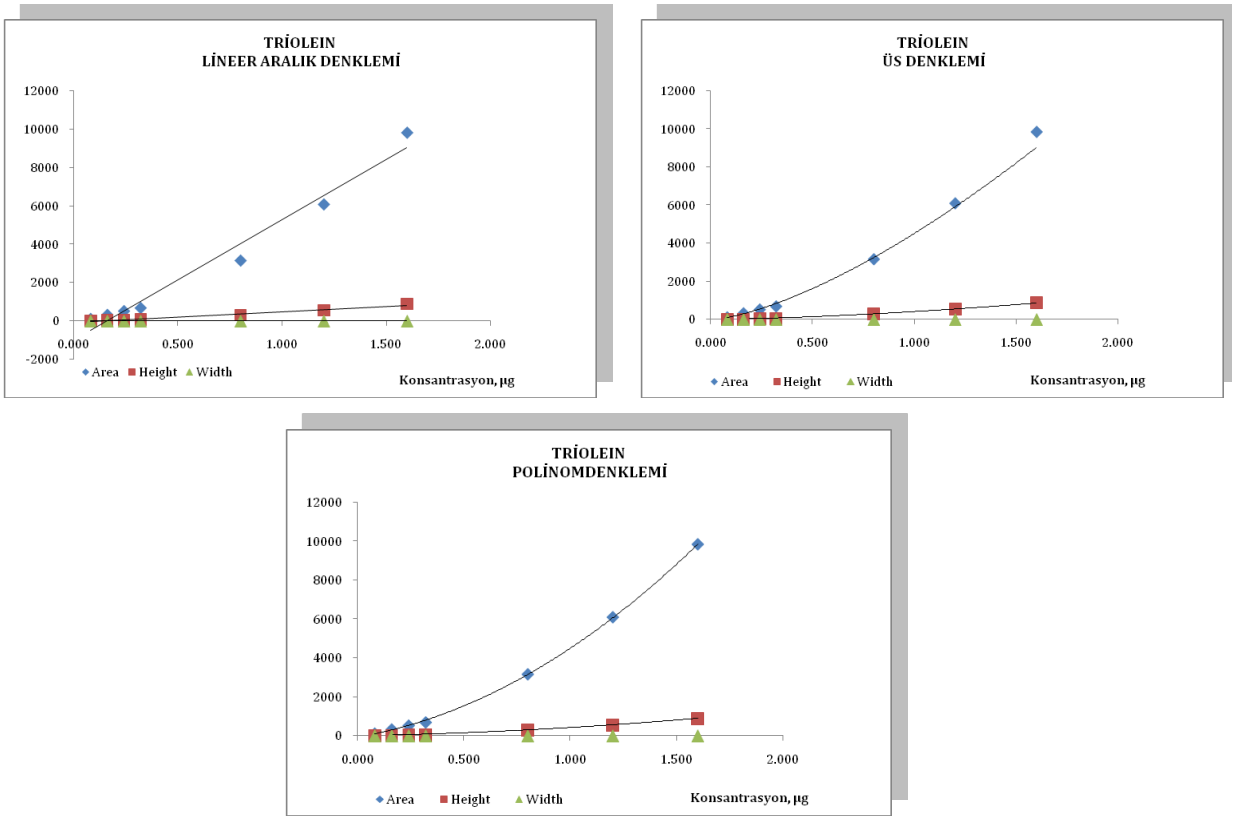

**Şekil 4. 54.** Standartların tümünü içeren karışımda, stearyl stearate standart maddesi konsantrasyon çalışmalarına ait kalibrasyon grafikleri

* Şekil. 3.6.'da yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.5.'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

**Çizelge 4. 22.** Standartların tümünü içeren karışımda, triolein standardı için gerçekleştirilen konsantrasyon çalışmalarına ait analiz verileri

| II. BOYUT AYRIM ANALİZLERİ STANDART KARIŞIMDA MEVCUT TRİGLİSERİT (Triolein) TAYİNİ | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Miktar, µg** | **Time** | **Area** | **Height** | **Width** | **Area%** | **Symmetry** |
| **0.10** | 4.6180 | 118.1000 | 7.7333 | 0.2539 | 5.3480 | 0.5420 |
| **0.20** | 5.1310 | 329.2667 | 22.8667 | 0.2393 | 5.9510 | 0.6867 |
| **0.30** | 5.1193 | 527.0667 | 44.0667 | 0.1828 | 5.6580 | 0.5477 |
| **0.40** | 5.1397 | 691.2667 | 62.5000 | 0.1358 | 5.5567 | 0.8900 |
| **1.00** | 5.1373 | 3162.3667 | 287.1000 | 0.1339 | 10.0383 | 0.6677 |
| **1.50** | 5.1693 | 6093.2667 | 562.9333 | 0.1376 | 12.3730 | 0.8380 |
| **2.00** | 5.1830 | 9833.3667 | 883.8333 | 0.1398 | 14.3803 | 0.7760 |

| | **LİNEER ARALIK DENKLEMİ** | **ÜS DENKLEMİ** | **POLİNOM DENKLEMİ** |
|---|---|---|---|
| **ALAN** | $y = 6262.x - 971.2$ | $y = 2731x^2 + 1834.x - 73.31$ | $y = 4520x^{1.473}$ |
| | **$R^2 = 0.974$** | **$R^2 = 0.999$** | **$R^2 = 0.996$** |
| **YÜKSEKLİK** | $y = 570.1x - 91.09$ | $y = 228.2x^2 + 200.0x - 16.03$ | $y = 412.9x^{1.584}$ |
| | $R^2 = 0.978$ | $R^2 = 0.999$ | $R^2 = 0.999$ |
| **YARI PİK GENİŞLİĞİ** | $y = -0.061x + 0.213$ | $y = 0.124x^2 - 0.263x + 0.254$ | $y = 0.137x^{-0.22}$ |
| | $R^2 = 0.478$ | $R^2 = 0.750$ | $R^2 = 0.750$ |



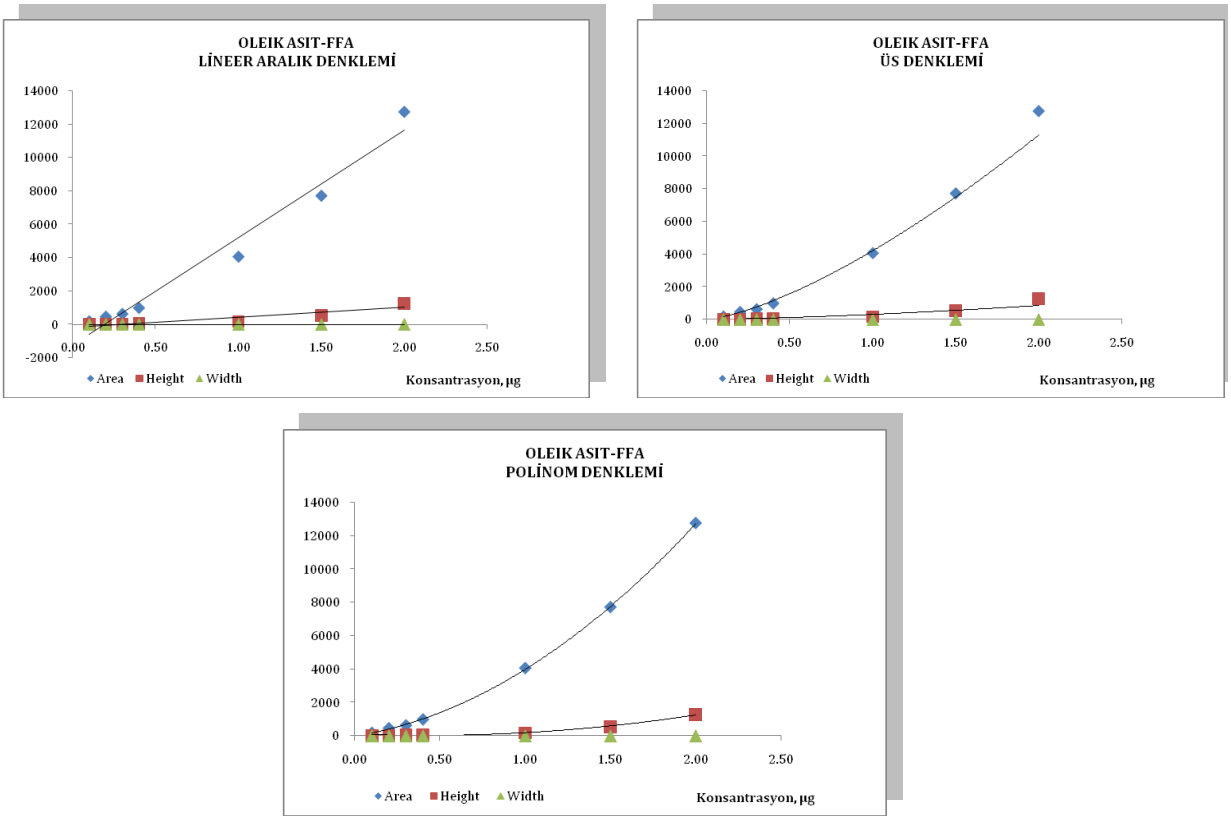

**Şekil 4. 55.** Standartların tümünü içeren karışımda, triolein standart maddesi konsantrasyon çalışmalarına ait kalibrasyon grafikleri

* Şekil. 3.6.'da yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.5.'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

**Çizelge 4. 23.** Standartların tümünü içeren karışımda, oleik asit standardı için gerçekleştirilen konsantrasyon çalışmalarına ait analiz verileri

| II. BOYUT AYRIM ANALİZLERİ<br>STANDART KARIŞIMDA MEVCUT<br>SERBEST YAĞ ASİDİ (Oleik Asit) TAYİNİ | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Miktar, µg** | **Time** | **Area** | **Height** | **Width** | **Area%** | **Symmetry** |
| **0.10** | 7.0023 | 181.1667 | 10.1000 | 0.2970 | 8.2063 | 0.5833 |
| **0.20** | 7.9120 | 459.6667 | 30.9667 | 0.2466 | 8.3087 | 0.5647 |
| **0.30** | 7.8953 | 627.4667 | 48.1000 | 0.1625 | 6.7470 | 0.5053 |
| **0.40** | 7.9050 | 984.4000 | 70.8667 | 0.1669 | 7.9100 | 0.6253 |
| **1.00** | 7.9760 | 4058.8667 | 182.9000 | 0.3698 | 12.8823 | 1.2147 |
| **1.50** | 8.2207 | 7710.1333 | 542.2333 | 0.2379 | 15.6577 | 2.6267 |
| **2.00** | 8.2773 | 12741.1333 | 1279.8333 | 0.1659 | 18.6313 | 1.2917 |

| | **LİNEER ARALIK DENKLEMİ** | **ÜS DENKLEMİ** | **POLİNOM DENKLEMİ** |
|---|---|---|---|
| **ALAN** | y = 6433.x - 1231. | $y = 4207.x^{1.426}$ | $y = 2369.x^2 + 1631.x - 14.24$ |
| | **$R^2$ = 0.971** | **$R^2$ = 0.993** | **$R^2$ = 0.999** |
| **YÜKSEKLİK** | y = 589.9x - 154.2 | $y = 300.6x^{1.500}$ | $y = 494.6x^2 - 412.5x + 99.84$ |
| | $R^2$ = 0.861 | $R^2$ = 0.973 | $R^2$ = 0.992 |
| **YARI PİK GENİŞLİĞİ** | y = -0.012x + 0.245 | $y = 0.218x^{-0.04}$ | $y = -0.101x^2 + 0.192x + 0.193$ |
| | $R^2$ = 0.013 | $R^2$ = 0.021 | $R^2$ = 0.207 |



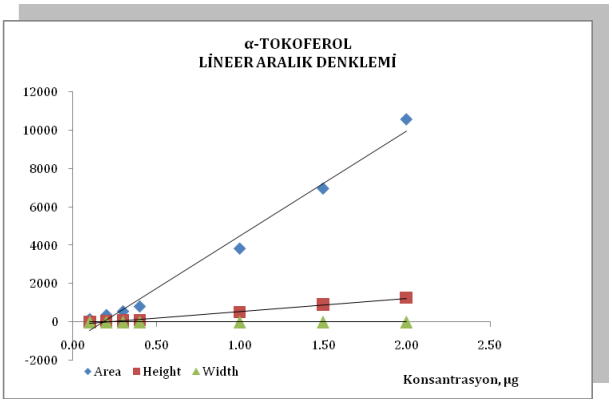

**Şekil 4. 56.** Standartların tümünü içeren karışımda, oleik asit standart maddesi konsantrasyon çalışmalarına ait kalibrasyon grafikleri

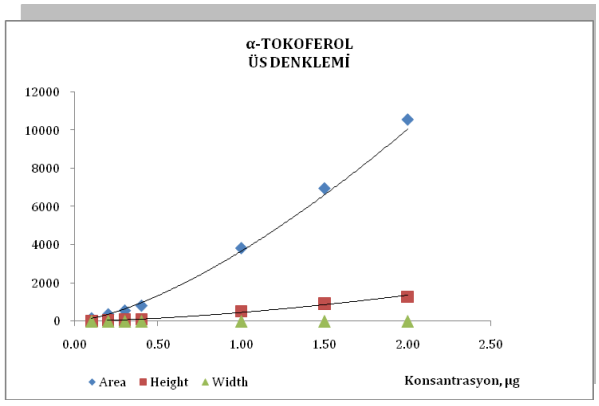
* Şekil. 3.6.'da yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.5.'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

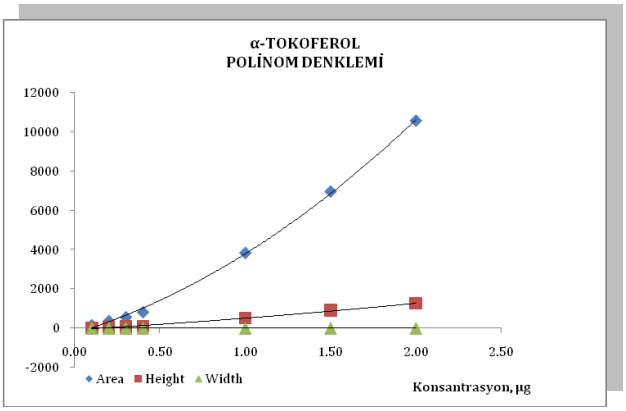
**Çizelge 4. 24.** Standartların tümünü içeren karışımda, alfa tokoferol standardı için gerçekleştirilen konsantrasyon çalışmalarına ait analiz verileri

| II. BOYUT AYRIM ANALİZLERİ STANDART KARIŞIMDA MEVCUT TOKOFEROL (α-tokoferol) TAYİNİ | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Miktar, µg** | **Time** | **Area** | **Height** | **Width** | **Area%** | **Symmetry** |
| **0.10** | 9.3353 | 146.3333 | 12.5333 | 0.1983 | 6.6240 | 0.4767 |
| **0.20** | 10.0340 | 356.7333 | 35.1333 | 0.1692 | 6.4760 | 0.6033 |
| **0.30** | 10.0517 | 552.8000 | 63.5667 | 0.1163 | 5.9513 | 0.8633 |
| **0.40** | 10.0533 | 806.6333 | 95.8000 | 0.1089 | 6.4813 | 0.9130 |
| **1.00** | 10.0660 | 3822.2667 | 512.8667 | 0.0954 | 12.1310 | 1.0460 |
| **1.50** | 10.0777 | 6951.6333 | 916.0667 | 0.1086 | 14.1147 | 0.8877 |
| **2.00** | 10.0777 | 10555.3000 | 1262.6667 | 0.1216 | 15.4347 | 0.7687 |

| | **LİNEER ARALIK DENKLEMİ** | **ÜS DENKLEMİ** | **POLİNOM DENKLEMİ** |
|---|---|---|---|
| **ALAN** | $y = 5486.x - 997.5$ | $y = 3661.x^{1.461}$ | $y = 1394.x^2 + 2660.x - 281.1$ |
| | **$R^2 = 0.985$** | **$R^2 = 0.995$** | **$R^2 = 0.999$** |
| **YÜKSEKLİK** | $y = 681.5x - 121.4$ | $y = 454.1x^{1.586}$ | $y = 88.47x^2 + 502.2x - 75.97$ |
| | $R^2 = 0.992$ | $R^2 = 0.997$ | $R^2 = 0.996$ |
| **YARI PİK GENİŞLİĞİ** | $y = -0.027x + 0.152$ | $y = 0.111x^{-0.18}$ | $y = 0.072x^2 - 0.174x + 0.189$ |
| | $R^2 = 0.280$ | $R^2 = 0.574$ | $R^2 = 0.708$ |



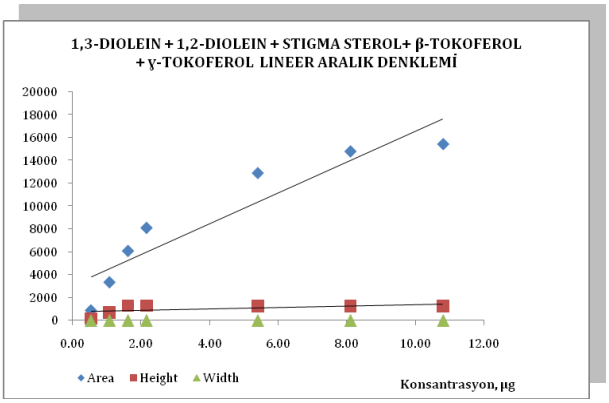

**Şekil 4. 57.** Standartların tümünü içeren karışımda, alfa tokoferol standart maddesi konsantrasyon çalışmalarına ait kalibrasyon grafikleri

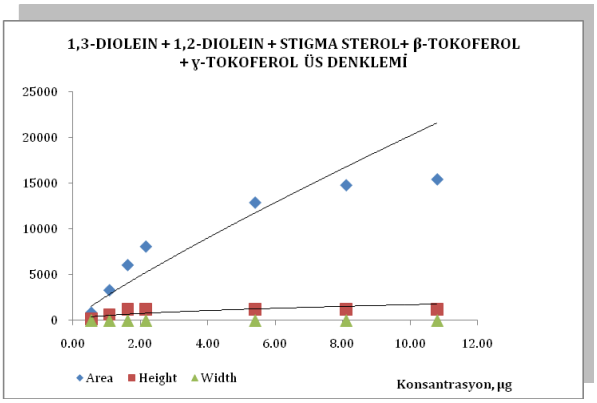
* Şekil. 3.6.'da yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.5.'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

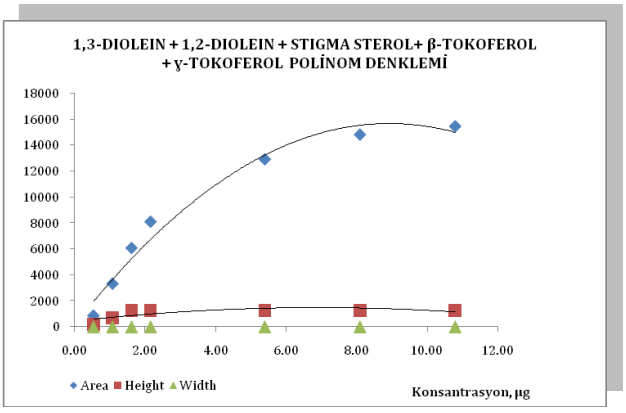
**Çizelge 4. 25.** Standartların tümünü içeren karışımda, diolein stigma sterol ve tokoferol standardları için gerçekleştirilen konsantrasyon çalışmalarına ait analiz verileri

| II. BOYUT AYRIM ANALİZLERİ<br>STANDART KARIŞIMDA MEVCUT<br>DİGLİSERİT+STEROL+TOKOFEROL<br>(1,3-dıolein + 1,2-dıolein + stıgma sterol+ β-tokoferol + γ-tokoferol) TAYİNİ | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Miktar, µg** | **Time** | **Area** | **Height** | **Width** | **Area%** | **Symmetry** |
| **0.54** | 11.0110 | 857.8000 | 170.0667 | 0.1347 | 38.9520 | 0.5057 |
| **1.08** | 11.4760 | 3321.3000 | 683.0667 | 0.0715 | 60.4130 | 0.5053 |
| **1.62** | 11.4707 | 6069.1667 | 1267.1333 | 0.0699 | 65.3870 | 0.5060 |
| **2.16** | 11.4870 | 8093.2667 | 1265.8333 | 0.0993 | 65.0167 | 0.8560 |
| **5.40** | 11.5400 | 12901.2333 | 1260.9000 | 0.1614 | 40.9540 | 1.9463 |
| **8.10** | 11.5823 | 14802.8667 | 1261.4000 | 0.1876 | 30.0607 | 2.7387 |
| **10.80** | 11.5890 | 15442.1000 | 1257.0000 | 0.1980 | 22.5843 | 2.9903 |

| | **LİNEER ARALIK DENKLEMİ** | **ÜS DENKLEMİ** | **POLİNOM DENKLEMİ** |
|---|---|---|---|
| **ALAN** | $y = 1347.x + 3068.$ | $y = 2684.x^{0.876}$ | $y = -195.1x^2 + 3482.x + 145.4$ |
| | **$R^2 = 0.862$** | **$R^2 = 0.868$** | **$R^2 = 0.976$** |
| **YÜKSEKLİK** | $y = 61.78x + 761.4$ | $y = 526.3x^{0.510}$ | $y = -21.63x^2 + 298.5x + 437.4$ |
| | $R^2 = 0.318$ | $R^2 = 0.559$ | $R^2 = 0.563$ |
| **YARI PİK GENİŞLİĞİ** | $y = 0.011x + 0.082$ | $y = 0.093x^{0.272}$ | $y = -0.000x^2 + 0.013x + 0.08$ |
| | $R^2 = 0.751$ | $R^2 = 0.474$ | $R^2 = 0.752$ |



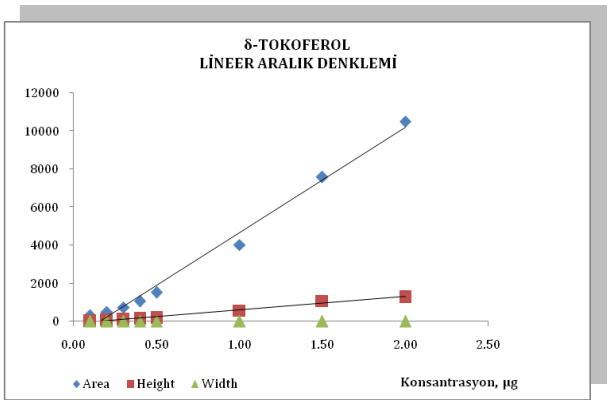

**Şekil 4. 58.** Standartların tümünü içeren karışımda, diolein stigma sterol ve tokoferol standardları için gerçekleştirilen konsantrasyon çalışmalarına ait kalibrasyon grafikleri

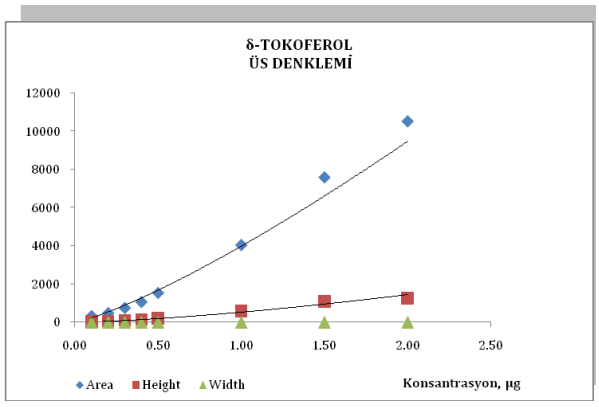
* Şekil. 3.6.'da yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.5.'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

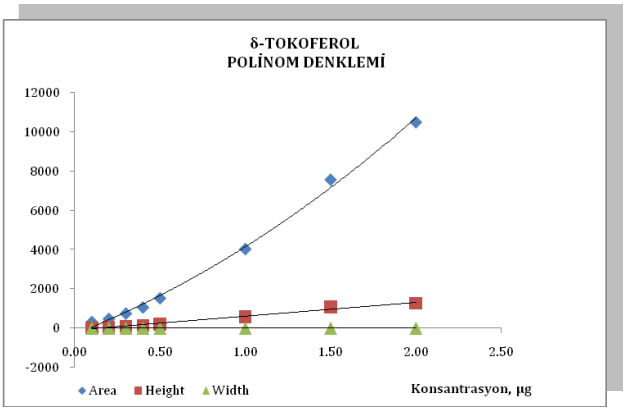
**Çizelge 4. 26.** Standartların tümünü içeren karışımda, sigma tokoferol standardı için gerçekleştirilen konsantrasyon çalışmalarına ait analiz verileri

| II. BOYUT AYRIM ANALİZLERİ STANDART KARIŞIMDA MEVCUT TOKOFEROL (δ-tokoferol) TAYİNİ | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Miktar, µg** | **Time** | **Area** | **Height** | **Width** | **Area%** | **Symmetry** |
| **0.10** | 12.1237 | 312.5000 | 19.8000 | 0.2629 | 15.4327 | 0.4133 |
| **0.20** | 12.1147 | 467.4667 | 46.0000 | 0.1691 | 11.1323 | 0.5497 |
| **0.30** | 12.1203 | 739.4667 | 84.9000 | 0.1451 | 10.0830 | 0.7710 |
| **0.40** | 12.1257 | 1052.7000 | 133.5667 | 0.1211 | 9.6453 | 0.7077 |
| **1.00** | 12.1200 | 1522.3333 | 189.7333 | 0.1338 | 10.9880 | 0.6057 |
| **1.50** | 12.1220 | 4032.5667 | 576.1667 | 0.0861 | 14.7000 | 0.7030 |
| **2.00** | 12.1367 | 7572.1667 | 1073.4667 | 0.0893 | 17.3493 | 0.8333 |

| | **LİNEER ARALIK DENKLEMİ** | **ÜS DENKLEMİ** | **POLİNOM DENKLEMİ** |
|---|---|---|---|
| **ALAN** | $y = 5609.x - 797.4$ | $y = 4013.x^{1.170}$ | $y = 1109.x^2 + 3360.x - 227.3$ |
| | **$R^2 = 0.987$** | **$R^2 = 0.916$** | **$R^2 = 0.995$** |
| **YÜKSEKLİK** | $y = 690.9x - 76.04$ | $y = 516.2x^{1.123}$ | $y = 3.649x^2 + 683.5x - 74.17$ |
| | $R^2 = 0.979$ | $R^2 = 0.857$ | $R^2 = 0.979$ |
| **YARI PİK GENİŞLİĞİ** | $y = -0.001x + 0.113$ | $y = 0.106x^{-0.05}$ | $y = 0.045x^2 - 0.094x + 0.136$ |
| | $R^2 = 0.003$ | $R^2 = 0.134$ | $R^2 = 0.683$ |



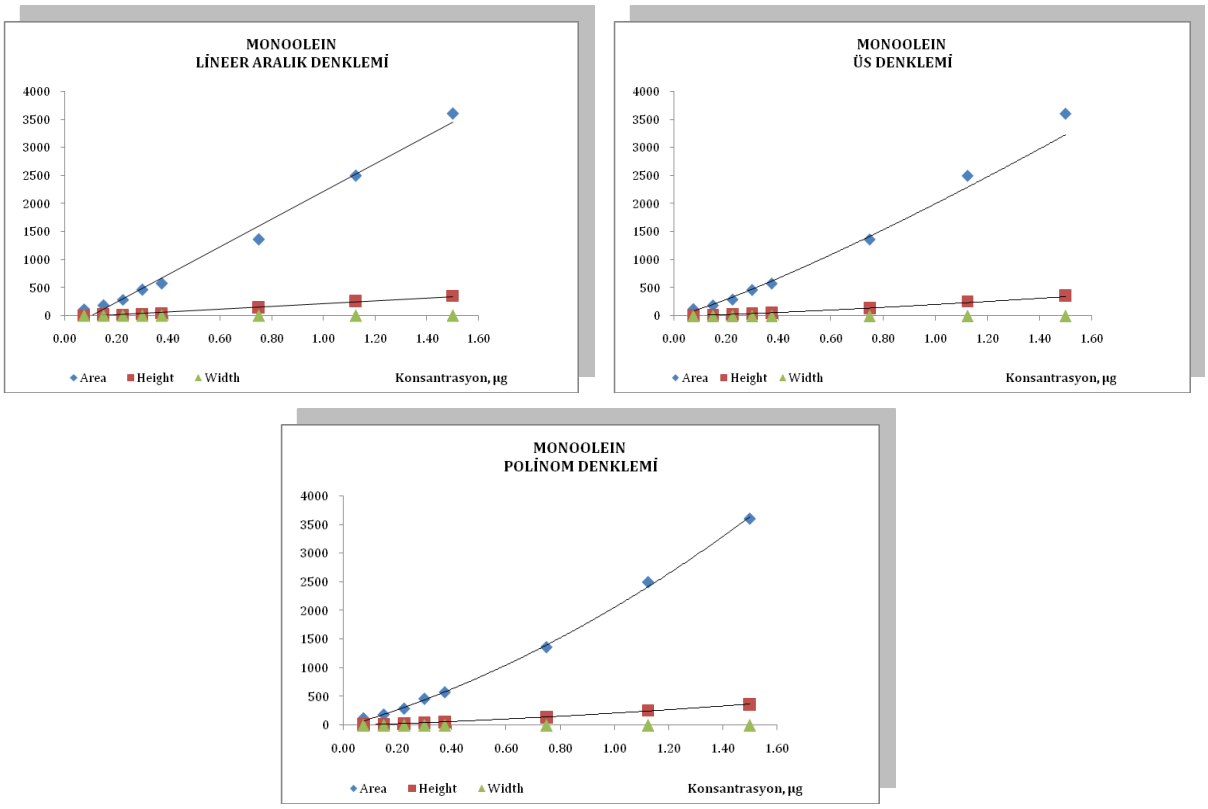

**Şekil 4. 59.** Standartların tümünü içeren karışımda, sigma tokoferol standardı için gerçekleştirilen konsantrasyon çalışmalarına ait kalibrasyon grafikleri

* Şekil. 3.6.'da yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.5.'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

**Çizelge 4. 27.** Standartların tümünü içeren karışımda, monoolein standardı için gerçekleştirilen konsantrasyon çalışmalarına ait analiz verileri

| II. BOYUT AYRIM ANALİZLERİ STANDART KARIŞIMDA MEVCUT MONOGLİSERİT (Monoolein) TAYİNİ | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Miktar, µg** | **Time** | **Area** | **Height** | **Width** | **Area%** | **Symmetry** |
| **0.10** | 18.8977 | 121.6667 | 8.9667 | 0.2252 | 6.0083 | 0.6513 |
| **0.20** | 18.9423 | 187.5000 | 16.6333 | 0.1888 | 4.4687 | 1.1623 |
| **0.30** | 18.8990 | 291.1667 | 23.4667 | 0.2067 | 3.9760 | 0.4453 |
| **0.40** | 18.9217 | 462.6000 | 40.3333 | 0.1917 | 4.2400 | 0.6073 |
| **1.00** | 18.9337 | 577.4000 | 52.1333 | 0.1842 | 4.1673 | 0.9520 |
| **1.50** | 18.9203 | 1364.3000 | 139.4000 | 0.1182 | 4.9777 | 0.7910 |
| **2.00** | 18.9233 | 2500.9667 | 253.1667 | 0.1186 | 5.7300 | 0.7410 |

| | **LİNEER ARALIK DENKLEMİ** | **ÜS DENKLEMİ** | **POLİNOM DENKLEMİ** |
|---|---|---|---|
| **ALAN** | $y = 3428.x - 261.1$ | $y = 2868.x^{1.088}$ | $y = 931.6x^2 + 2012.x + 8.006$ |
| | **$R^2 = 0.989$** | **$R^2 = 0.977$** | **$R^2 = 0.998$** |
| **YÜKSEKLİK** | $y = 336.3x - 31.46$ | $y = 277.7x^{1.198}$ | $y = 78.83x^2 + 216.4x - 8.689$ |
| | $R^2 = 0.991$ | $R^2 = 0.990$ | $R^2 = 0.997$ |
| **YARI PİK GENİŞLİĞİ** | $y = -0.061x + 0.201$ | $y = 0.129x^{-0.21}$ | $y = 0.109x^2 - 0.228x + 0.233$ |
| | $R^2 = 0.483$ | $R^2 = 0.741$ | $R^2 = 0.671$ |




**Şekil 4. 60.** Standartların tümünü içeren karışımda, monoolein standardı için gerçekleştirilen konsantrasyon çalışmalarına ait kalibrasyon grafikleri

* Şekil. 3.6.'da yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.5.'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

**Çizelge 4. 28.** Lipit türlerinin tümünü içeren standart karışım analizine ait istatistik verileri

| | **Lipit türlerinin tümünü içeren standart karışım analizine ait istatistik verileri (n=3)** | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **alıkonma süresi** | **konsantrasyon aralığı** | **polinomal regresyon verileri** | | **S/N oranı (0.2 µg için)** | **LOD (3* S/N oranı)** | **LOQ (10* S/N oranı)** | **geri kazanım (%)** |
| | | | **regresyon eşitliği** | **$r^2$** | | | | |
| **Esterler** (stearyl stearat) | 3.7 dk ±0.1 | 0.05─ 0.75 µg | $y = 2883x^2 + 1029x + 69.41$ | 0.9980 | 29.6 | 88.8 | 296 | 99.4 |
| **TGs** (triolein) | 5.2 dk ±0.1 | 0.10─ 2.00 µg | $y = 2731x^2 + 1834x - 73.31$ | 0.9990 | 51.0 | 153.0 | 510 | 107.1 |
| **FFAs** (oleik asit) | 8.3 dk ±0.1 | 0.10─ 2.00 µg | $y = 2369x^2 + 1631x - 14.24$ | 0.9990 | 61.3 | 183.9 | 613 | 96.8 |
| **α- tokoferol** | 10.1 dk ±0.1 | 0.10─ 2.00 µg | $y = 1394x^2 + 2660x - 281.1$ | 0.9990 | 51.2 | 153.6 | 512 | 99.6 |
| **DGs** (1,2- ve 1,3-diolein) | 11.6 dk ±0.1 | 0.45─ 9.00 µg | $y = -195.1x^2 + 3482x + 145.4$ | 0.9760 | 56.1 | 168.3 | 561 | 100.2 |
| **β- tokoferol** | 11.6 dk ±0.1 | 0.45─ 9.00 µg | $y = -195.1x^2 + 3482x + 145.4$ | 0.9760 | 56.1 | 168.3 | 561 | 96.4 |
| **γ- tokoferol** | 11.6 dk ±0.1 | 0.45─ 9.00 µg | $y = -195.1x^2 + 3482x + 145.4$ | 0.9760 | 56.1 | 168.3 | 561 | 97.1 |
| **Steroller** (stigma sterol) | 11.6 dk ±0.1 | 0.45─ 9.00 µg | $y = -195.1x^2 + 3482x + 145.4$ | 0.9760 | 56.1 | 168.3 | 561 | 99.3 |
| **δ- tokoferol** | 12.1 dk ±0.1 | 0.10─ 2.00 µg | $y = 1060x^2 + 3368x - 285$ | 0.9960 | 58.7 | 176.1 | 587 | 97.6 |
| **MGs** (monoolein) | 18.7 dk ±0.1 | 0.10─2.00 µg | $y = 711x^2 + 1377x - 25.42$ | 0.9990 | 11.4 | 34.2 | 114 | 99.8 |

### 4.1.2.10. Optimum şartlarda gerçekleştirilen yağ analizleri

NP-HPLC tekniğinin uygulandığı II. boyut ($2^{nd}$-D) ayrım analizleri için belirlenen optimum şartlarda farklı bitkisel yağ numuneleri için tayinler gerçekleştirilmiş ve elde edilen veriler Çizelge 4.29'de sunulmuştur. Şekil 3.6'da yer alan sistem akışı kullanılarak yürütülen analizlerde, belirlenen optimum metot parametreleri (Çizelge 3.5) genel olarak özetlenecek olursa;

- **Numune çözücüsü:** Hekzan
- **Numune enjeksiyonu:** 5 µL (0.1 mg yağ/µL yağ numunesi için)
- **$2^{nd}$-D HPLC kolon:** LiChrospher 100A Diol gard kolon (5µm 75x4.6mm)
  LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 250x4.6mm)
- **Akış hızı:** 1,25 mL/dk
- **Sıcaklık:** 40°C
- **ELSD programı:** Neb. sıc. 80°C, Buh. sıc. 40°C, Azot akış hızı; 1.5 SLM

**Çizelge 4. 29.** NP-HPLC tekniğinin uygulandığı II. boyut ayrım analizleri ile gerçekleştirilen farklı bitkisel yağ numunelerine ait sonuçlar

| | **Farklı bitkisel yağ numunelerine ait lipit türü ve içeriği tayin verileri, %** | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **Ester türleri** | **TGs** | **FFAs** | **α-T** | **DGs+ β-T+ γ-T+ Steroller** | **δ-T** | **MGs** |
| **Rafine ayçiçek yağı** | 3892 ±12,66 | 75611 ±551,89 | 257±6,21 | 512 ±7,24 | 19438 ±36,51 | – | 291 ±4,67 |
| **Rafine mısır yağı** | 8444 ±18,58 | 73323 ±368,21 | 598 ±8,63 | 242 ±3,67 | 17005 ±26,62 | 214 ±7,68 | 389 ±6,04 |
| **Rafine kanola yağı** | 8436 ±15,76 | 74431 ±428,57 | 460 ±6,28 | 247 ±4,22 | 16163 ±15,47 | 21 ±1,39 | 264 ±4,30 |
| **Rafine soya yağı** | 2142 ±11,47 | 73281 ±267,49 | 808 ±8,35 | 415 ±9,63 | 18737 ±47,22 | 686 ±7,75 | 346 ±4,79 |
| **Riviera Zeytinyağı** | 4575 ±14,11 | 72626 ±364,11 | 1163 ±12,56 | 307 ±5,97 | 20548 ±48,13 | 29 ±2,07 | 379 ±5,01 |
| **Ham palm yağı** | 1549 ±3,68 | 53340 ±246,45 | 22973 ±16,74 | 285 ±5,13 | 17705 ±36,34 | – | 1094 ±24,37 |

* TGs; trigliseritler, FFAs; serbest yağ asitleri, α-T; alfa tokoferol, DGs;digliseritler, β-T; beta tokoferol, γ-T; gama tokoferol, **δ**-T; sigma tokoferol; MGs; monogliseritler

### 4.1.3. NP-HPLC, RP-HPLC ve $Ag^+$-HPLC tekniğinin uygulandığı III. boyut ayrım ($3^{rd}$-D) analizleri

III. boyut ayrım analizleri; $2^{nd}$-D diol kolonda ayrımı gerçekleştirilen lipitlerin, fraksiyonlar halinde loop sistemlerine yönlendirilmesini ve her bir fraksiyonun $3^{rd}$-D HPLC kolon üzerinde bileşenlerine ayrılarak tayin edilmelerini kapsamaktadır. $2^{nd}$-D HPLC kolondan bekletme hücrelerine (*loop sistemlerine*) yönlendirilen; TG, tokol, DG, MG, sterol, ve FFA fraksiyonlarının kendi bileşenlerine ayrımı için; farklı yöntem ve sistem elemanlarının kullanımı gerekmektedir. Belirtilen lipit türlerinin her birisinin tayini için; önerilen sisteme en uygun şekilde adapte edilebilecek yöntemler oluşturulmaya çalışılmıştır. Çalışmada, öncelikle NP-HPLC, RP-HPLC ve $Ag^+$-HPLC gibi farklı teknikler uygulanarak ayrı aşamalar halinde optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiş, daha sonrasında $1^{st}$-D ve $2^{nd}$-D ayrımlar ile birleştirilen sistem uygulamalarına, yani çok boyutlu ayrım analizlerine geçilmiştir.

III. boyut ayrım aşamasında, $3^{rd}$-D HPLC kolon üzerinde bileşenlerine ayrımı hedeflenen TG ve tokol lipit türleri için ayrı şekilde gerçekleştirilen optimizasyon çalışmaları;

**i.** NP-HPLC tekniğinin uygulandığı III. boyut ayrım analizleri (*Tokol türleri için*)

**ii.** RP-HPLC tekniğinin uygulandığı III. boyut ayrım analizleri (*TG türleri için*)

**iii.** $Ag^+$-HPLC tekniğinin uygulandığı III. boyut ayrım analizleri (*TG türleri için*) olmak üzere farklı teknikler uygulanarak tamamlanmıştır.

#### 4.1.3.1. NP-HPLC tekniğinin uygulandığı III. boyut ayrım analizleri

##### 4.1.3.1.1. Tokol (tokoferol, -T & tokotrienol, -TT) analizi

Bitkisel kaynaklı yağlarda mevcut antioksidanların ve vitaminlerin sentezleyicisi doğal bileşenler olarak tanımlanan tokol (tokoferol & tokotrienol) lipit bileşenlerinin tayini, büyük önem arz etmektedir. Tokol yapılı lipitlerin; hidroperoksitleri ve diğer serbest radikalleri stabil hale getirerek ya da kendileri oksitlenerek, yağ içerisindeki diğer bileşenlerin oksidasyonunu önledikleri bilinmektedir (Gunstone, 2008; Berien, 2004). Bunun yanında; tokol tayininin yağlardaki tağşişin varlığını tespit etmede kullanılan önemli bir parametre olduğu pek çok literatür çalışmasında belirtilmektedir.

Önerilen analiz sistemi üzerinde; III. boyut ayrım aşamasında tokol bileşenlerinin tayini için bazı çalışmalar yürütülmüştür. Yürütülen optimizasyon çalışmalarında; tokoferol ve tokotrienol bileşenlerinin her ikisinin de mevcut olan; alfa (α), beta (β), gama (ɣ) ve sigma (δ) izomer yapılarının ayrımlarının iyileştirilmesi esas alınmıştır. Literatürlerde; belirtilen sekiz farklı yapının, ayrımalarının iyileştirilerek eş zamanlı tayini için çok sayıda optimizasyon uygulaması bulunmaktadır.

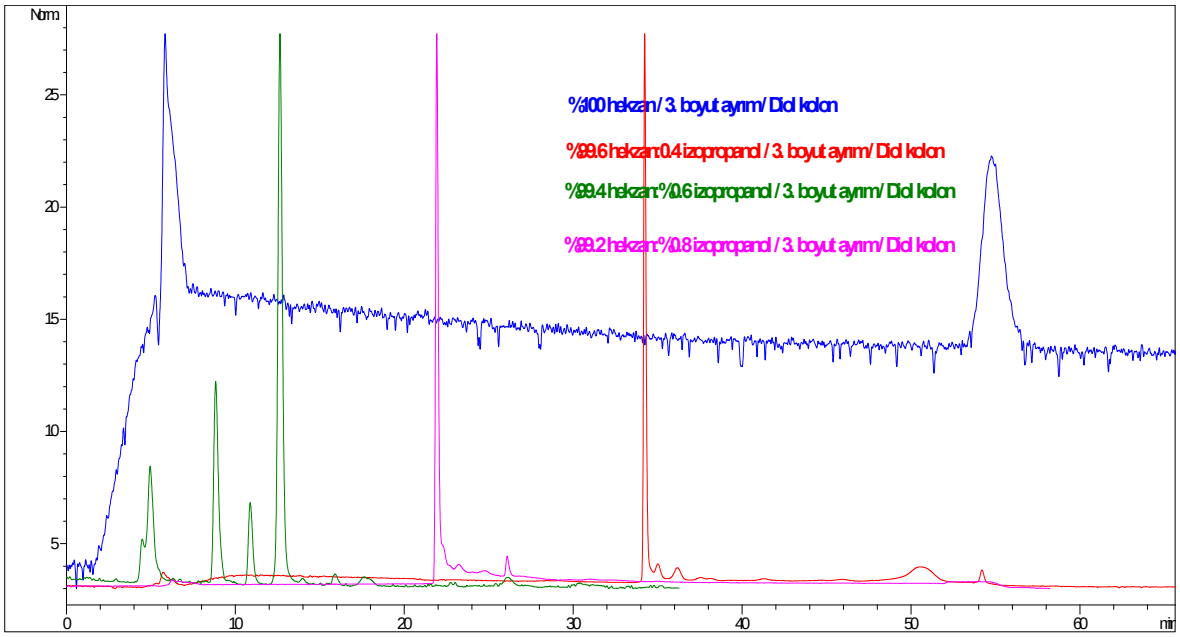
NP-HPLC tekniğinin uygulandığı tokol analizlerinde; hekzan ile hazırlanan farklı yağ numuneleri ve tokol standart maddeleri kullanılarak çalışmalar yürütülmüştür. Tokol analizleri için; Abidi (2000) tarafından önerilen metotlar esas alınmış ve sistem üzerinde uygun akış yolları kullanılarak;

- Hareketli faz bileşimi
- Akış hızı ve
- Sıcaklık parametreleri optimize edilmiştir.

- **Hareketli faz bileşimi etkisi.**

III. boyut ayrım ($3^{rd}$-D) analizlerinde kullanılması öngörülen diol yapılı HPLC kolon üzerinde sızma zeytinyağı numuneleri ile; hareketli faz bileşimi etkisine dair bazı analizler yürütülmüştür. Analizlerde kullanılan hareketli faz programı; Abidi (2000) tarafından önerilen çalışmaya ait metot şartları esas alınarak oluşturulmuştur.

Hareketli faz sistemleri; hekzan ve izopropanol çözücülerinin uygun oranları ile oluşturulmuş, ve *%100 hekzan; %99.2 hekzan+0.8 izopropanol; %99.4 hekzan+0.6 izopropanol; %99.6 hekzan+0.4 izopropanol* çözücüleri için, izokrotik sistem uygulamaları gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz sistemlerinin tokol türlerinin ayrımları üzerine olan etkisi incelenmiş, elde edilen kromatogramlar karşılaştırmalı olarak Şekil 4.61'de verilmiştir.




**Şekil 4. 61.** III. boyut ayrım tokol analizleri üzerine hareketli faz bileşimi etkisinin sızma zeytinyağı numuneleri kullanılarak incelendiği analizlerden elde edilen kromatogramlar

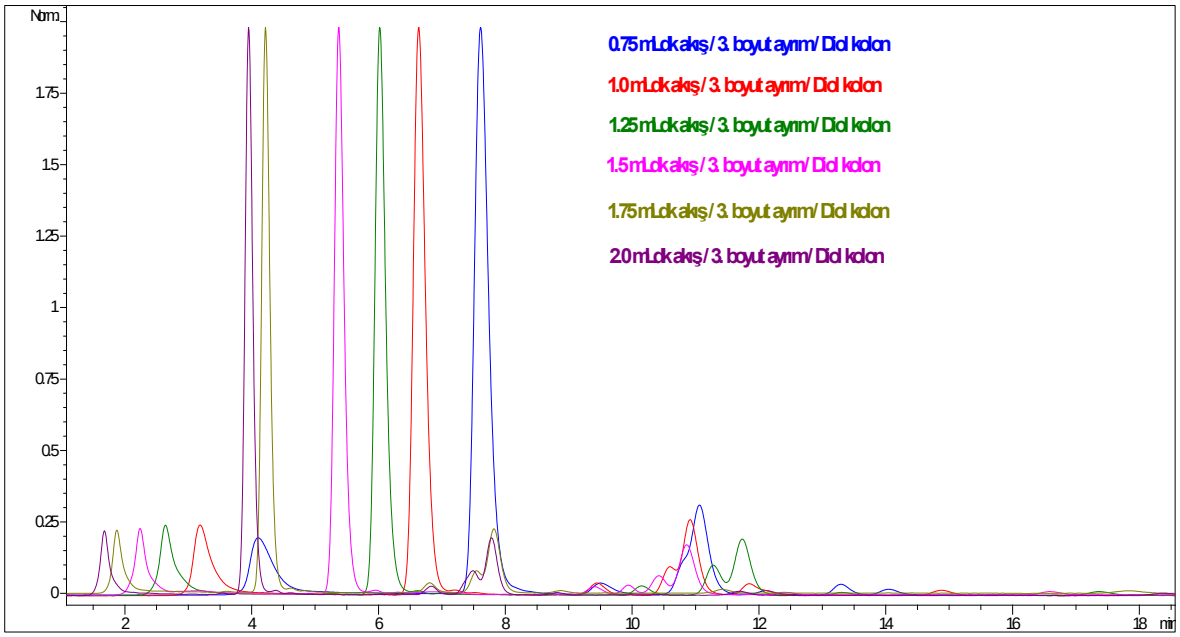
| | |
|---|---|
| Numune çözücüsü: | hekzan |
| Numune enjeksiyonu: | 2 µL (0.1mg yağ/µL çözücü) (Manuel enjeksiyon) |
| 3rd-D HPLC Kolon: | LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm)+ (5µm 250x4.6mm) |
| Akış hızı: | 0.7 mL/dk |
| Sıcaklık: | 25°C |
| Hareketli faz bileşimi: | **Hekzan: izopropanol**; **100:0; 99.2:0.8; 99.6:0.4 ve 99.4:0.6 v/v** |

* Şekil. 3.8.'da yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.7.'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

Şekil 4.61'de yer alan kromatogramlardan görüleceği üzere; farklı çözücü oranları ile oluşturulan metot programları ile, tokol lipit türleri için oldukça farklı *k'* ve *Rs* değerleri tespit edilmiştir. %100 hekzan; %99.2 hekzan+0.8 izopropanol ve %99.6 hekzan+0.4 izopropanol için oldukça verimsiz analiz sonuçları elde edilmiştir. Bu üç farklı uygulamada; tokol türlerinin ayrımlarından ziyade, tayin edilmeleri için uygun olmayan, hareketli faz bileşimleri olduğu görülmüştür. %99.4 hekzan+0.6 izopropanol çözücü karışımının ise; tokoferol ve tokol türlerinin ayrımı üzerinde oldukça verimli sonuçların elde edilmesini sağladığı görülmüştür. Sonuç olarak; tokol lipit türlerinin ayrımında; %99.4 hekzan+0.6 izopropanol çözücü karışımı uygulamasının oldukça etkili olduğu ve bu karışım ile yapılan izokrotik programlamanın, en uygun yaklaşım olduğu kanaatine varılmıştır.

- **Akış hızı etkisi.**

Diol kolon ile ayrımı hedeflenen tokol türlerinin kromatografik davranışları üzerine, hareketli faz akış hızının etkisini incelemek amacıyla bazı denemeler gerçekleştirilmiştir. Bir önceki aşamada belirlenen 99.4% hekzan: 0.6% izopropanol hareketli faz bileşimi ve 0,1 mg yağ/µL konsantrasyonundaki ayçiçek yağı numuneleri kullanılarak, farklı akış hızlarında (0.75; 1.00; 1.25; 1.50; 1.75 ve 2.00 mL/dk) gerçekleştirilen analizlere ait kromatogramlar, karşılaştırmalı olarak Şekil 4.62'de verilmiştir.




**Şekil 4. 62.** III. boyut ayrım tokol analizleri üzerine hareketli faz akış hızı etkisinin rafine ayçiçeği yağı numuneleri kullanılarak incelendiği analizlerden elde edilen kromatogramlar

| | |
|---|---|
| Numune çözücüsü: | hekzan |
| Numune enjeksiyonu: | 2 µL (0.1 mg yağ/ µL çözücü) (Manuel enjeksiyon) |
| 3rd-D HPLC Kolon: | LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm)+ (5µm 250x4.6mm) |
| Akış hızı: | **0.75- 1.00- 1.25- 1.50 – 1.75- 2.00 mL/dk** |
| Sıcaklık: | 25°C |
| Hareketli faz bileşimi: | Hekzan: izopropanol; 99.4:0.6, v/v |

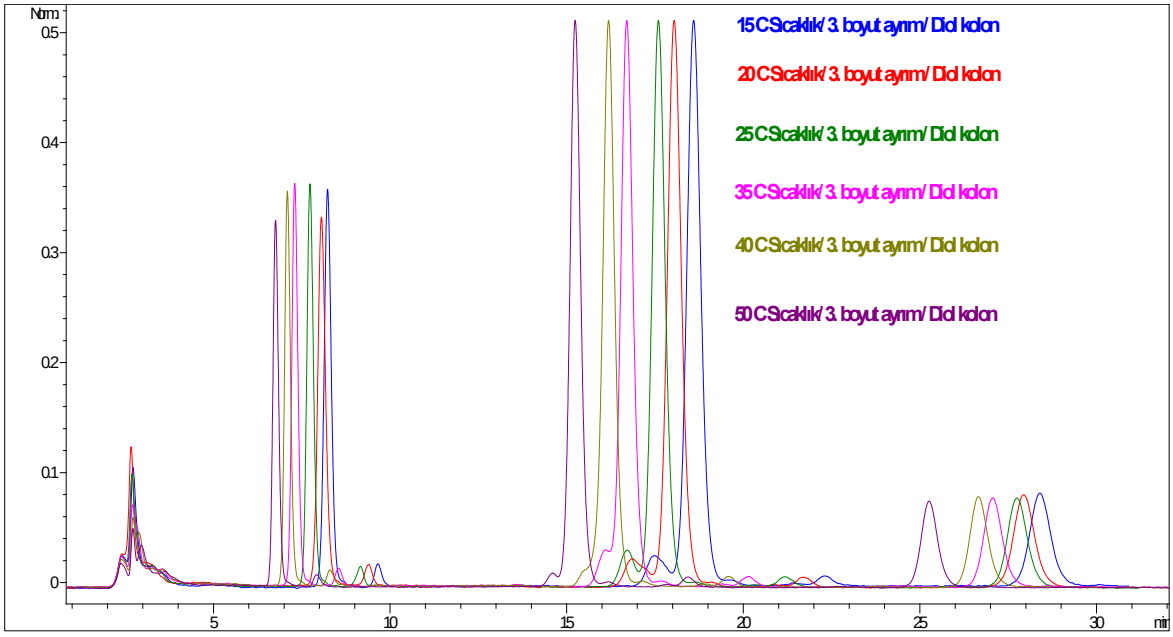
* Şekil. 3.8.'da yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.7.'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen kromatogramlardan görüleceği üzere; akış hızının artmasıyla birlikte *k'*, *Rs* ve alıkonma süresi değerlerinde belirgin bir azalma meydana gelmiştir. Bu durum; artan hareketli faz akışının, kolondaki moleküllerin hareketliliğini arttırması ve hareketli-sabit faz arasındaki dengenin en etkin ayırmayı sağlayacak şekilde sağlanmış olması ile ilişkilendirilmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda karşılaşılan problem; beta

(β) ve gama (ɣ) izomerlerinin ayrımı ile ilgilidir. Önerdiğimiz hareketli faz sistemi, bu durum için uygun bir yaklaşım sergilemekle beraber, kullanılan akış hızının uygun olmasını gerektirmektedir. Akış hızı çalışmalarında, minumun analiz süresinde beta (β) ve gama (ɣ) tokol izomerlerinin ayrımını istenilen düzeyde sağlayan Rs değeri, 1.5 mL/dk akış hızı ile sağlanabilmiştir.

- **Sıcaklık etkisi.**

III. boyut ayrım aşamasında tokol analizlerinin optimizasyonu için yürütülen önemli bir diğer çalışma ise; sıcaklık etkisi üzerine yapılan analizlerdir. Sıcaklık değeri uygulamasının; kolon üzerinde ayrımı hedeflenen lipit türlerinin, kromatografik davranışlarına önemli derecede etki ettiği bilinmektedir. Sıcaklık etkisi üzerine yürütülen analizlerde; 0,1 mg yağ/µL konsantrasyonda hazırlanan numuneler ile farklı sıcaklık değerleri (15; 20; 25; 35; 40 ve 50°C) için çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Yürütülen analizlere ait kromatogramlar, karşılaştırmalı olarak Şekil 4.63'de verilmiştir.



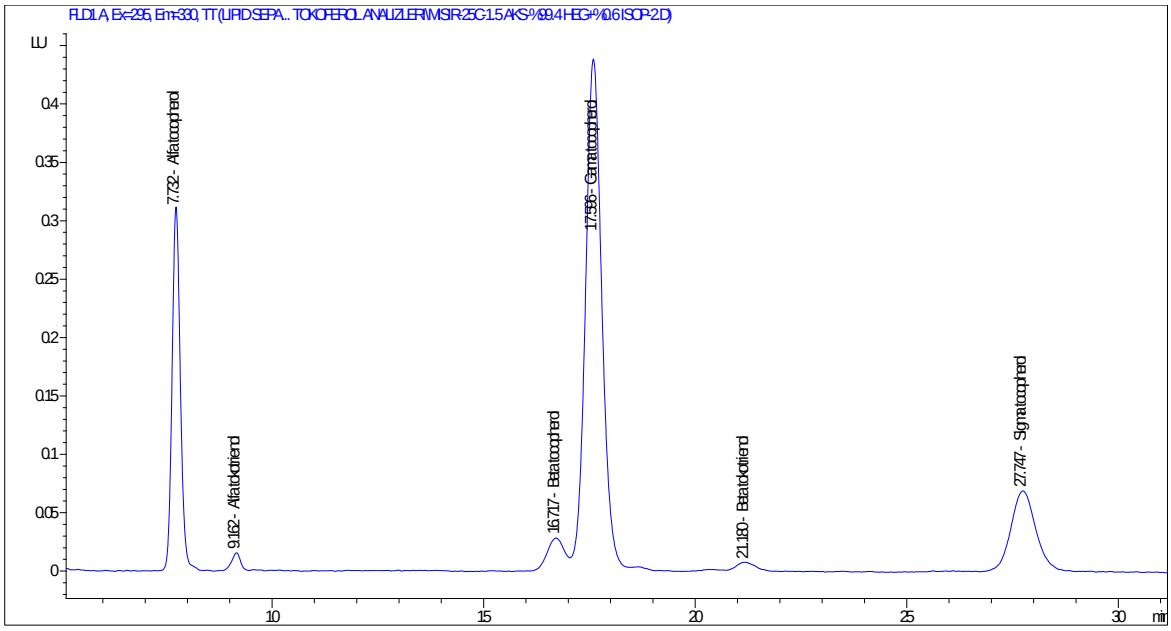

**Şekil 4. 63.** III. boyut ayrım tokol analizleri üzerine sıcaklık etkisinin rafine mısır yağı numuneleri kullanılarak incelendiği analizlerden elde edilen kromatogramlar

| | |
|---|---|
| Numune çözücüsü: | hekzan |
| Numune enjeksiyonu: | 2 µL (0.1mg yağ/ µL çözücü) (Manuel enjeksiyon) |
| 3rd-D HPLC Kolon: | LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm)+ (5µm 250x4.6mm) |
| Akış hızı: | 1.50 mL/dk |
| Sıcaklık: | **15- 20- 25- 35- 40- 50°C** |
| Hareketli faz bileşimi: | Hekzan: izopropanol; 99.4:0.6, v/v |

* Şekil. 3.8.'da yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.7.'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

On-line SPE-FIA-HPLC analiz sistemi üzerinde yürütülen sıcaklık optimizasyon analizleri; tespit edilen optimum hareketli faz bileşimi ve akış hızı kullanılarak, diol kolon ile tamamlanmıştır. Şekil 4.63'de yer alan kromatogramlardan görüleceği üzere; sıcaklık değeri arttıkça tokol lipit türlerine ait alıkonma sürelerinin, *Rs* ve *k'* değerlerinin azaldığı ve *Rs* değerlerinin farklandığı tespit edilmiştir. Kullanılan diol yapılı HPLC kolonun yapısını bozucu etki gösterebilecek ve kullanma talimatına uygun olmayan yüksek sıcaklık uygulamalarına geçilmemiştir. En yüksek 50°C uygulaması yapılan analizlerde; 25°C'de yürütülen analizler ile tokol lipit türlerinin başarılı bir şekilde ayrılabildiği kanaatine varılmıştır.

Optimizasyon deneyleri sonucu belirlenen analiz uygulamaları kullanılarak, tokol standartları ile; metot için kalibrasyon grafikleri çizilmiş ve farklı özelliklerdeki bitkisel yağ numuneleri için analizler gerçekleştirilmiştir. Bitkisel yağlar ve standart maddeler ile gerçekleştirilen analizlere ait örnek kromatogram Şekil 4.64'de, tespit edilen tokol miktarları ise Çizelge 4.30'da yer almaktadır.




**Şekil 4. 64.** III. boyut ayrım analizleri için rafine mısır yağı kullanılarak gerçekleştirilen tokol analizlerinden elde edilen kromatogramlar

| | |
|---|---|
| Numune çözücüsü: | hekzan |
| Numune enjeksiyonu: | 2 µL (0.1mg yağ/ µL çözücü) (Manuel enjeksiyon) |
| 3rd-D HPLC Kolon: | LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm)+ (5µm 250x4.6mm) |
| Akış hızı: | 1.50 mL/dk |
| Sıcaklık: | 25°C |
| Hareketli faz bileşimi: | Hekzan: izopropanol; 99.4:0.6, v/v |

* Şekil. 3.8.'da yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.7.'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

**Çizelge 4. 30.** III. boyut ayrım metot şartları kullanılarak farklı bitkisel yağlar için gerçekleştirilen tokol analizlerine ait sonuçlar (mg/kg yağ)

| | Tokol (tokoferol ve tokotrienol) kompozisyonu verileri. ortalama ± SD (mg/ kg yağ) | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Rafine yağlar** | ***α-T**** | ***β-T*** | ***γ-T*** | ***δ-T*** | ***α-TT**** | ***β-TT*** | ***γ-TT*** | ***δ-TT*** | **Toplam tokol miktarı** |
| **Ayçiçek yağı** | 715.12±2.31 | 47.12±0.82 | 98.07±0.38 | - | - | - | - | - | 860.31±1.15 |
| **Soya yağı** | 76.33±0.84 | 19.91±0.40 | 540.03±4.33 | 277.25±3.19 | - | - | - | - | 913.51±7.04 |
| **Mısır yağı** | 186.38±4.65 | 35.83±0.50 | 514.96±4.30 | 125.62±0.94 | 11.89±1.07 | 12.18±1.83 | - | - | 886.84±4.60 |
| **Fındık yağı** | 603.02±2.99 | 31.08±0.48 | 240.88±0.94 | 24.97±0.93 | - | - | - | - | 899.96±3.40 |
| **Yer fıstığı yağı** | 245.64±4.20 | 28.10±1.24 | 150.00±2.17 | 65.14±1.65 | - | - | - | - | 488.88±3.96 |
| **Kanola yağı** | 257.45±1.12 | 48.21±0.23 | 497.56±2.67 | 19.43±0.14 | - | - | - | - | 822.65±3.68 |
| **Soğuk pres yağlar** | ***α-T**** | ***β-T*** | ***γ-T*** | ***δ-T*** | ***α-TT**** | ***β-TT*** | ***γ-TT*** | ***δ-TT*** | **Toplam tokol miktarı** |
| **Kabak çekir. yağı** | 9.83±2.29 | 744.73±3.32 | 88.9±1.90 | - | - | - | 17.20 ±1.21 | - | 860.64±1.71 |
| **Ceviz yağı** | 21.52±4.39 | 718.16±6.81 | 39.46±3.85 | - | 5.65±0.25 | 9.50±0.98 | 108.71±3.00 | - | 903.00±2.05 |
| **Keten tohumu yağı** | 16.19±4.34 | 222.88±1.38 | 721.25±7.65 | 17.14±0.72 | - | - | - | - | 977.47±5.07 |
| **Çörek otu yağı** | 12.6±0.67 | 28.45±2.05 | 38.86±2.85 | - | 100.78±0.38 | 295.84±1.47 | 13.71±3.76 | - | 490.24±1.02 |
| **Haşhaş yağı** | 87.18±3.26 | 9.18±1.00 | 819.23±7.80 | 16.23±3.23 | - | - | - | - | 931.82±7.50 |
| **Aspir yağı** | 897.41±7.43 | 22.83±0.84 | 23.01±2.62 | - | - | - | - | - | 943.25±5.81 |
| **Sızma zeytinyağı** | 175.22±4.70 | 21.52±4.12 | 66.76±3.05 | 20.46±1.75 | - | - | - | - | 283.95±0.71 |
| **Kanola yağı** | 283.86±1.43 | 56.07±0.49 | 563.94±4.75 | 20.71±0.23 | - | - | - | - | 924.57±6.26 |

* T; Tokoferol. TT; Tokotrienol

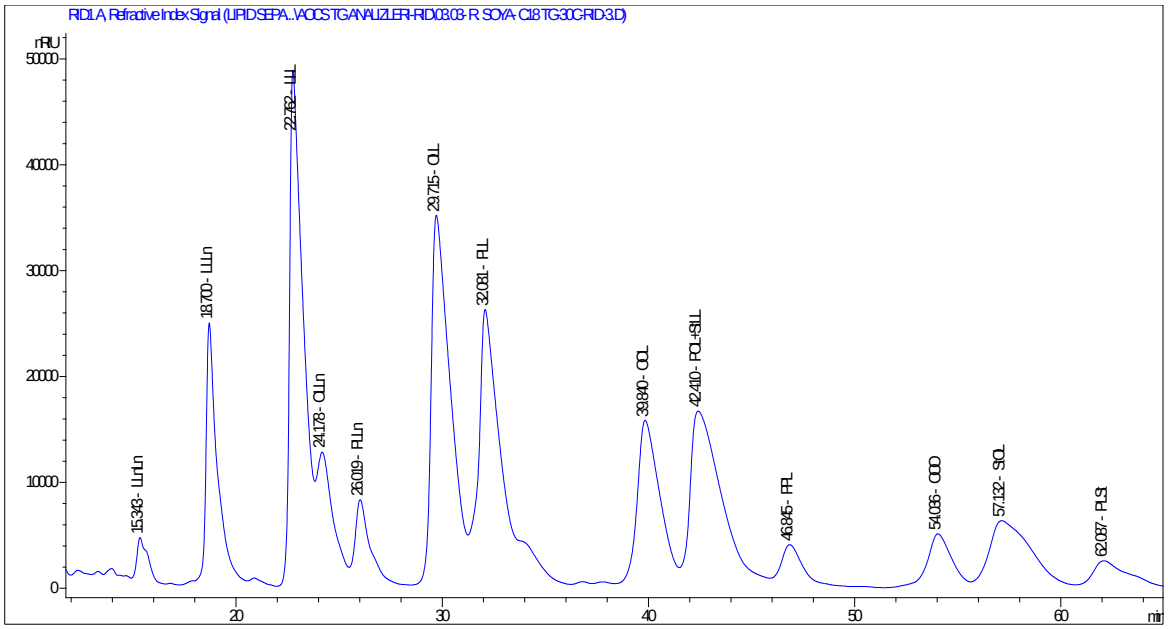
### 4.1.3.2. RP-HPLC tekniğinin uygulandığı III. boyut ayrım analizleri

#### 4.1.3.2.1. Trigliserit, digliserit ve monogliserit analizi

Yapısında yer alan yağ asitlerinin türü ve gliserine bağlı bulunduğu pozisyonlar ile yağların kimyasal ve fiziksel karakteristiklerini belirleyen ve temel bileşenler olan trigliseritlerin tayinine ilişkin bazı analizler yürütülmüştür. Trigliseritler, yağların yaklaşık olarak % 95-98'lik kısmını oluşturan yapılardır. Bu nedenle; trigliserit tayini yağların karakterizasyonu için yürütülen en elzem analizlerden birisi olarak kabul edilmektedir.

III. boyut ayrım aşamasında Şekil 3.8'de yer alan sistem işleyişi kullanılarak, trigliserit standartları ve farklı bitkisel yağlar için analizler yürütülmüştür. AOCS resmi kuruluşu tarafından onaylı bu yöntem (AOCS Ce 5b-89) ile; bitkisel sıvı yağlarda mevcut trigliserit moleküllerinin ayrımı ve molekül ağırlıkları cinsinden yada eş değer karbon sayısının fonksiyonu olarak doymamışlılıklarının kantitatif olarak tayin edilmesi mümkündür. Standart AOCS Ce 5b-89 metoduna göre gerçekleştirilen analizlerden elde edilen kromatogramlar Şekil 4.65'de verilmiştir. Farklı bitkisel yağlar için tespit edilen trigliserit miktarları ise Çizelge 4.31'de yer almaktadır.

Şekil 4.65'de yer alan kromatogramlardan; On-line SPE-FIA-HPLC yağ analiz sistemi üzerinde trigliserit türü yapıların ayrımı için, yöntemin uygun olduğu görülmektedir. III. boyut ayrım aşamasında uygulanan yöntem, trigliserit yapıların polarite değerlerine göre ayrımlarını sağlamaktadır. RP-HPLC tekniği uygulaması ile; daha fazla polarite değerine sahip monogliserit ve digliserit yapılar önce elue edilmekte, daha sonra trigliserit yapılar elue edilmektedir. Trigliserit bileşenleri, kendi aralarında polarite değerlerine göre ayrılarak tayin edilmektedir.




**Şekil 4. 65.** III. boyut ayrım analizleri için rafine soya yağı kullanılarak gerçekleştirilen trigliserit analizinden elde edilen kromatogram

| | |
|---|---|
| Numune çözücüsü: | Aseton |
| Numune enjeksiyonu: | 20 µL (0.1mg yağ/ µL çözücü) (otomatik enjeksiyon) |
| 3rd-D HPLC Kolon: | ACE C18 kolon (5µm 250x4.6mm) |
| Akış hızı: | 1.5 mL/dk |
| Sıcaklık: | 30°C |
| Hareketli faz bileşimi: | Aseton: ACN; 50:50%, v/v |
| Dedeksiyon: | RID, 35°C |

* Şekil. 3.8.'da yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.7.'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.31'de yer alan bilgilerden de görüleceği üzere; bitkisel yağlarda mevcut trigliserit yapılar; LLnLn< LLLn< LLL< OLLn< PLLn< OLL< PLL< OOL< POL+StLL< PPL< OOO< StOL< PLSt sıralamasına göre elue edilmektedir. Alıkonma süresi, k' ve Rs değerleri bakımından uygun kromatografik verilerin elde edilebildiği bu yöntem; farklı özelliklere sahip rafine ve soğuk pres yağlara uygulanmış ve elde edilen veriler Çizelge 4.31'de verilmiştir. Çizelge 4.31'de yer alan analiz verilerinin, türk gıda kodeksi tarafından oluşturulan, "*Bitki Adı ile Anılan Yağlar Tebliği*" bilgileri ile uyumlu olduğu görülmektedir.

**Çizelge 4. 31.** III. boyut ayrım metot şartları kullanılarak farklı bitkisel yağ numuneleri için gerçekleştirilen trigliserit tayini sonuçları

| | **Farklı bitkisel yağ numuneleri için AOCS Resmi metoduna göre gerçekleştirilen trigliserit tayini sonuçları, %** | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Trigliserit yapısı(*)** | **Ayçiçek yağı** | **Mısır yağı** | **Soya yağı** | **Kanola yağı** | **Pamuk yağı** | **Riviera Zeytinyağı** | **Ceviz yağı** | **Susam yağı** | **Aspir yağı** | **Keten T. yağı** | **Haşhaş yağı** | **Fıstık yağı** | **Çörek otu yağı** | **Kabak Ç. yağı** |
| **LLnLn** | 0.031 | 0.148 | 1.062 | 0.501 | 0.382 | - | 3.223 | 0.098 | 0.265 | 12.277 | 0.172 | 0.153 | 0.187 | 0.513 |
| **LLLn** | 0.125 | 1.33 | 7.325 | 2.335 | 0.364 | 0.066 | 14.207 | 0.382 | 0.558 | 2.958 | 0.967 | 0.317 | 0.53 | 0.472 |
| **LLL** | 22.401 | 19.056 | 16.396 | 5.995 | 20.289 | 0.257 | 26.229 | 14.775 | 43.107 | 0.494 | 39.776 | 6.118 | 23.534 | 8.073 |
| **OLLn** | 0.122 | 1.94 | 4.427 | 5.027 | 1.185 | - | 5.756 | - | 2.07 | 5.783 | 0.279 | 1.76 | 0.362 | - |
| **PLLn** | 0.024 | 0.66 | 2.163 | 0.744 | 13.96 | 0.131 | 3.997 | 0.142 | - | 2.395 | 17.816 | - | - | - |
| **OLL** | 29.649 | 22.75 | 16.865 | 12.401 | 27.462 | - | 15.669 | 22.932 | 16.24 | 1.153 | 18.574 | 13.882 | 18.407 | 17.749 |
| **PLL** | 9.055 | 14.722 | 15.896 | 5.598 | 4.224 | 1.714 | 13.332 | 8.679 | 12.953 | 7.577 | - | 4.172 | 19.448 | 8.313 |
| **OOL** | 14.385 | 13.264 | 8.835 | 21.58 | 15.842 | 16.492 | 6.143 | 17.82 | 5.485 | 1.913 | 6.644 | 21.158 | 10.566 | 19.223 |
| **POL+StLL** | 11.828 | 12.817 | 13.024 | 7.318 | 10.265 | 8.109 | 7.501 | 14.602 | 7.239 | 1.236 | 10.648 | 16.679 | 15.649 | 15.776 |
| **PPL** | 0.859 | 1.834 | 2.166 | 0.663 | 0.834 | 1.004 | 0.435 | 1.469 | 0.839 | 3.521 | 0.632 | 1.662 | 1.669 | 2.418 |
| **OOO** | 5.543 | 4.667 | 3.165 | 24.409 | 3.672 | 42.301 | 1.371 | 7.774 | 4.824 | 1.632 | 0.861 | 18.147 | 3.041 | 9.776 |
| **StOL** | 5.099 | 5.694 | 6.612 | 6.927 | 1.522 | 26.235 | 2.136 | 9.916 | 5.151 | 1.863 | 2.551 | 13.482 | 6.101 | 13.874 |
| **PLSt** | 0.871 | 1.119 | 2.064 | 0.431 | 0.382 | 3.691 | - | 1.411 | 1.268 | 0.603 | 1.081 | 2.469 | 0.507 | 3.813 |

* P; palmitik asit, St; stearik asit, O;oleik asit, L;linoleik asit, Ln; linolenik asit

### 4.1.3.3. $Ag^+$-HPLC tekniğinin uygulandığı III. boyut ayrım analizleri ve kemometrik yöntem ile optimizasyonu

#### 4.1.3.3.1. Trigliserit analizi

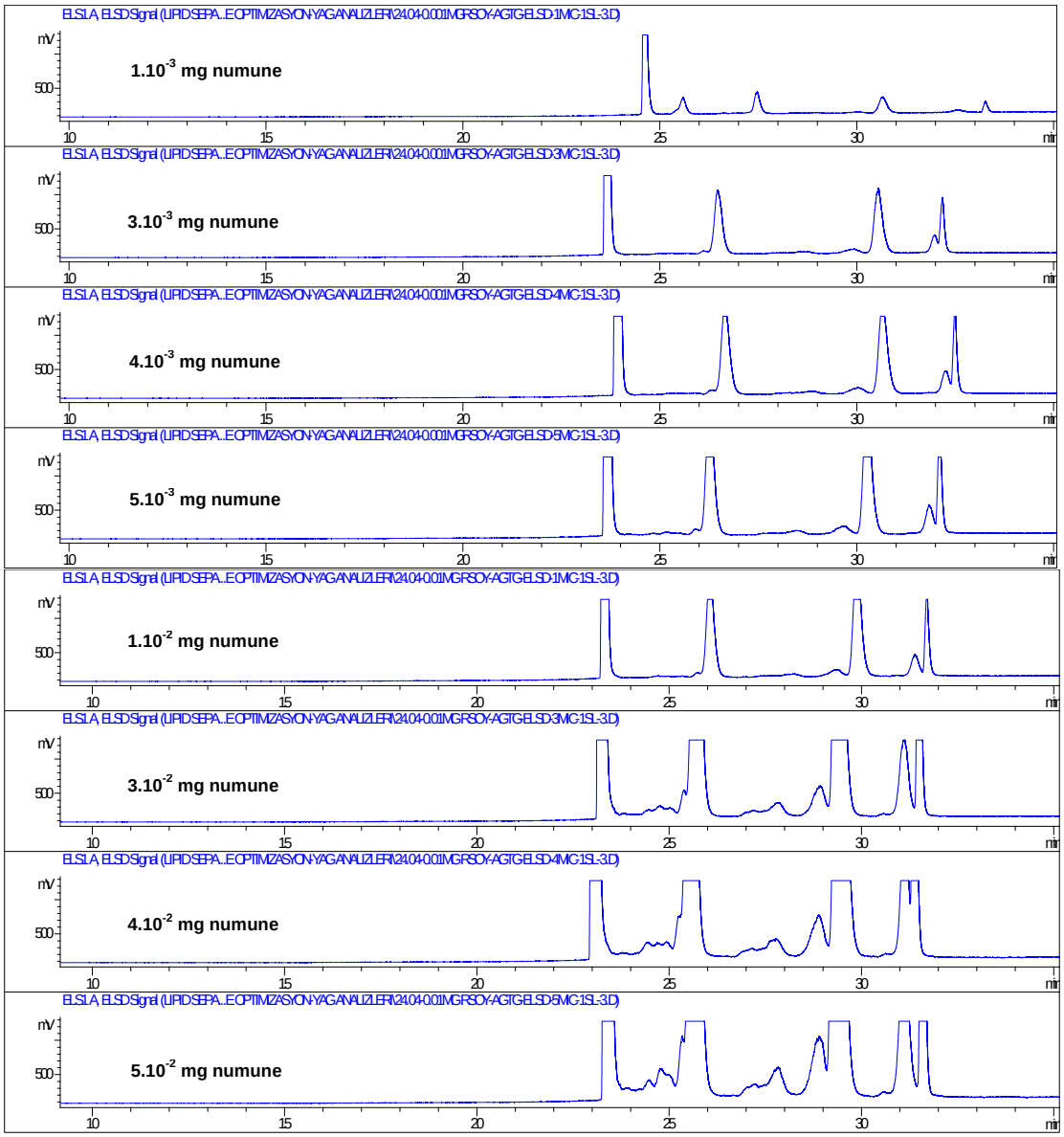
III. boyut ayrım aşamasında trigliserit bileşenlerinin tayini için RP-HPLC tekniği ile yürütülen çalışmalara alternatif olarak, $Ag^+$-HPLC tekniğinin uygulandığı bazı çalışmalar yürütülmüştür. $2^{nd}$-HPLC kolonu ile ayrımları sağlanan nötral lipit fraksiyonlarının $3^{rd}$-D HPLC kolonuna aktarıldığında, kullanılan hareketli faz sistemleri ile uyumluluğunu sağlamak amacıyla farklı/alternatif yöntemlere ihtiyaç olabileceği düşünülerek oluşturulan trigliserit tayin yöntemidir. Lipit türlerinin tayini için özel olarak geliştirilen ve kompleks oluşum mekanizması esas alınarak ayrımların gerçekleştirildiği gümüş iyon kromatografi tekniğine ait bazı deneysel parametrelerin optimizasyonu amacıyla; 5 seviyeli/3 faktörlü, merkezi kompozit tasarım (MKT) uygulaması gerçekleştirilmiştir. Yürütülen optimizasyon çalışmalarında; trigliserit bileşenlerinin tayini için, farklı hareketli faz sistemlerinin kullanımının sağlanması ve ayrımlarının iyileştirilmesi esas alınmıştır. $Ag^+$-HPLC tekniğinin uygulandığı tokol analizlerinde; hekzan ile hazırlanan farklı yağ numuneleri ve trigliserit standart maddeleri kullanılarak çalışmalar yürütülmüştür.

$Ag^+$-HPLC tekniğinin uygulandığı III. boyut ayrım analizlerinde; önerilen yöntemin optimizasyonu ve önemli deneysel faktörler arasındaki ilişkiyi hesaplamak için, 5 seviyeli/3 faktörlü merkezi kompozit dizayn (CCD) oluşturulmuştur. Deneysel tasarım için kullanılacak değerlerin tespiti öncesinde; Şekil 3.8'de verilen sistem işleyişi kullanılarak;

- Numune miktarı ve
- Sıcaklık parametrelerine ilişkin bazı ön denemeler gerçekleştirilmiştir.

- **<u>Numune miktarı etkisi</u>.**

Numune miktarı etkisinin incelendiği analizler; hekzanda hazırlanan 0.001 mg yağ/µL ve 0.010 mg/µL şeklindeki rafine soya yağı numuneleri için; 1-2-3-4 ve 5 µL enjeksiyonlar ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kromatogramlar, karşılaştırmalı olarak Şekil 4.59.'da yer almaktadır.




**Şekil 4. 66.** $Ag^{+}$-HPLC tekniğinin uygulandığı III. boyut ayrım analizlerinde numune miktarı etkisinin, rafine soya yağı numuneleri kullanılarak incelendiği analizlerden elde edilen kromatogramlar

| | |
|---|---|
| Numune çözücüsü: | Hekzan |
| Konsantrasyon: | **$1.10^{-3}$– $3.10^{-3}$– $4.10^{-3}$– $5.10^{-3}$– $1.10^{-2}$– $3.10^{-2}$– $4.10^{-2}$– $5.10^{-2}$ mg** |
| 3rd-D HPLC kolon: | ChromSpher 5 Lipids kolon (5µm 250 x 4.6 mm) |
| Akış hızı: | 1.0 mL/dk |
| Sıcaklık: | 30°C |
| ELSD programı: | Neb. sıcaklığı 80°C, Buh.sıcaklığı 40 °C, Azot gazı akış 1 SLM |

* Şekil. 3.8.'de yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.10.'da yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

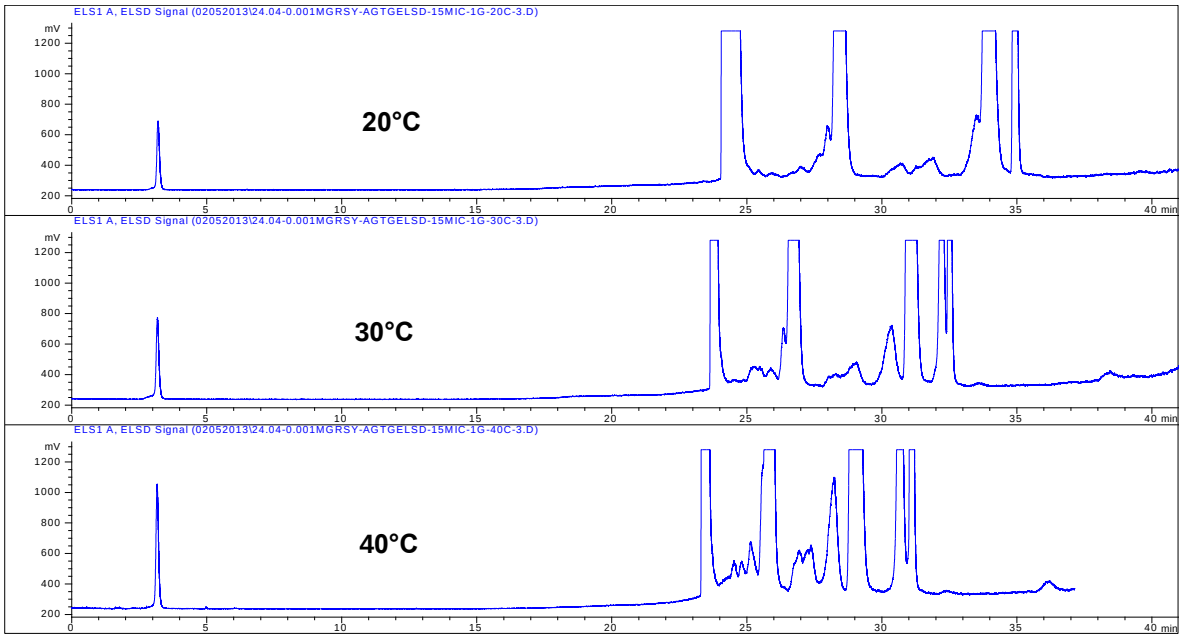
Kompleks oluşum mekanizması esas alınarak ayrımların gerçekleştirildiği teknikte, türlerin tayini için numune miktarı en önemli parametrelerden birisi olarak kabul edilmektedir. Yüksek miktarda (konsantrasyonda) numune enjeksiyonları ile; kolon kapasitesinin aşılmasına ve kompleks oluşum mekanizmasının yavaşlamasına

neden olunmaktadır. Bu durumun sonucunda ise; sabit ve hareketli faz sistemleri arasında istenilen hızda dengenin oluşmamasına ve kolonun analitleri ayırma kabiliyetinin azalmasına sebep olacak bir durum oluşmaktadır. Önerilen yağ analiz sisteminin III. boyut ayrım aşamasında lipit türlerinin tayini için alternatif olarak önerilen bu yöntemde; düşük miktarda bulunan trigliserit türlerinin tayin edilebilmesi için, numune konsantrasyonu en düşük $1.10^{-3}$ mg (1 µL enjeksiyon) şeklinde uygulanmıştır. Şekil 4.66'da verilen kromatogramlardan; $1.10^{-3}$– $3.10^{-3}$– $4.10^{-3}$– $5.10^{-3}$ konsantrasyonların, trigliserit türlerinin tümünün tayin edilebilmesi için uygun olmadığı açıkça görülmektedir. $1.10^{-2}$ mg şeklinde hazırlanan numune için; 1-5 µL enjeksiyon şeklinde yapılan analizlerde ise, trigliserit türlerinin tayini için istenilen düzeyde sonuçlar alınmıştır. Sonuç olarak; $1.10^{-2}$ mg yağ/µL konsantrasyonda hazırlanan yağ numunesi ile 5 µL şeklinde yapılan enjeksiyonlarda; numunelerin trigliserit türlerine ayrımının sağlanabildiği tespit edilmiştir. Belirtilen numune miktarı ile devam edilecek $3^{rd}$-D ayrım analizlerinin; trigliserit türlerinin ayrımı ve tayini için daha uygun bir yaklaşım olacağı kanaatine varılmıştır.

- **<u>Sıcaklık etkisi</u>.**

Sıcaklık etkisinin incelendiği deneylerde; ChromSpher 5 Lipids (5µm, 250x4.6 mm) $3^{rd}$-D HPLC kolonu kullanılarak, 0.01 mg yağ/µL şeklinde hazırlanan soya yağı numuneleri ile 20°C; 30°C ve 40°C'de analizler gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kromatogramlar, karşılaştırmalı olarak Şekil 4.67'da verilmiştir.

Şekil 4.67'de yer alan kromatogramlar incelendiğinde; sıcaklık değeri arttıkça, trigliserit yapılara ait alıkonma süresi, *Rs* ve *k'* değerlerinin azaldığı görülmektedir. Bununla birlikte, sıcaklık artışı ile daha polar özellikteki trigliserit türlerinin tayinlerinin iyileştirilebildiği gözlemlenmiştir. Bu durumun; $Ag^{+}$-HPLC kolonda ayrımlar esnasında meydana gelen kompleks oluşum mekanizmasının iyileştirilmesi ile doğrudan bağlantılı olmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür.




**Şekil 4. 67.** $Ag^{+}$-HPLC tekniği III. boyut ayrım analizleri üzerine sıcaklık etkisinin, rafine soya yağı numuneleri kullanılarak incelendiği analizlerden elde edilen kromatogramlar

| | |
|---|---|
| Numune çözücüsü: | Hekzan |
| Numune enjeksiyonu: | 5 µL ($1.10^{-2}$ mg yağ/ µL çözücü) (Otomatik enjeksiyon) |
| 3rd-D HPLC kolon: | ChromSpher 5 Lipids kolon (5µm 250 x 4.6 mm) |
| Akış hızı: | 1.0 mL/dk |
| Sıcaklık: | **---20 --30 ---40°C** |
| ELSD programı: | Neb. sıcaklığı 80°C, Buh.sıcaklığı 40 °C, Azot gazı akış 1 SLM |

* Şekil. 3.8.'de yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.9.'da yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

Yürütülen çalışmalarda; kullanılan kolonun yapısını bozucu etki gösterebilecek ve kullanma talimatına uygun olmayan daha yüksek sıcaklık uygulamalarına geçilmemiştir. En yüksek 40°C uygulaması yapılan analizlerden; 30°C'de kaydedilen kromatogramdan (Şekil 4.67), lipit türlerinin başarılı bir şekilde tayin edilebileceği görülmektedir. Sonuç olarak; kolondan daha geç elue edilen trigliserit türlerinin, istenilen düzeyde kromatografi pik şekline ve Rs değerine sahip olabilmeleri için 30°C uygulamasının daha uygun bir yaklaşım olacağı kanaatine varılmıştır.

$Ag^{+}$-HPLC tekniği ile trigliserit tayini için daha kapsamlı gerçekleştirilen optimizasyon çalışmalarında; 5 farklı seviye değeri için 3 farklı deneysel parametrenin faktörün; *hareketli faz akış hızı*, *sıcaklık* ve *numune miktarı* etkisi incelenmeye çalışılmıştır. Merkezi kompozit tasarım deneyleri için uygulanan prosedürler kısaca özetlenecek olursa;

– Yapılan ön-deneler neticesinde, Ag+-HPLC tekniği ile trigliserit tayini üzerinde etkili olan bağımsız değişkenler belirlenmiştir. Deneysel tasarımda; 5 farklı seviye değeri için, 3 önemli faktörün; *hareketli faz akış hızı*, *sıcaklık* ve *numune miktarı* etkisi

incelenmiştir. Belirtilen faktörler (*Xi*) için; seviye değerlerini temsil etmek üzere; belirli limit değerleri verilmiştir. Hareketli faz akış hızı ($X_1$) için; 0.58 mL.dk$^{-1}$ ≤ $X_1$ ≤ 1.42 mL.dk$^{-1}$, sıcaklık ($X_2$) için; 16.6°C ≤ $X_2$ ≤ 33.4°C ve numune miktarı ($X_3$) için; 0,8.10$^{-2}$ mg ≤ $X_3$ ≤ 9,2.10$^{-2}$ mg değerleri sınır değerler olarak belirlenmiştir.

− Deneysel tasarım tablosunda, hareketli faz akış hızı, sıcaklık ve numune miktarı faktörleri için 5 farklı seviye değeri belirlenmiştir (-1,68; -1; 0; +1; +1,68)

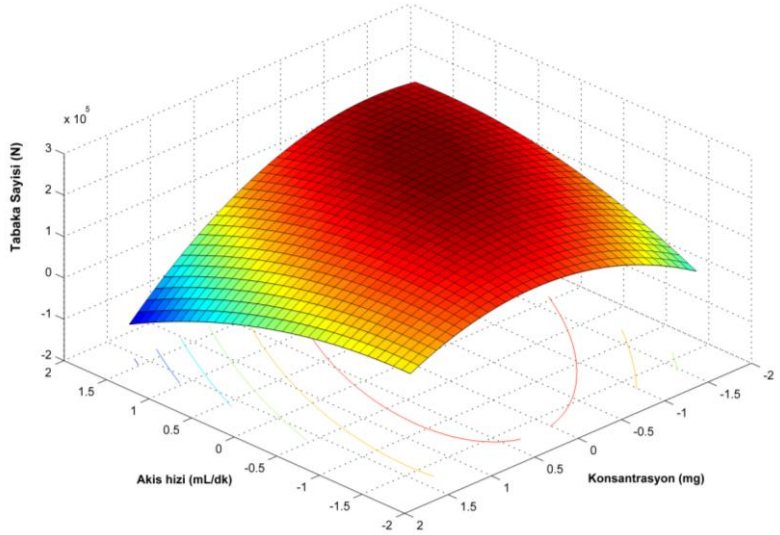
− Merkezi kompozit deneysel tasarım tablosuna ait kod değerleri yardımıyla, Çizelge 3.10 oluşturulmuştur. Deneyler için tanımlanan kod değerleri esas alınarak, 23 deneyin yer aldığı tasarım tablosu tamamlanmıştır.

− Merkezi kompozit deneysel tasarım setinde yer alan 23 farklı deneyin tamamlandıktan sonra; elde edilen analiz verilerinden sistem üzerinde tepki değeri olacak nitelikte bir **'cevap değeri'** oluşturulmuştur. Çalışmada; kromatografik ayrımların kalitesini belirlemede en önemli parametreler olan ***Rs, α, k'*** ve ***N*** değerleri, cevap değeri olarak tanımlanmıştır.

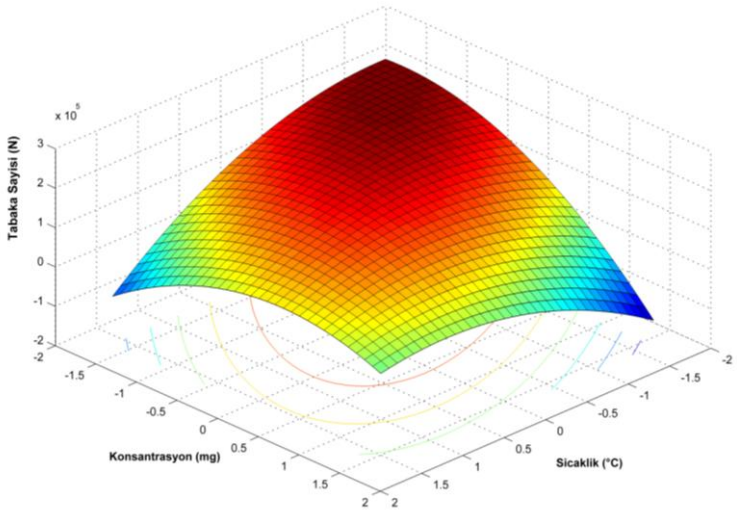
− Önerilen modele ait denklemin çıkartılabilmesi için; microsoft office excel (2007) dosyası üzerinde matriks oluşturulmuştur. Bağımsız değişkenlere ait kod değerleri ve cevap değerleri arasında oluşturulan matriks yardımıyla; denklemlere ait katsayı değerleri ($\beta_0$, $\beta_1$, $\beta_2$, ...gibi) elde edilmiştir. Katsayı değerlerinin belirtilen denklemde yerine koyulmasıyla birlikte, etki değerleri karşılaştırılacak faktörlere ait denklemler oluşturulmuş ve y cevap değerleri elde edilmiştir.

$$y = \beta_0 + \beta_1.X_1 + \beta_2.X_2 + \beta_3.X_3 + \beta_{11}.X_1^2 + \beta_{22}.X_2^2 + \beta_{33}.X_3^2 + \beta_{12}.X_1.X_2 + \beta_{13}.X_1.X_3 + \beta_{23}.X_2.X_3 + \beta_{123}.X_1.X_2.X_3 \quad (4.7.)$$

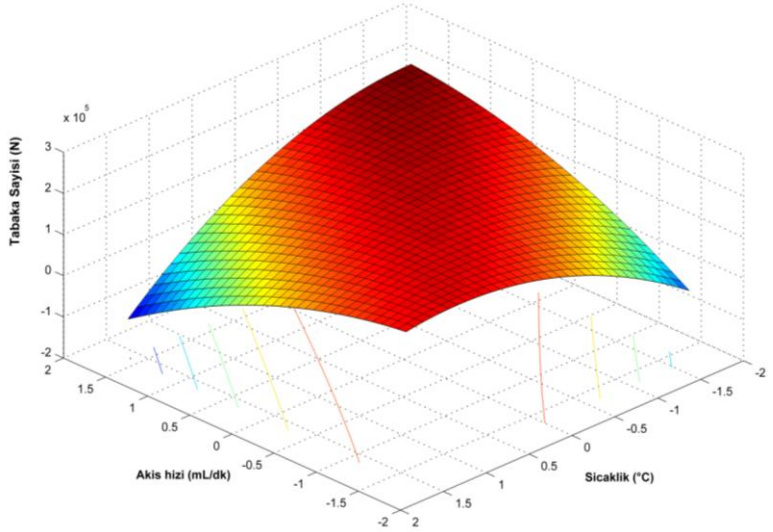
− Son aşamada ise; deneysel tasarım sonucu elde edilen verilerin, görsel olarak grafikler ile modellenmesi yapılmıştır. MATLAB R2007b (MathWorks, United States) yazılım programına, elde edilen denklemler işlenmiş ve üç boyutlu (3B) yüzey grafikleri oluşturulmuştur. Örnek olması bakımından; N değerleri cevap değeri olarak alınarak MATLAB programı ile oluşturulan 3B-yüzey grafikleri, Şekil 4.68'de verilmiştir.




**Akış hızı & Konsantrasyon**




**Sıcaklık & Konsantrasyon**




**Akış hızı & Sıcaklık**

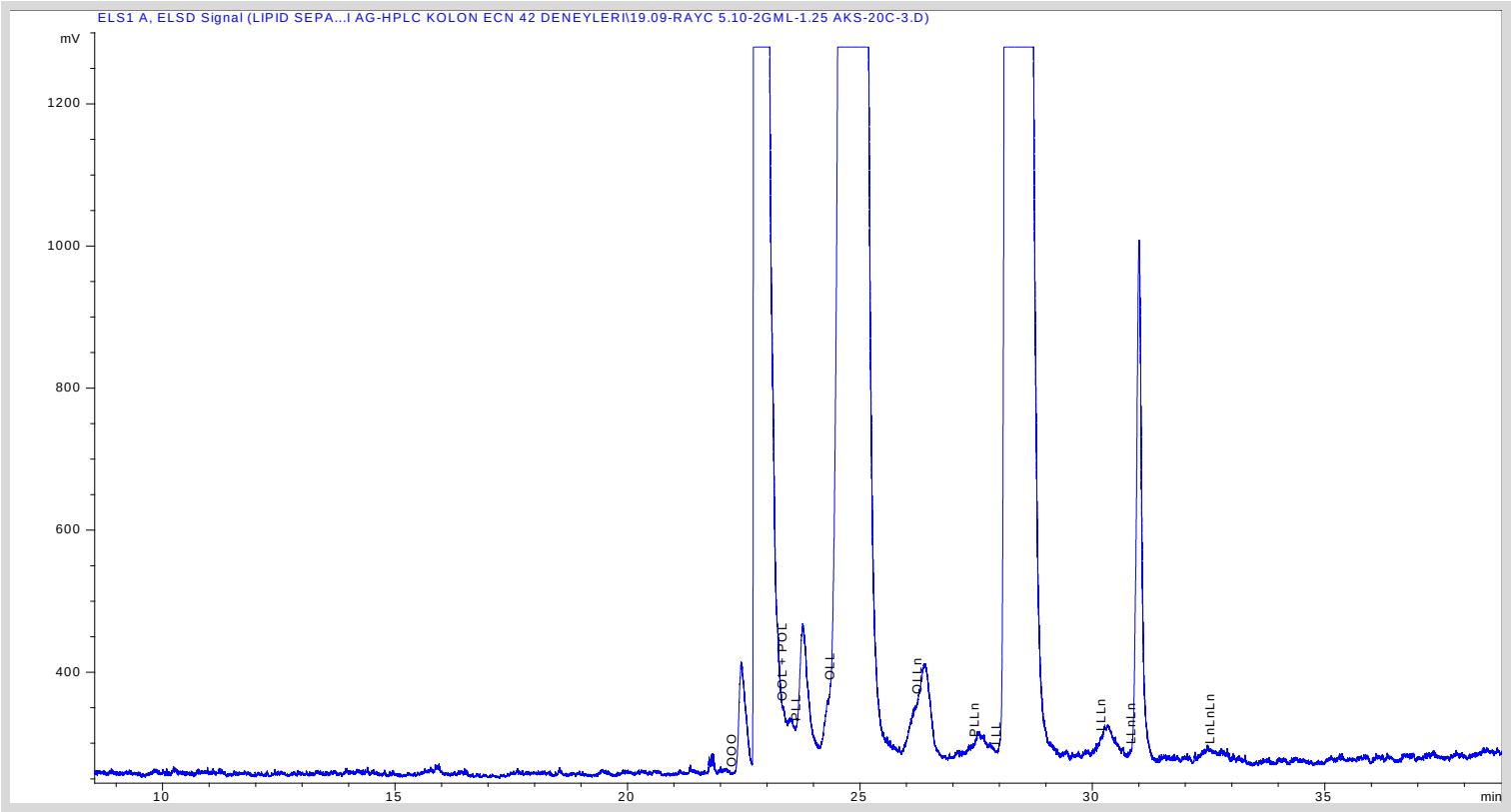
**Şekil 4. 68.** $Ag^{+}$-HPLC tekniği ile trigliserit tayin yöntemi optimizasyonu için uygulanan deneysel tasarım çalışmasına ait 3-B yüzey grafikleri
**Cevap değeri Tabaka Sayısı (N)**

Deney verilerinin tümü kullanılarak; etkisi incelenen faktörlerin farklı eksenleri temsil ettiği 3B-yüzey grafikleri elde edilmiştir. Deney datalarının tümünü temsil eden bu grafikler; optimum deney parametrelerine karar vermede daha doğru bir yaklaşım sunmaktadır. Daha önceki kısımlarda da belirtildiği üzere; grafikler üzerinde kırmızı renk yoğunluğu olan bölgeler uygun değerleri; mavi renk yoğunluğu olan bölgeler ise uygun olmayan deneysel parametreleri temsil etmektedir. Kırmızı renk yoğunluğunun fazla olduğu 3B-yüzey grafikleri, optimum deneysel parametrelere karar verme açısından daha doğru bir yaklaşım sunmaktadır. Farklı akış hızları (*0.58, 0.75, 1.00, 1.25* ve *1.42 mL/dk*) ve sıcaklık (*16.6, 20.0, 25.0, 30.0, 33.4°C*) değerlerinin uygunluğunun değerlendirilmesi için oluşturulan grafiklerde; yüksek akış hızı ve düşük sıcaklık değerlerinin uygulandığı deneysel yöntemlerin uygun olduğu görülmektedir. Akış hızı ve numune miktarı (konsantrasyon) değerlerinin karşılaştırıldığı grafikde; yüksek akış hızı ve düşük konsantrasyon uygun olduğu görülmektedir. Numune miktarı (konsantrasyon) ve sıcaklık değerlerinin karşılaştırıldığı 3B-yüzey grafiğinde ise, düşük konsantrasyon ve düşük sıcaklık değerlerinin uygunluğu görülmektedir.

Sonuç olarak; trigliserit tayini için $Ag^{+}$-HPLC tekniğinin uygulandığı III. boyut ayrım aşaması analizlerinde; ***1.25 mL/dk akış hızı, 20°C kolon sıcaklığı*** ve ***5.10$^{-2}$ mg/5µL numune miktarının*** optimum değerlere en yakın değerler olduğu kanaatine varılmıştır. Cevap değeri olarak *Rs, α* yada *k'* esas alındığında da benzer sonuçların elde edildiği tespit edilmiştir.

#### 4.1.3.3.2. $Ag^{+}$-HPLC tekniğinin uygulandığı trigliserit analizleri için optimum şartlarda gerçekleştirilen analizler

$Ag^{+}$-HPLC tekniğinin uygulandığı III. boyut ($3^{rd}$-D) ayrım analizleri için belirlenen optimum şartlarda farklı bitkisel yağ numuneleri için tayinler gerçekleştirilmiş ve elde edilen veriler Çizelge 4.32'de sunulmuştur. Şekil 3.8'de yer alan sistem akışı ve belirlenen optimum metot parametreleri ile kullanılarak yürütülen analizlerden elde edilen rafine ayçiçek yağına ait örnek kromatogram, Şekil 4.69'da verilmiştir.




**Şekil 4. 69.** $Ag^{+}$-HPLC tekniğinin uygulandığı III. boyut ayrım analizleri için tespit edilen optimum şartlarda gerçekleştirilen, rafine ayçiçek yağı numunesi analizine ait kromatogram

| | |
|---|---|
| **Numune çözücüsü:** | hekzan |
| **Numune enjeksiyonu:** | 5 µL (0.01mg yağ/µL çözücü) |
| **1st-D SPE kolon:** | ChromSpher 5 Lipids kolon (5µm 250 x 4.6 mm) |
| **Akış hızı:** | 1.25 mL/dk |
| **Sıcaklık:** | 20°C |
| **ELSD programı:** | Neb. sıcaklığı 80°C, Buh.sıcaklığı 40°C, Azot gazı akış 1.5 SLM |

* Şekil. 3.8.'de yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.9.'da yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

**Çizelge 4. 32.** Farklı bitkisel yağ numuneleri için Ag+-HPLC tekniği ile gerçekleştirilen trigliserit tayini sonuçları

| Farklı bitkisel yağ numuneleri için $Ag^{+}$-HPLC tekniği ile gerçekleştirilen trigliserit tayin sonuçları, % | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Trigliserit yapıları** | **R. Ayçiçek yağı** | **R. Mısır yağı** | **R. Kanola yağı** | **R. Soya yağı** | **R. Zeytinyağı** |
| **OOO** | 5.47 ±0,17 | 4.69 ±0,19 | 25.104 ±0,34 | 3.607 ±0,10 | 48.146 ±0,25 |
| **OOL + POL** | 25.67 ±0,24 | 24.43 ±0,31 | 29.211 ±0,22 | 22.901 ±0,33 | 29.463 ±0,19 |
| **PLL** | 8.55 ±0,22 | 14.50 ±0,34 | 5.476 ±0,03 | 15.416 ±0,14 | 1.566 ±0,02 |
| **OLL** | 30.46 ±0,32 | 22.49 ±0,27 | 13.141 ±0,31 | 16.035 ±0,13 | 0.434 ±0,003 |
| **OLLn** | 0.11 ±0,002 | 2.04 ±0,14 | 5.049 ±0,11 | 4.269 ±0,09 | 0.107 ±0,002 |
| **PLLn** | 0.01 ±0,001 | 0.56 ±0,010 | 0.798 ±0,03 | 2.796 ±0,01 | 0.129 ±0,001 |
| **LLL** | 21.62 ±0,28 | 19.63 ±0,18 | 6.103 ±0,22 | 16.465 ±0,22 | 0.247 ±0,02 |
| **LLLn** | 0.11 ±0,006 | 1.25 ±0,002 | 3.01 ±0,10 | 7.122 ±0,06 | 0.061 ±0,001 |
| **LLnLn** | 0.07 ±0,001 | 0.12 ±0,001 | 0.937 ±0,03 | 1.047 ±0,01 | 0.119 ±0,003 |
| **LnLnLn** | 0.13 ±0,002 | 0.19 ±0,001 | 0.145 ±0,02 | 1.376 ±0,02 | 0.007 ±0,001 |

* P; palmitik asit, St; stearik asit, O;oleik asit, L;linoleik asit, Ln; linolenik asit

$Ag^{+}$-HPLC ve standart AOCS Ce 5b-89 metodu ile gerçekleştirilen trigliserit analiz sonuçlarından elde edilen veriler kullanılarak, t-testi uygulaması yapılmıştır. Gerçekleştirilen t-testi uygulaması; iki farklı yöntemin verdiği sonuçların ***farklı yağ asiti kombinasyonlarının analizinde*** ve ***farklı yağlarda*** anlamlı olarak farklı olup olmadığına yönelik veri çifti analizidir.

| **Farklar (d)** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **TG yapısı (*)** | **Ayçiçek yağı** | **Mısır yağı** | **Kanola yağı** | **Soya yağı** | **Zeytinyağı** |
| **OOO** | -0.073 | 0.023 | 0.695 | 0.442 | 5.845 |
| **PLL** | -0.505 | -0.222 | -0.122 | -0.48 | -0.148 |
| **OLL** | 0.811 | -0.26 | 0.74 | -0.83 | - |
| **OLLn** | -0.012 | 0.1 | 0.022 | -0.158 | |
| **PLLn** | -0.014 | -0.1 | 0.054 | 0.633 | -0.002 |
| **LLL** | -0.781 | 0.574 | 0.108 | 0.069 | -0.01 |
| **LLLn** | -0.015 | -0.08 | 0.675 | -0.203 | -0.005 |
| **LLnLn** | 0.039 | -0.028 | 0.436 | -0.015 | - |

- *iki farklı yöntemin verdiği sonuçların farklı yağ asiti kombinasyonlarının analizinde anlamlı olarak farklı olup olmadığına yönelik veri çifti analizi*

| d(ortalama) | farkın std sapması | t(deneysel) | t(kritik) p=0,01 | | yorum |
|---|---|---|---|---|---|
| 1.3864 | 2.51 | 1.23 | 4.6 | t(d)<t(k) | anlamlı fark yok |
| -0.2954 | 0.18 | 3.59 | 4.6 | t(d)<t(k) | anlamlı fark yok |
| 0.11525 | 0.80 | 0.29 | 4.6 | t(d)<t(k) | anlamlı fark yok |
| -0.012 | 0.11 | 0.22 | 4.6 | t(d)<t(k) | anlamlı fark yok |
| 0.1142 | 0.30 | 0.87 | 4.6 | t(d)<t(k) | anlamlı fark yok |
| -0.008 | 0.49 | 0.04 | 4.6 | t(d)<t(k) | anlamlı fark yok |
| 0.0744 | 0.34 | 0.48 | 4.6 | t(d)<t(k) | anlamlı fark yok |
| 0.108 | 0.22 | 0.98 | 4.6 | t(d)<t(k) | anlamlı fark yok |

Trigliserit yapılarının tümü için t(d)<t(k) olduğundan, hesaplanan t değeri %99 güven seviyesinde dağılım grafiğinde kabul bölgesine düşmektedir. Bu sebeple; $X_1=X_2$ olduğunu ileri süren $H_0$ hipotezi reddedilemez, yani $Ag^+$-HPLC ve standart AOCS Ce 5b-89 metodu ile gerçekleştirilen trigliserit analizlerinden elde edilen veri gruplarının ortalaması birbirinden anlamlı olarak farklı değildir.

- *iki farklı yöntemin verdiği sonuçların farklı yağlarda anlamlı olarak farklı olup olmadığına yönelik veri çifti analizi*

| d(ortalama) | farkın std sapması | t(deneysel) | t(kritik) p=0,01 | | yorum |
|---|---|---|---|---|---|
| -0.07 | 0.46 | 0.42 | 3.5 | t(d)<t(k) | anlamlı fark yok |
| 0.00 | 0.26 | 0.01 | 3.5 | t(d)<t(k) | anlamlı fark yok |
| 0.33 | 0.35 | 2.64 | 3.5 | t(d)<t(k) | anlamlı fark yok |
| -0.07 | 0.47 | 0.41 | 3.5 | t(d)<t(k) | anlamlı fark yok |
| 1.14 | 2.63 | 0.96 | 3.5 | t(d)<t(k) | anlamlı fark yok |

Ayçiçek, mısır, kanola, soya ve zeytin yağlarının tümü için t(d)<t(k) olduğundan, hesaplanan t değeri %99 güven seviyesinde dağılım grafiğinde kabul bölgesine düşmektedir. Bu sebeple; $X_1=X_2$ olduğunu ileri süren $H_0$ hipotezi reddedilemez, yani $Ag^+$-HPLC ve standart AOCS Ce 5b-89 metodu ile gerçekleştirilen trigliserit analizlerinden elde edilen veri gruplarının ortalaması birbirinden anlamlı olarak farklı değildir.

### 4.1.4. SPE ve NP-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı I. ve II. boyut ayrım ($1^{st}$-D & $2^{nd}$-D) analizleri

On-line SPE-FIA-HPLC birleştirilmiş yağ analiz sisteminin tamamen işler hale gelebilmesi için, sistem üzerinde her aşamaya özgü farklı akış yolları ve metot parametreleri belirlenmiş, ardından sırasıyla;

- SPE ve NP-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı I. ve II. boyut ayrım ($1^{st}$-D & $2^{nd}$-D) analizleri
- NP-HPLC, FIA ve $Ag^{+}$-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı II. ve III. boyut ayrım ($2^{nd}$-D & $3^{rd}$-D) analizleri ve
- SPE, NP-HPLC, FIA ve $Ag^{+}$-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı I., II. ve III. boyut ayrım ($1^{st}$-D & $2^{nd}$-D & $3^{rd}$-D) analizleri şeklinde uygulamalar yapılarak, birleştirilmiş analiz sistemi/yöntemi uygulamalarına geçilmiştir.

İlk birleştirilmiş sistem uygulaması olan; SPE ve NP-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı I. ve II. boyut ayrım analizleri, kullanılan softwarede yapılan özel bir programlama yardımıyla tek bir metot şeklinde yürütülmüştür. Oluşturulan program; I. boyut ayrım aşamasında SPE kolonda toplu bir pik halinde ayrılan nötral lipit fraksiyonun $2^{nd}$-D HPLC kolona yönlendirilmesini, daha sonra bu fraksiyonun içerisindeki mevcut lipit türlerine (*trigliserit, tokol, FFA, sterol, digliserit* ve *monogliserit)* fraksiyonlar halinde ayrılarak tayin edilmesini kapsamaktadır.

Şekil.3.9 ve 3.10'da yer alan sistem işleyişi ve Çizelge 3.11 ve 3.12'de yer alan metot parametreleri kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir. Şekil.3.9'da yer alan sistem işleyişinden görüleceği üzere; yağ numuneleri, gradient pompa **(I)** ve otomatik enjektör **(II)** vasıtasıyla sisteme enjekte edilmiştir. Enjeksiyon işleminin ardından termostatlı kolon fırınından geçen numune, seçilen uygun pozisyon ile yönlendirme valf-I (6PT/2PS) **(III)** üzerine adapte edilen silika yada diol yapılı SPE kolona **(IV)** gönderilmiştir. ***%100 nötral A***, ***%100 nötral B*** yada ***nötral gradient başlangıç çözücüsü*** kullanılarak, gradient program başlatılmış ve türlerinin SPE kolon **(IV)** üzerinde I. boyut ayrımı sağlanmıştır. Bu işlem ile yağ numunesindeki nötral lipit fraksiyonun, II. boyut ayrım aşaması öncesinde polar lipitlerden tamamen izole edilerek ayrımı sağlanmıştır. SPE kolon **(IV)** üzerinde izole edilen ilk fraksiyon yani nötral lipit fraksiyonu, $2^{nd}$-D HPLC kolonuna **(VIII)** ulaştığı anda valf-I (6PT/2PS) **(III)** ve valf-II (6PT/2PS) **(V)** sistemlerinin pozisyonu değiştirilmiştir. Böylece, nötral lipit fraksiyonun

devam eden akışla birlikte, II. boyut ayrım analizlerinin gerçekleştirildiği $2^{nd}$-D HPLC kolonuna **(VIII)** ulaşmışması sağlanmıştır. Nötral lipit fraksiyonun, mevcut lipit türlerine (*trigliserit, tokoferol, tokotrienol, FFA, sterol, digliserit, monogliseritlere*) ayrımı için, silika yada diol yapılı $2^{nd}$-D HPLC kolona **(VIII)** ulaşmasıyla birlikte; II. boyut ayrım aşamasına tamamen geçiş sağlanmıştır. Gradient pompa **(I)** üzerinde oluşturulan nötral lipit hareketli faz gradient programı ile, nötral lipit A ve B çözücüleri sisteme gönderilmiş ve $2^{nd}$-D HPLC kolonu **(VIII)** üzerinde bu fraksiyondaki türlerin ayrımı sağlanmıştır. II. boyut ayrım aşamasında elde edilen veriler/kromatogramlar; I. boyut ayrımda olduğu gibi ELSD dedektörde **(VII)** yada RI dedektörde **(XV)** gözlenmiştir.

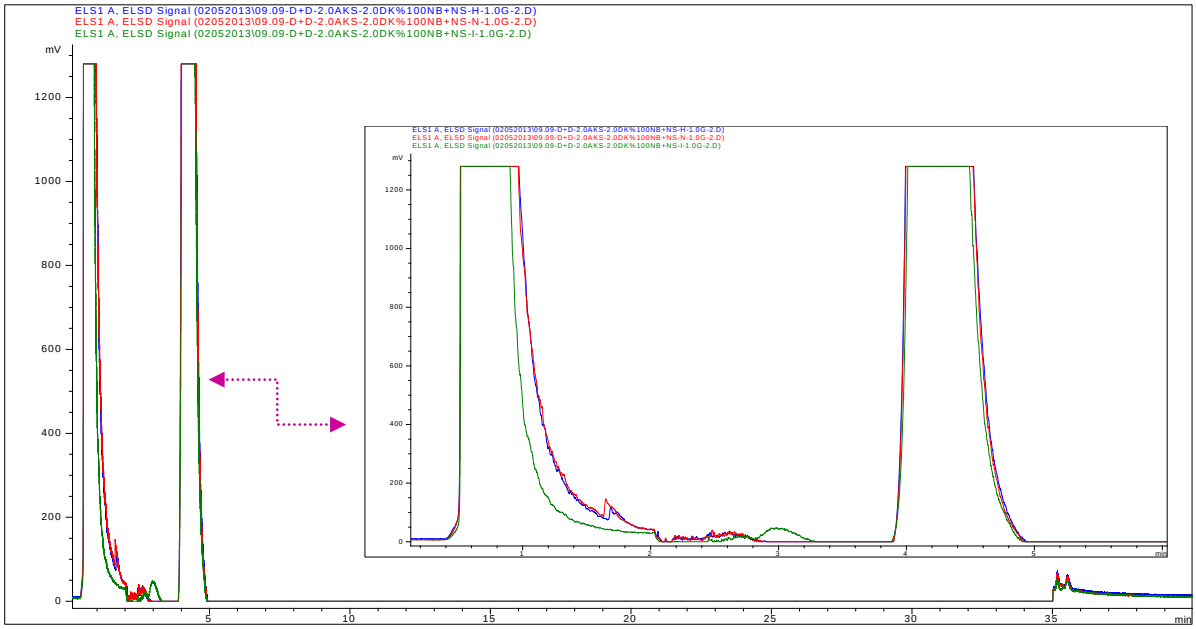
SPE ve NP-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı I. ve II. boyut ayrım analizleri için; daha önceki aşamalarda optimize edilen deneysel parametreler uygulanmıştır. Sistem işleyişinin değişmesiyle birlikte, birleştirilmiş sistem uygulamalarında gerekli görülen kısımlar için tekrar optimizasyon uygulamalarına gereksinim duyulmuştur. Analizler için optimize edilen başlıca deneysel parametreler;

- Numune çözücü sistemi
- Akış hızı
- Valf sistemi pozisyonlarının değiştirilme sürelerine ilişkin programlama
- Azot gazı akış hızı ve
- Sabit ve harekeli faz türü şeklindedir.

#### 4.1.4.1. Numune çözücü türü etkisi

SPE ve NP-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı I. ve II. boyut ayrım analizlerinde; diol yapılı SPE ve diol yapılı HPLC kolonları üzerinde ham ayçiçek yağı numuneleri kullanılarak numune çözücü sistemlerinin etkisine dair bazı analizler yürütülmüştür. Devam eden hareketli faz akış sistemine enjekte edilen numune ve kullanılan çözücü sistemleri, kromatografik ayrım verimliliği bakımından önem arz etmektedir. I. ve II. boyut ayrım aşamaları için elde edilen sonuçların birleştirilerek uygulandığı bu aşamada; numune çözücü sistemlerinin etkilerinin tekrar incelenmesinin uygun olacağı düşünülmüştür. Bu amaç doğrultusunda yürütülen analizlerde; *hekzan, izopropanol ve nötral lipit çözücü sistemi* [hekzan:HAc; (99:1.0, v/v)] ile hazırlanan yağ

numuneleri kullanılmıştır. Numune çözücü türünün etkisinin incelendiği deneylerden elde edilen kromatogramlar, karşılaştırmalı olarak Şekil 4.70'de verilmiştir.




**Şekil 4. 70.** I. ve II. boyut ayrım analizleri üzerine numune çözücü sistemi etkisinin, ham ayçiçek yağı numuneleri kullanılarak incelendiği analizlerden elde edilen kromatogramlar

| | |
|---|---|
| Numune çözücüsü: | **Hekzan / Nötral çözücü sistemi [hekzan:asetik asit,99:1,V/V] / İzopropanol** |
| Numune enjeksiyonu: | 5 µL (0.1mg yağ/ µL çözücü) (Otomatik enjeksiyon) |
| 1st-D SPE kolon: | LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm) |
| 2nd-D HPLC kolonu: | LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm)+(5µm 250x4.6mm) |
| Akış hızı**:** | 2 mL/dk |
| Sıcaklık: | 40°C |
| ELSD programı: | Nebülizasyon sıcaklığı 40°C, Buharlaştırma sıcaklığı 80°C |

**— 2 mL/dk akis hizi 2.0 dk valf - 1.0 SLM- Numune HEGZAN da hazirlandi**

**— 2 mL/dk akis hizi 2.0 dk valf - 1.0 SLM- Numune NOTRAL COZUCU SISTEMI nde hazirlandi**

**— 2 mL/dk akis hizi 2.0 dk valf - 1.0 SLM- Numune IZOPROPANOL de hazirlandi**

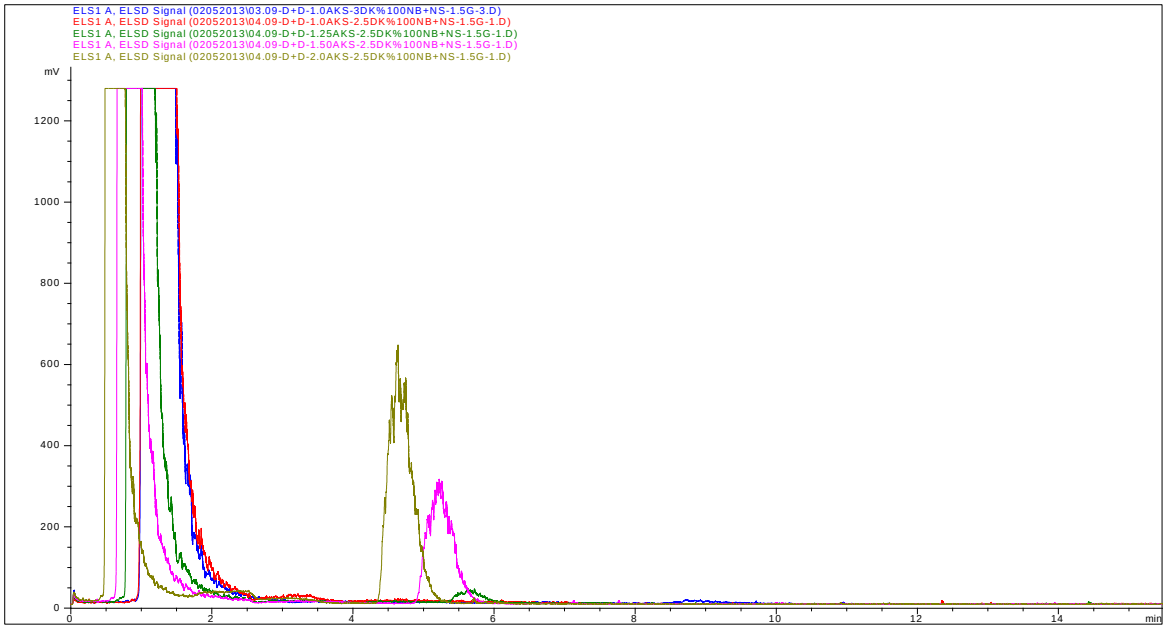
* Şekil. 3.9.'da yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.11.'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

Şekil 4.70'de yer alan ve diol yapıya sahip HPLC kolonu ile gerçekleştirilen analiz sonuçları incelendiğinde; numune çözücüsü oalrak kullanılan izopropanol'ün, ayrımlar üzerinde belirgin bir farklılık oluşturduğu görülmektedir. Bu farklılığın; çözücü sistemlerinde kullanılan çözücülerin elüsyon kuvvetlerindeki farklıktan kaynaklandığı düşünülmektedir. $\epsilon°$ ve $P'$ değerleri daha yüksek olan %100 izopropanol çözücü sistemi; numune içerisindeki türlerin alıkonma süresi ve $k'$ değerlerini azaltmaktadır. Bununla birlikte; II. boyut ayrım aşamasına fraksiyonlar halinde aktarılması hedeflenen türlerin, ayrımlarının zorlaştırmasına neden olmaktadır. Daha düşük $\epsilon°$ ve $P'$ değerlerine sahip nötral çözücü sistemi ve hekzan sisteminde ise; toplu

halde izole edilen nötral lipit fraksiyonun, ayrım düzeyinin iyileştirilmiş olduğu görülmektedir. Sonuç olarak; numune hazırlama prosedüründe, türlerin bir aşamadan diğerine aktarımında farklılık oluşturmayacak, yüksek buharlaşma kabiliyetine ($T_{buharlaşma}$=68.5-69.1°C) sahip, bunun yanında düşük $\epsilon°$ ve $P'$ değerlerine sahip %100 hekzan çözücü sisteminin, bitkisel yağ numunelerinin hazırlanması için daha uygun olacağı kanaatine varılmıştır.

### 4.1.4.2. Akış hızı etkisi

I. ve II. boyut ayrım uygulamasının birleştirildiği çalışmalarda; %100 nötral B çözücü sistemi kullanılarak SPE kolon üzerinden toplu şekilde elue edilen nötral lipit fraksiyonu, uygun çözücü programlaması yardımıyla $2^{nd}$-D HPLC kolona aktarılmaktadır. Nötral lipit frafsiyonun, II. boyut ayrım aşamasına istenilen düzeyde aktarımı için optimizasyonu önemli olan bir diğer parametre, hareketli faz akış hızıdır. Bu amaçla yürütülen çalışmalarda; diol yapılı SPE ve diol yapılı HPLC kolonları üzerinde ham ayçiçek yağı numuneleri kullanılarak; akış hızı etkisine dair bazı analizler yürütülmüştür. 0,1 mg yağ/µL konsantrasyonundaki ham yağı numuneleri kullanılarak, farklı akış hızlarında (1,00; 1,25; 1,50 ve 2,00 mL/dk) gerçekleştirilen analizlere ait kromatogramlar, karşılaştırmalı olarak Şekil 4.71'de verilmiştir.




**Şekil 4. 71.** I. ve II. boyut ayrım analizleri üzerine hareketli faz akış hızı etkisinin ham ayçiçek yağı numuneleri kullanılarak incelendiği analizlerden elde edilen kromatogramlar

Numune çözücüsü: Hekzan

| | |
|---|---|
| Numune enjeksiyonu: | 5 µL (0.1mg yağ/ µL) (Otomatik enjeksiyon) |
| 1st-D SPE kolon: | LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm) |
| 2nd-D HPLC kolonu: | LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm)+(5µm 250x4.6mm) |
| Akış hızı: | **1- 1.25- 1.5** ve **2 mL/dk** |
| Sıcaklık: | 40°C |
| ELSD programı: | Neb sıcaklığı 40°C, Buh sıcaklığı 80 °C, Azot gazı akış 1.5 SLM |

— **1 mL/dk akis hizi 3. dk valf pozisyonu degistirildi**
— **1 mL/dk akis hizi 2.5 dk valf pozisyonu degistirildi**
— **1.25 mL/dk akis hizi 2.5 dk valf pozisyonu degistirildi**
— **1.5 mL/dk akis hizi 2.5 dk valf pozisyonu degistirildi**
— **2 mL/dk akis hizi 2.5 dk valf pozisyonu degistirildi**

* Şekil. 3.9.'da yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.11.'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

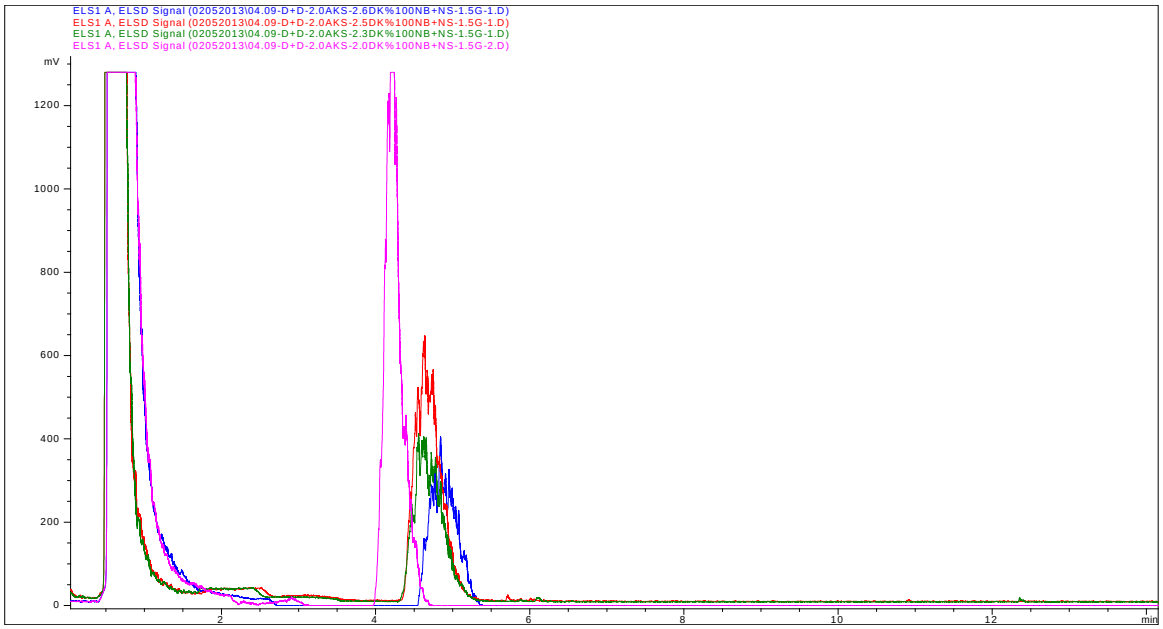
I. boyut ayrım aşamasından elue edilen nötral lipit fraksiyonun, II. boyut ayrım aşamasına aktarımı ve burada mevcut lipit türlerine ayrım davranışları üzerine, hareketli faz akış hızının etkisini incelemek amacıyla çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.71'de yer alan kromatogramlar incelendiğinde; nötral lipit fraksiyonun aktarımında hareketli faz akış hızının, belirgin derecede farklılık meydana getirdiği görülmüştür. Nötral lipit fraksiyonun; akış hızının artmasıyla birlikte *k'* ve alıkonma süresi değerinde belirgin bir azalma meydana gelmektedir. ayrıca akış hızındaki artış, nötral lipit fraksiyonun, $2^{nd}$-D HPLC kolona aktarımını belirgin derecede iyileştirmiştir. 1,00 ve 1,25 mL/dk akış hızlarında herhangi bir aktarım sağlanamazken, yüksek akış hızlarına doğru uygulama yapıldıkça bu durumun iyileştirilebildiği tespit edilmiştir. Bu nedenle; valf-I (6PT/2PS) için yapılan 2 dakika valf çevrim programlaması ile, 2,00 mL/dk maksimum akış hızında en verimli aktarımın sağlanabildiği ve akış hızı ile çalışmalara devam edilmesinin uygun olduğu kanaatine varılmıştır.

### 4.1.4.3. Valf pozisyonlarının değiştirilme sürelerinin etkisi

Valf sistemleri; analiz esnasında akışa istenilen yönün verilmesini sağlaması, ayrımlardan elde edilen fraksiyonların toplanması, fraksiyonların diğer boyut ayrım için enjeksiyonu ve tek sistem üzerinde birden fazla kolonun eş zamanlı kullanımı sağlaması bakımından; birleştirilmiş sistem analizleri için önem arz eden sistem elemanlarıdır. Valf sistemleri, klasik ayrımların gerçekleştirildiği analiz sistemlerinin modifiye edilerek, çok boyutlu/ birleştirilmiş analiz sistemlerine dönüştürülmelerinde kullanılan sistem elemanlarıdır.

Önerilen analiz sisteminde, ilk birleştirilmiş analiz uygulaması olan bu aşama ile; valf-I (6PT/2PS) ve valf-II (6PT/2PS) sistemlerinin programlaması üzerine bazı

çalışmalar yürütülmüştür. Yürütülen çalışmalarda; bir önceki aşamada optimum kabul edilen 2 mL/dk akış hızında; valf-I (6PT/2PS) ve valf-II (6PT/2PS) sistemlerinin 2,0; 2,3; 2,5 ve 2,6 dakikalık sürelerde pozisyonları değiştirilerek, değiştirilme sürelerinin etkisi değerlendirilmeye çalışılmıştır (Şekil 4.72).




**Şekil 4. 72.** I. ve II. boyut ayrım analizleri üzerine valf sistemi pozisyonlarının değiştirilme sürelerinin etkisinin ham ayçiçek yağı numuneleri kullanılarak incelendiği analizlerden elde edilen kromatogramlar

| | |
|---|---|
| Numune çözücüsü: | Hekzan |
| Numune enjeksiyonu: | 5 µL (0.1 mg yağ/µL) (Otomatik enjeksiyon) |
| 1st-D SPE kolon: | LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm) |
| 2nd-D HPLC kolonu: | LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm)+(5µm 250x4.6mm) |
| Akış hızı: | **2 mL/dk** |
| Sıcaklık: | 40°C |
| ELSD programı: | Neb sıcaklığı 40°C, Buh sıcaklığı 80 °C, Azot gazı akış 1.5 SLM |

— **2.6 dk valf pozisyonu degistirildi**
— **2.5 dk valf pozisyonu degistirildi**
— **2.3 dk valf pozisyonu degistirildi**
— **2.0 dk valf pozisyonu degistirildi**

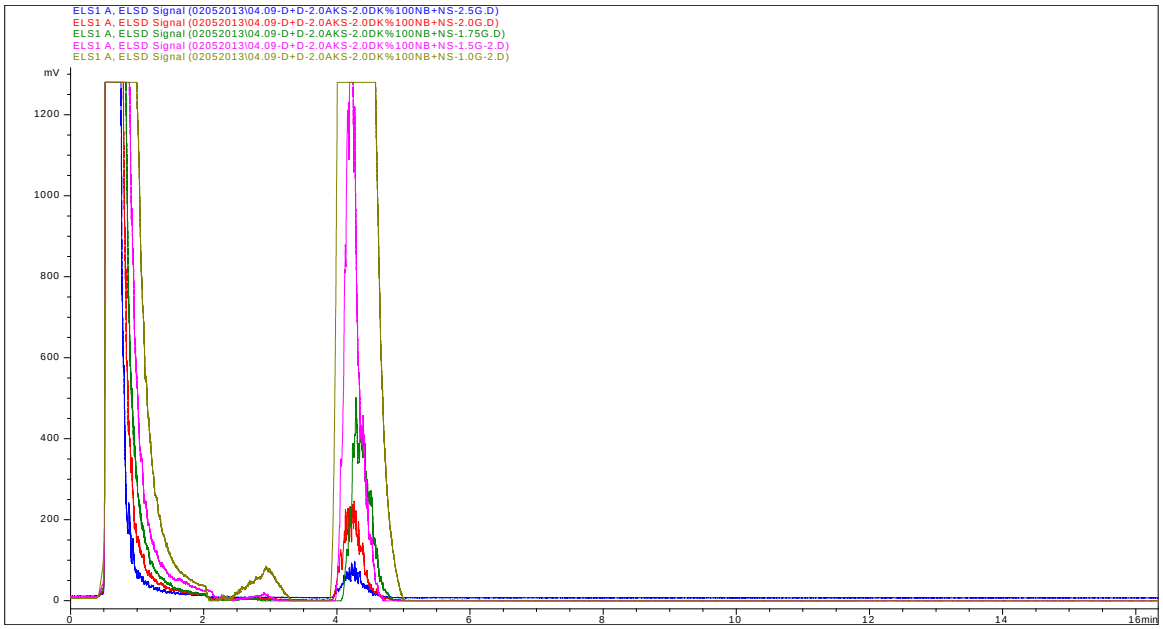
* Şekil. 3.9.'da yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.11.'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

Şekil 4.72'de yer alan kromatogramlar incelendiğinde; valf pozisyonlarının değiştirilme sürelerine ilişkin yapılan programlamanın; nötral lipit fraksiyonun $2^{nd}$-D HPLC kolona aktarımı için önemli dercede etkili olduğu görülmektedir. 2. dakikada valf-I (6PT/2PS) ve valf-II (6PT/2PS) sistemlerinin pozisyonlarının değiştirilmesiyle birlikte; $1^{st}$-D SPE kolondan, $2^{nd}$-D HPLC kolona nötral lipit fraksiyonun aktarım verimliliği belirgin derecede iyileştirilebilmiştir. Fakat, $2^{nd}$-D HPLC kolona aktarılan

nötral lipit fraksiyonun bu aşamada içerisinde mevcut lipit bileşenlerine (*trigliserit, tokol, FFA, sterol, digliserit ve monogliseritler*) ayrımının sağlanamadığı ve bu kolondan da toplu bir şekilde elue edilebildiği görülmüştür. Bu durumun temelde; I. boyut ayrım aşamasında kullanılan %100 nötral lipit hareketli faz B [*hekzan: izopropanol: asetik asit (84:15:1.0, v/v/v)*] sistemi ile, II. boyut ayrım başlangıç aşamasında kullanılan %95 nötral lipit hareketli faz A [*hekzan: asetik asit (99:1.0, v/v/v)*] + %5 nötral lipit hareketli faz B [*hekzan: izopropanol: asetik asit (84:15:1.0, v/v/v)*] sistemi arasında meydana gelen hareketli faz uyumsuzluğundan kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu durumun iyileştirilmesi amacıyla; ileriki aşamalarda ortak hareketli faz sistemlerine doğru geçiş yapılan bazı çalışmaların yapılmasına karar verilmiştir. Sonuç olarak; 2 mL/dk akış hızında yürütülen analizlerde, valf-I (6PT/2PS) ve valf-II (6PT/2PS) sistemleri için 2. dakikada yapılan pozisyon değişikliğinin, türlerin aktarımı için en uygun yaklaşım olacağı kanaatine varılmıştır.

#### 4.1.4.4. Azot gazı akış hızı etkisi

$1^{st}$-D SPE kolondan toplu şekilde elue edilen nötral lipit fraksiyonun, $2^{nd}$-D HPLC kolona aktarılma verimliliğini artırma üzerine yürütülen bir diğer çalışma ise; ELSD dedektör sisteminde kullanılan inert gazın akış hızı ile ilgilidir. ELSD dedektör için ayrıntılı bir şekilde gerçekleştirdiğimiz çalışmalarda; nebülizasyon gazı olarak kullanılan inert gazın, dedeksiyon kalitesi üzerine önemli derecede etki ettiği görülmüştü. Yani kolonda verimli şekilde ayrımı gerçekleştirilen analitler eğer ELSD dedektör sistemine girdiği anda uygun sisleştirilme işlemine tabi tutulmazsa; hem sinyal kalitesi hem de analitlerin yapısında bozulmalar meydana gelmektedir. Yüksek akış hızlarındaki gaz akışı, nebülizasyon (sisleştirme) aşamasında küçük aerosollerin oluşmasına ve sinyal kalitesinin kötüleşmesine neden olmaktadır. Düşük gaz akışlarında ise bu durumun tam tersi yani büyük yapılı aerosoller oluşmakta ve sinyal kalitesi iyileşmektedir. Bu nedenle; I. ve II. boyut ayrım tekniğinin birlikte uygulandığı analizlerde; ELSD sinyali üzerine azot gazı akış hızının etkisi, valf sistemi pozisyonlarının değiştirilme sürelerinin etkisi birlikte incelenmeye çalışılmıştır. Analizler sonucu elde edilen kromatogramlar, karşılaştırmalı olarak Şekil 4.73'de verilmiştir.




**Şekil 4. 73.** I. ve II. boyut ayrım analizleri üzerine azot gazı akış hızı etkisinin ham ayçiçek yağı numuneleri kullanılarak incelendiği analizlerden elde edilen kromatogramlar

| | |
|---|---|
| Numune çözücüsü: | Hekzan |
| Numune enjeksiyonu: | 5 µL (0.1mg yağ/ µL çözücü) (Otomatik enjeksiyon) |
| 1st-D SPE kolon: | LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm) |
| 2nd-D HPLC kolonu: | LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm)+(5µm 250x4.6mm) |
| Akış hızı**:** | **2 mL/dk** |
| Sıcaklık: | 40°C |
| ELSD programı: | Nebülizasyon sıcaklığı 40°C, Buharlaştırma sıcaklığı 80 °C |

— **2 mL/dk akis hizi 2.0 dk valf pozisyonu 2.5 SLM**
— **2 mL/dk akis hizi 2.0 dk valf pozisyonu 2.0 SLM**
— **2 mL/dk akis hizi 2.0 dk valf pozisyonu 1.75 SLM**
— **2 mL/dk akis hizi 2.0 dk valf pozisyonu 1.5 SLM**
— **2 mL/dk akis hizi 2.0 dk valf pozisyonu 1.0 SLM**

* Şekil. 3.9.'da yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.11.'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

Şekil 4.73'de yer alan kromatogramlar incelendiğinde; nebülizasyon (sisleştirme) aşamasında düşük akış hızlarında kullanılan gaz sisteminin, sinyal kalitesini belirgin şekilde iyileştirdiği görülmüştür. 2 mL/dk akış hızında, valf-I (6PT/2PS) ve valf-II (6PT/2PS) sistemleri için 2 dakikada yapılan pozisyon değişikliği ile yürütülen analizlerde, sadece gaz akış hızında yapılan değişikliğin bu derece farklı sonuçların elde edilmesine neden olması; dedektör parametrelerinde yapılacak optimizasyonun önemini bir kez daha göstermiştir. Sonuç olarak; uygulanan akış hızı ve valf pozisyon programlamasında, 1 SLM azot gazı akış hızının en uygun yaklaşımı sunacağı kanaatine varılmıştır.

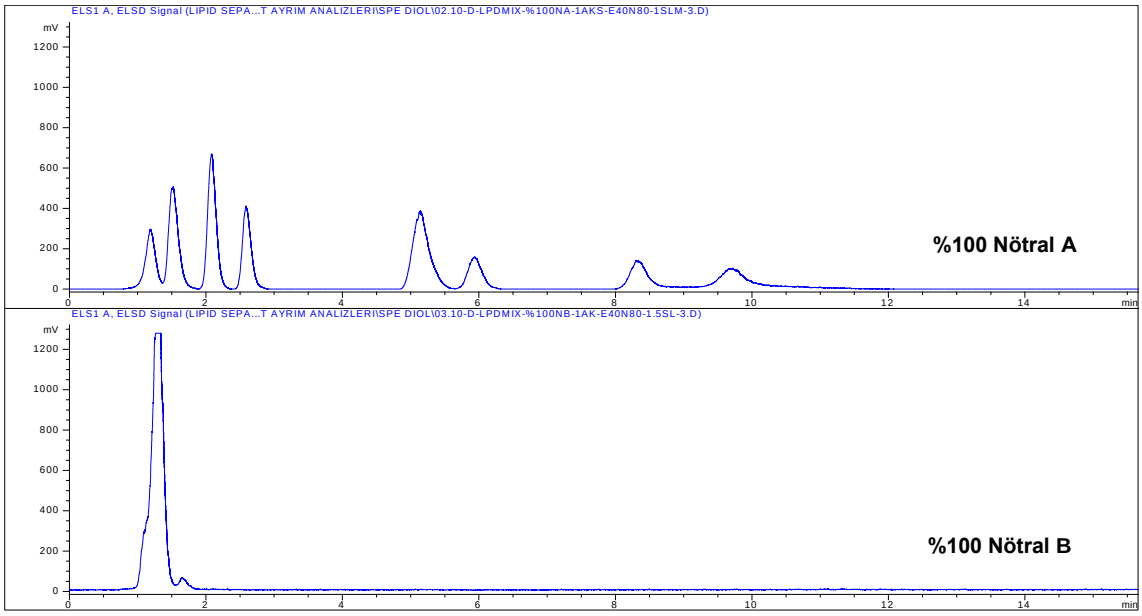
### 4.1.4.5. Sabit ve hareketli faz türü etkisi

SPE ve NP-HPLC tekniklerinin birleştirilerek uygulandığı I. ve II. boyut ayrım analizlerinde; ayrımların istenilen düzeyde gerçekleştirilebilmesi için, her iki fazda kullanılan sabit ve hareketli fazların yapısı ve özellikleri, büyük önem arz etmektedir. I. boyut ayrım aşamasından, II. boyut ayrım aşamasına aktarılacak türlerin; hem sabit faz hemde hareketli faz sistemleri arasındaki değişime kolaylıkla adapte olabilmesi, bu seçimlerin uygun şekilde yapılmasıyla doğrudan ilişkilidir.

Bilindiği üzere; birleştirilmiş çok boyutlu ayırma (MD-HPLC) tekniğinde; farklı sabit faz yapısına sahip kolon sistemleri ardışık bağlanarak yada farklı tür sabit faz dolgu maddeleri aynı kolon içerisine yüklenerek ayrımlar gerçekleştirilmektedir. Kolon geçişli çok boyutlu ayırma (MD-HPLC) tekniğinde ise; en az iki farklı kolon sistemi ve yönlendirme valf sistemleri kullanılarak; ters-faz, iyon değiştirme, boyut eleme gibi farklı sıvı kromatografi şartlarında eş zamanlı tayin yapabilme imkânı bulunmaktadır. I. ve II. boyut ayrım aşamasında meydana gelebilecek farklılıkları kaldırma amacıyla; birleştirilmiş çok boyutlu ayırma (MD-HPLC) tekniği uygulamasının daha doğru bir yaklaşım sunacağı düşünülmüş ve Çizelge 3.12'de yer alan deney aşamaları oluşturulmuştur. Şekil 3.9'da önerilen sistem işleyişi ile; Çizelge 3.12'de yer alan deney aşamaları sırayla uygulanarak değerlendirmeler yapılmıştır. Yürütülen çalışmalarda; I. ve II. boyut ayrım aşamalarında kullanılan sabit faz sistemleri sabit tutulmuş, uygulanan hareketli fazların bileşimlerindeki farklılık irdelenmiştir.

- *%100 nötral lipit A [Hekzan: asetik asit (99:1.0, v/v/v)],*
- *%100 nötral lipit B [Hekzan: izopropanol: asetik asit (84:15:1.0, v/v/v)]* ve
- *Nötral lipit A ve B çözücülerinin kullanılmasıyla oluşturulan gradient sistemin,*

türlerin kromatografik ayrım davranışları üzerine olan etkileri değerlendirilmeye çalışılmıştır. Şekil 3.9'da önerilen sistemin I. II. ve III. aşama işleyişleri kullanılarak yürütülen analizlere ait kromatogramlar, karşılaştırmalı olarak Şekil 4.74, 4.75, 4.76 ve 4.77'de verilmiştir. Analizlerde; lipit türlerinin tümünü içeren karışım ve bitkisel yağ numuneleri kullanılarak değerlendirmeler yapılmaya çalışılmıştır.

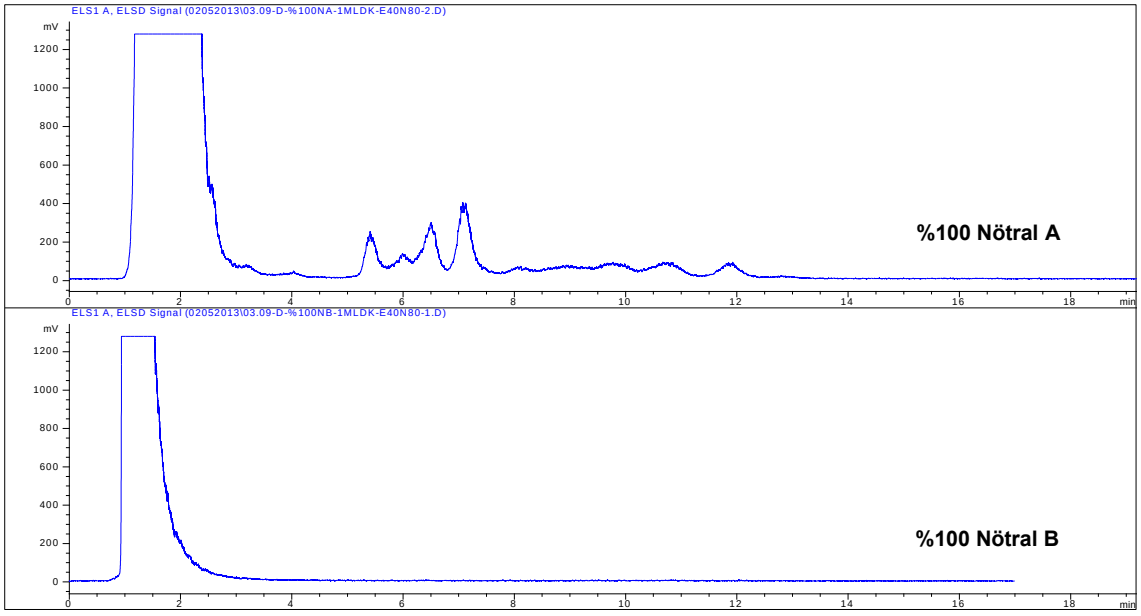



**Şekil 4. 74.** Hareketli faz türünün lipit türlerinin ayrımı üzerine etkisinin, lipit standart maddeleri içeren karışım kullanılarak incelendiği analizlerden elde edilen kromatogramlar

Numune çözücüsü: Hekzan
Numune enjeksiyonu: 5 µL (0.1mg yağ/µL) (Otomatik enjeksiyon)
1st-D SPE kolon: **LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm)**
2nd-D HPLC kolon: **(-)**
Akış hızı**:** 1 mL/dk
Sıcaklık: 40°C
ELSD programı: Neb. sıcaklığı 80°C, Buh. sıcaklığı 40°C, Azot gazı akış 1.5 SLM

— **Hareketli faz: % 100 Nötral A çözücü sistemi / (Hekzan: HAc (99:1.0, v/v/v))**
— **Hareketli faz: % 100 Nötral B çözücü sistemi / (Hekzan: izopropanol: HAc (84:15:1.0, v/v/v))**

***** Şekil. 3.9.'da yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.11.'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

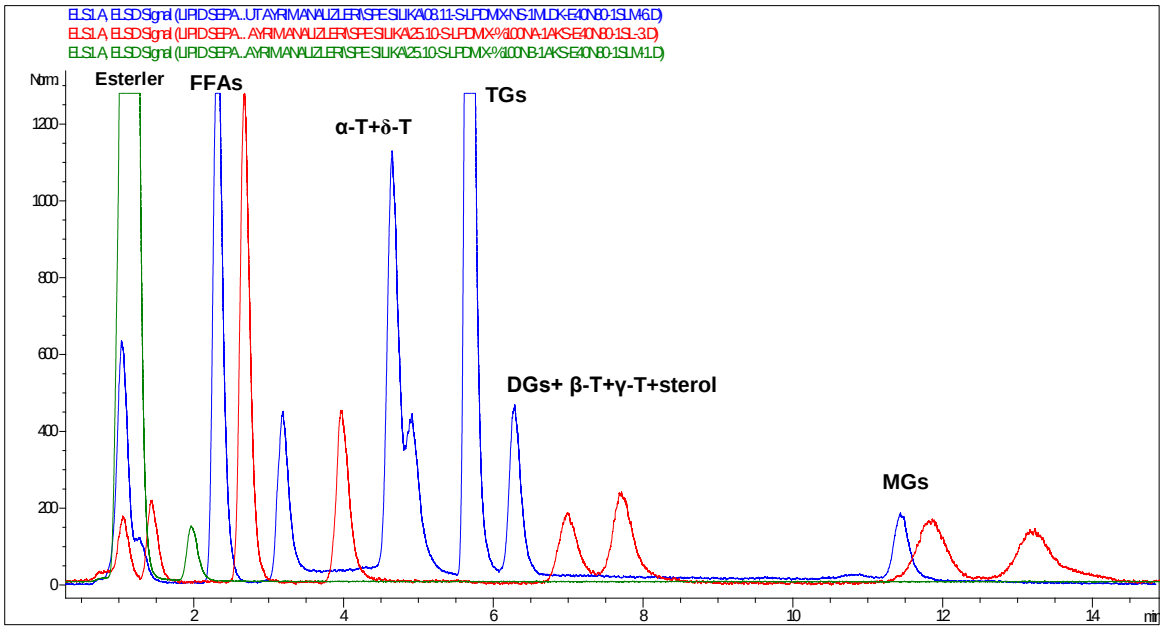



**Şekil 4. 75.** I. boyut ayrım analizleri üzerine hareketli faz türü etkisinin ham ayçiçeği yağı numuneleri kullanılarak incelendiği analizlerden elde edilen kromatogramlar

Numune çözücüsü: Hekzan

| | |
|---|---|
| Numune enjeksiyonu: | 5 µL (0.1mg yağ/µL) (Otomatik enjeksiyon) |
| 1st-D SPE kolon: | **LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm)** |
| 2nd-D HPLC kolon: | **(-)** |
| Akış hızı**:** | 1 mL/dk |
| Sıcaklık: | 40°C |
| ELSD programı: | Neb. sıcaklığı 80°C, Buh. sıcaklığı 40°C, Azot gazı akış 1.5 SLM |

* Şekil. 3.9.'da yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.11.'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

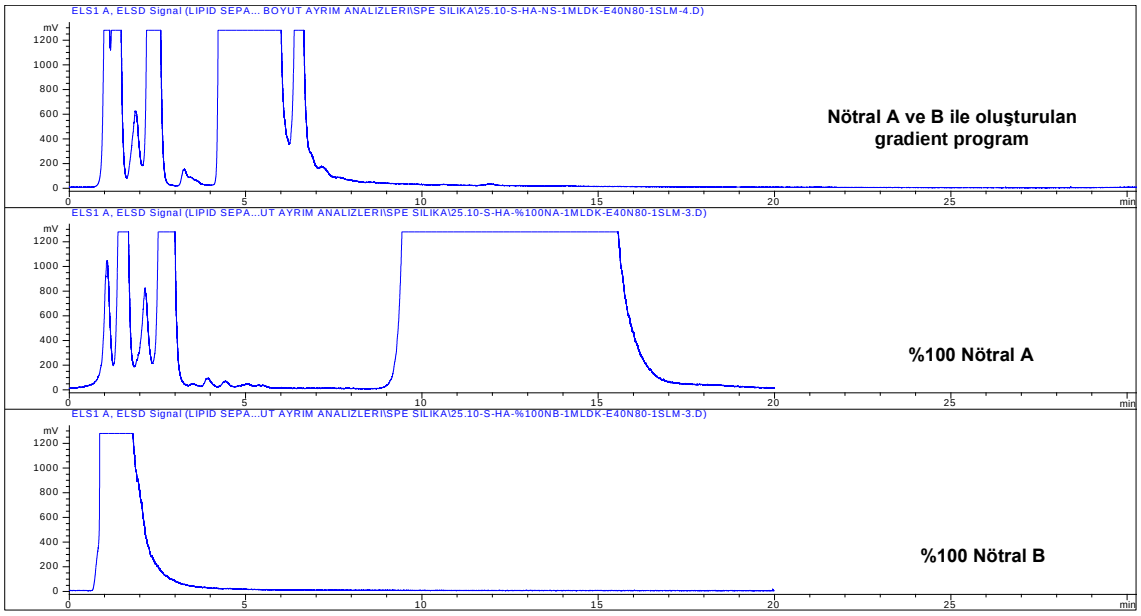



**Şekil 4. 76.** Hareketli faz türünün lipit türlerinin ayrımı üzerine etkisinin, lipit standart maddeleri içeren karışım kullanılarak incelendiği analizlerden elde edilen kromatogramlar

| | |
|---|---|
| Numune konsantrasyonu: | 0,1 µg/µL standart lipid mix. numunesi |
| Numune enjeksiyonu: | 5 µL (Otomatik enjeksiyon) |
| 1st-D SPE kolon: | **Inertsil Sil 100A kolon (5µm 50x4.6mm )** |
| 2nd-D HPLC kolon: | **(-)** |
| Akış hızı: | 1 mL/dk, |
| Sıcaklık: | 40°C |
| ELSD programı: | Neb. sıcaklığı 80°C, Buh. sıcaklığı 40 °C, Azot gazı akış 1 SLM |

- **Hareketli faz: Nötral lipit H.F.S., gradient program**
- **Hareketli faz: % 100 Nötral A çözücü sistemi / (Hekzan: HAc (99:1.0, v/v/v))**
- **Hareketli faz: % 100 Nötral B çözücü sistemi / (Hekzan: izopropanol: HAc (84:15:1.0, v/v/v))**

* Şekil. 3.9.'da yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.11.'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.




**Şekil 4. 77.** I. boyut ayrım analizleri üzerine hareketli faz türü etkisinin ham ayçiçeği yağı numuneleri kullanılarak incelendiği analizlerden elde edilen kromatogramlar

| | |
|---|---|
| Numune çözücüsü: | Hekzan |
| Numune enjeksiyonu: | 5 µL (0.1mg yağ/µL çözücü) (Otomatik enjeksiyon) |
| 1st-D SPE kolon: | **Inertsil Sil 100A kolon (5µm 50x4.6mm)** |
| 2nd-D HPLC kolon: | **(-)** |
| Akış hızı**:** | 1 mL/dk |
| Sıcaklık: | 40°C |
| ELSD programı: | Neb. sıcaklığı 80°C, Buh. sıcaklığı 40°C, Azot gazı akış 1.5 SLM |

— **Hareketli faz: Nötral lipit H.F.S., gradient program**

— **Hareketli faz: % 100 Nötral A çözücü sistemi / (Hekzan: HAc (99:1.0, v/v/v))**

— **Hareketli faz: % 100 Nötral B çözücü sistemi / (Hekzan: izopropanol: HAc (84:15:1.0, v/v/v))**

* Şekil. 3.9.'da yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.11.'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

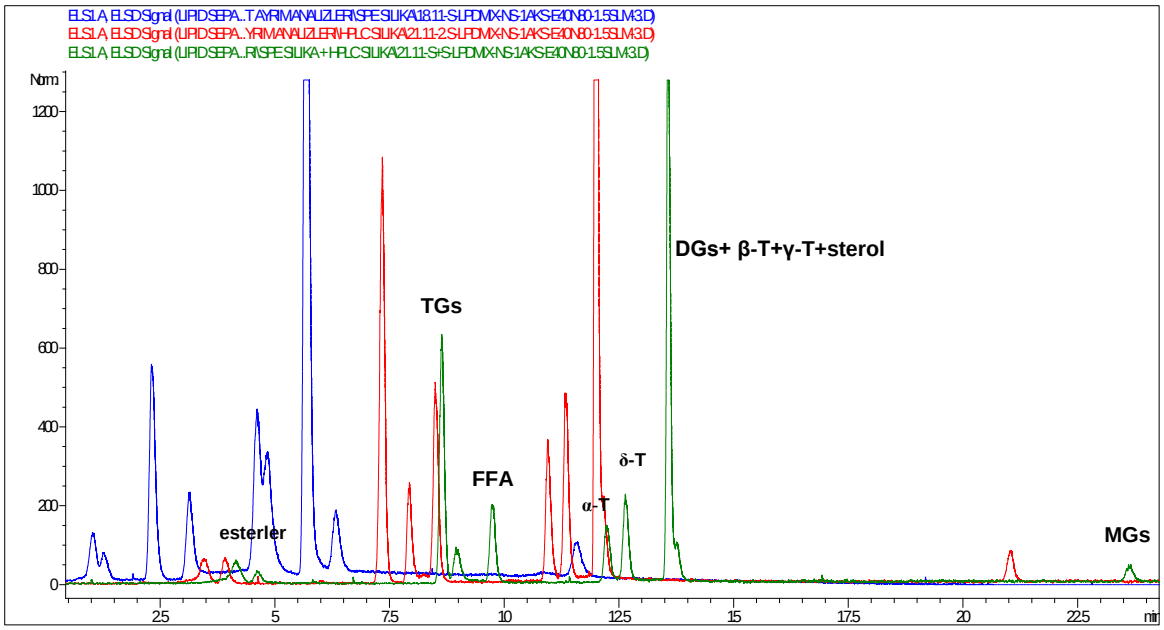
Çalışma sonucu elde edilen kromatogramlardan görüleceği üzere; hem diol hem de silika yapılı 1$^{st}$-D SPE kolon sistemleri kullanılarak, ayrımlar üzerinde hareketli faz sistemlerin oluşturduğu farklılıklar incelenmiştir. Her iki sabit faz yapısında da %100 nötral B [*hekzan: izopropanol: asetik asit (84:15:1.0, v/v/v)*] hareketli faz sisteminin, toplu halde izole edilmesi hedeflenen nötral lipit fraksiyonun ayrımı için daha uygun olacağı kanaatine varılmıştır. %100 nötral lipit A [Hekzan: asetik asit (99:1.0, v/v/v)] ve gradient programda ise; lipit türlerinin alıkonma süresi, *k'* ve *Rs* değerleri bakımından uygun ayrımların sağlanabileceği görülmüştür. 1$^{st}$-D SPE kolon sistemlerinde %100 nötral B sistemini kullanmanın oluşturabileceği dezavantaj; II. boyut ayrım başlangıç aşamasında kullanılan %100 nötral lipit hareketli faz A [*hekzan: asetik asit (99:1.0, v/v/v)*] ile %100 Nötral B arasındaki oluşacak hareketli faz uyumsuzluğudur. Bu nedenle; SPE ve NP-HPLC tekniklerinin birleştirilerek uygulandığı I. ve II. boyut ayrım

analizlerinde, I. boyut ayrım aşamasına *nötral lipit gradient sistem* ile başlanmasının uygun bir yaklaşım olacağı kanaatine varılmıştır.

Çalışmanın ikinci aşamasında yürütülen analizlerde ise; nötral lipit gradient sistem uygulaması hareketli faz sistemi olarak sabit tutularak;

- *1st-D SPE kolon,*
- *2nd-D HPLC kolon* ve
- *1st-D SPE kolon + 2nd-D HPLC kolonun ardışık* olarak kullanıldığı sistem

verimlilikleri incelenmiştir. Şekil 3.10'da önerilen sistemin I. II. ve III. aşama işleyişleri kullanılarak yürütülen analizlere ait kromatogramlar, karşılaştırmalı olarak Şekil 4.78, 4.79, 4.80 ve 4.81'de verilmiştir. Analizlerde; lipit türlerinin tümünü içeren karışım kullanılarak değerlendirmeler yapılmaya çalışılmıştır.

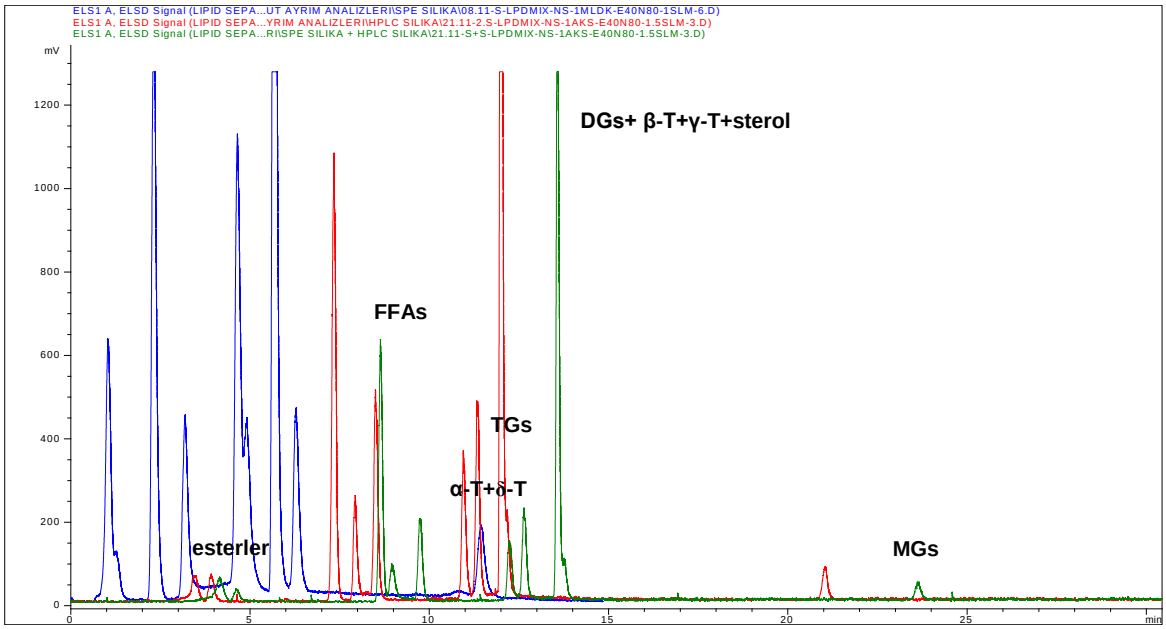



**Şekil 4. 78.** Sabit faz türünün lipit türlerinin ayrımı üzerine etkisinin, lipit standart maddeleri içeren karışım kullanılarak incelendiği analizlerden elde edilen kromatogramlar

| | |
|---|---|
| Numune konsantrasyonu: | 0,1 µg/µL standart lipid mix. |
| Numune Enjeksiyonu: | 5 µL (Otomatik enjeksiyon) |
| Hareketli faz türü: | **Nötral lipit H.F.S., gradient program** |
| Akış hızı: | 1 mL/dk |
| Sıcaklık: | 40°C |
| ELSD programı: | Neb. sıcaklığı 80°C, Buh. sıcaklığı 40 °C, Azot gazı akış 1.5 SLM |

**— LiChrospher 100 Diol 5µm 75x4.6mm analizi (1st-D SPE kolon)**
**— LiChrospher 100 Diol 5µm 250x4.6mm kolon analizi (2nd-D HPLC kolonu)**
**— LiChrospher 100 Diol 5µm 75x4.6mm + LiChrospher 100 Diol 5µm 250x4.6mm kolon analizi (1st-D SPE kolon+ 2nd-D HPLC kolonu)**

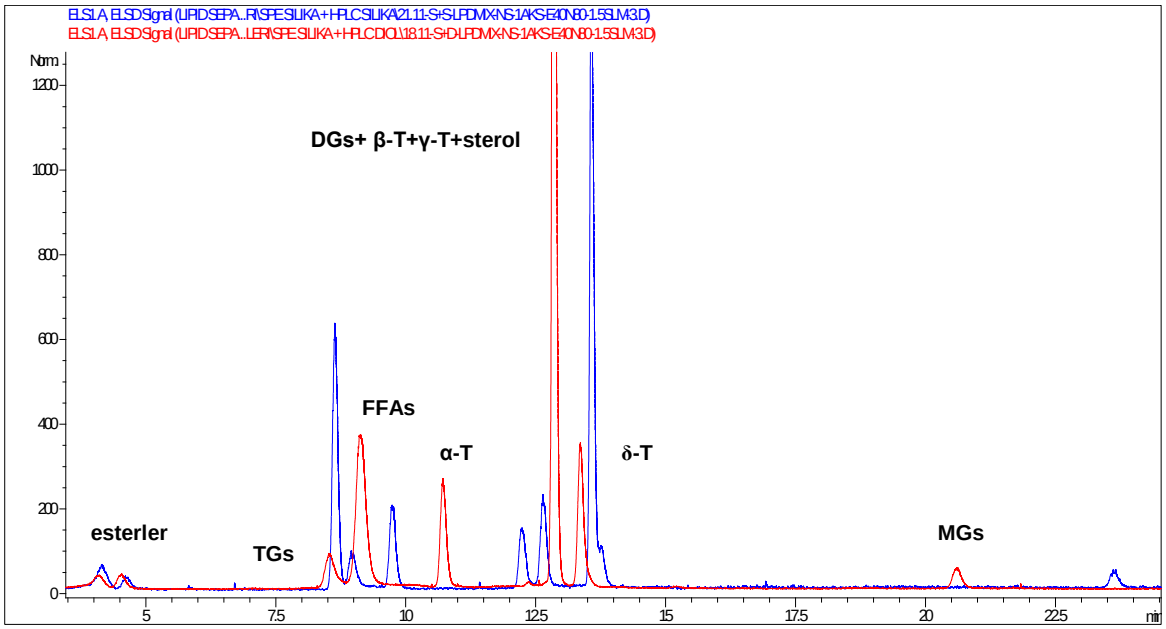
* Şekil. 3.10.'da yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.11.'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.




**Şekil 4. 79.** Sabit faz türünün lipit türlerinin ayrımı üzerine etkisinin, lipit standart maddeleri içeren karışım kullanılarak incelendiği analizlerden elde edilen kromatogramlar

Numune konsantrasyonu: 0,1 µg/µL standart lipid mix.
Numune Enjeksiyonu: 5 µL (Otomatik enjeksiyon)
Hareketli faz türü: **Nötral lipit H.F.S., gradient program**
Akış hızı: 1 mL/dk
Sıcaklık: 40°C
ELSD programı: Neb. sıcaklığı 80°C, Buh. sıcaklığı 40 °C, Azot gazı akış 1.5 SLM

**— Sil 100A 5µm 50x4.6mm Inertsil kolon analizi (1st-D SPE kolon)**
**— Sil 100A 5µm 250x4.6mm Inertsil kolon analizi (2nd-D HPLC kolonu)**
**— Sil 100A 5µm 50x4.6mm Inertsil +Sil 100A 5µm 250x4.6mm Inertsil kolon analizi (1st-DSPE kolon+ 2nd-D HPLC kolonu)**




**Şekil 4. 80.** Sabit faz yapısının lipit türlerinin ayrımı üzerine etkisinin, lipit standart maddeleri içeren karışım kullanılarak incelendiği analizlerden elde edilen kromatogramlar

Numune konsantrasyonu: 0,1 µg/µL standart lipid mix.

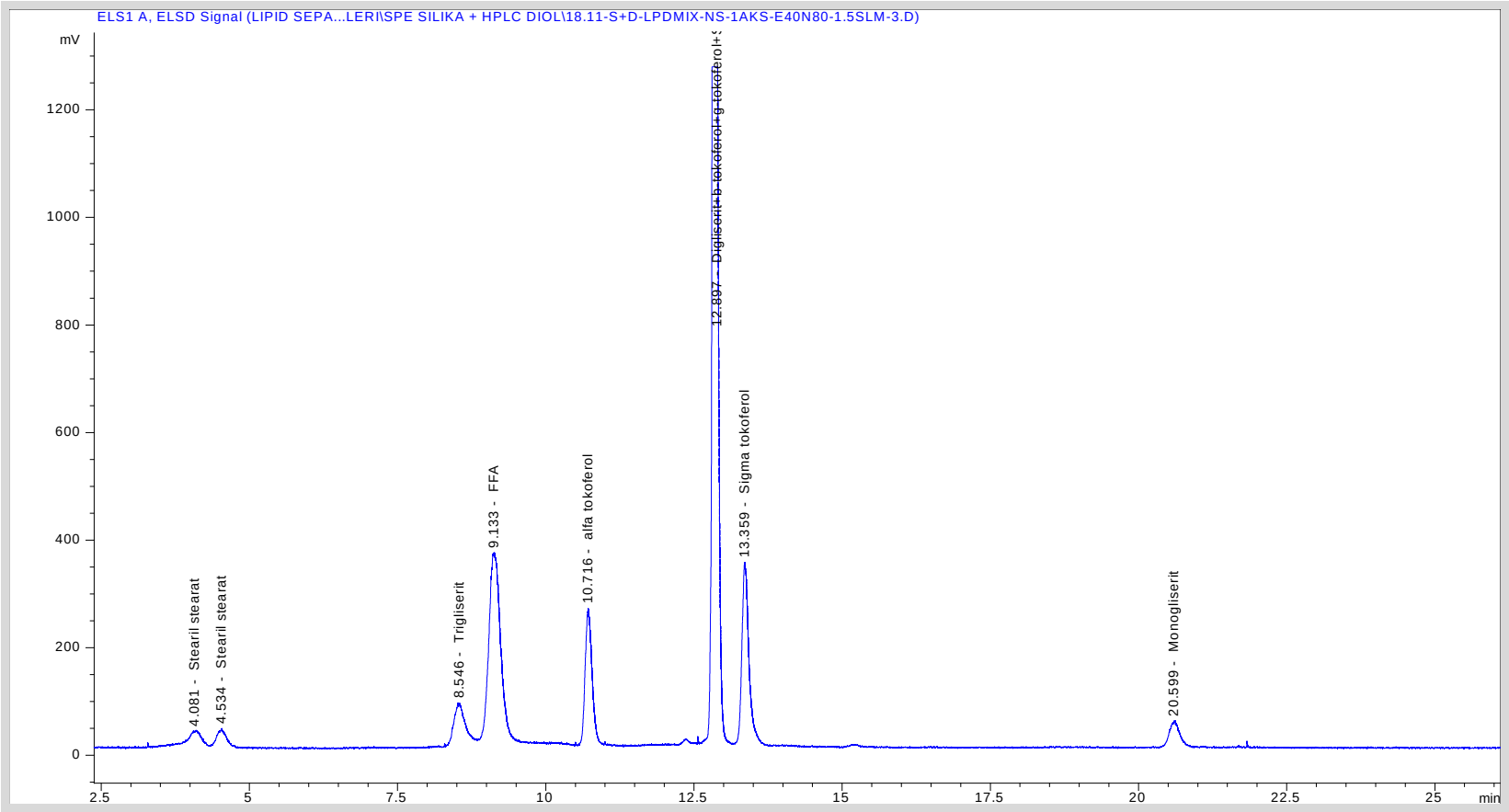
| | |
|---|---|
| Numune Enjeksiyonu: | 5 µL (Otomatik enjeksiyon) |
| Hareketli faz türü: | **Nötral lipit H.F.S., gradient program** |
| Akış hızı: | 1 mL/dk |
| Sıcaklık: | 40°C |
| ELSD programı: | Neb. sıcaklığı 80°C, Buh. sıcaklığı 40 °C, Azot gazı akış 1.5 SLM |

— **1st-D SPE kolon: Sil 100A 5µm 50x4.6mm Inertsil kolon**
**2nd-D HPLC kolonu: Sil 100A 5µm 50x4.6mm+Sil 100A 5µm 250x4.6mm Inertsil kolon analizi**

— **1st-D SPE kolon: Sil 100A 5µm 50x4.6mm Inertsil kolon**
**2nd-D HPLC kolonu: LiChrospher 100 Diol 5µm 75x4.6mm+ LiChrospher 100 Diol 5µm 250x4.6mm kolon analizi**

* Şekil. 3.10.'da yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.11.'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

Şekil 4.71, 4.72, 4.73 ve 4.74'de yer alan kromatogramlar incelendiğinde; I. ve II. boyut ayrım aşamalarında kullanılacak sabit faz yapılarının belirlenebilmesi için 3 farklı alternatif değerlendirilmeye çalışılmıştır. Nötral lipit gradient hareketli faz sistemi ile yürütülen analizlerde; I. boyut ayrım aşamasından, II. boyut ayrım aşamasına aktarılacak türlerin (*trigliserit,tokol, FFA, sterol, digliserit* ve *monogliserit*) tayini için en uygun sabit faz yapısının; $1^{st}$-D SPE kolon olarak Inertsil Sil 100A (5µm 50x4.6mm) kolon, $2^{nd}$-D HPLC kolonu olarak ise LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm)+(5µm 250x4.6mm) şeklindeki uygulamanın olduğuna karar verilmiştir. Sonuç olarak; I. boyut ayrım aşamasında türlerin geciktirilerek alıkonma sürelerinin fazlaolmasını sağlayacak silika yapıların; II. boyut ayrım aşamasında ise farklı polarite özelliklerindeki trigliserit,tokol, FFA, sterol, digliserit ve monogliserit türlerinin ayrımına hitap edebilecek diol yapılı kolonların kullanımı ile çalışmalara devam edilmesinin uygun bir yaklaşım olduğu kanaatine varılmıştır.




**Şekil 4. 81.** SPE ve NP-HPLC tekniklerinin birleştirilerek uygulandığı I. ve II. boyut ayrım analizleri için tespit edilen optimum şartlarda gerçekleştirilen, lipit standartları karışımını içeren numune analizine ait kromatogram

**Numune çözücüsü:** Hekzan

**Numune enjeksiyonu:** 5 µL (0,1 µg/µL standart lipid mix)

**1st-D SPE kolon:** Inertsil Sil 100A kolon (5µm 50x4.6mm)

**2nd-D HPLC kolon:** LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm)+ LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 250x4.6mm)

**Akış hızı:** 1 mL/dk **Sıcaklık:** 40°C **ELSD programı:** Neb. sıcaklığı 80°C, Buh.sıcaklığı 40°C, Azot gazı akış 1.5 SLM

* Şekil. 3.9 ve 10'da yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.11.'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

### 4.1.5. NP-HPLC, FIA ve $Ag^+$-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı II. ve III. boyut ayrım ($2^{nd}$-D & $3^{rd}$-D) analizleri

On-line SPE-FIA-HPLC birleştirilmiş yağ analiz sistemi üzerinde; ikinci aşama olarak yürütülen birleştirilmiş sistem uygulaması, "*NP-HPLC, FIA ve $Ag^+$-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı II. ve III. boyut ayrım ($2^{nd}$-D & $3^{rd}$-D) analizleri*"dir. NP-HPLC, FIA ve $Ag^+$-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı II. ve III. boyut ayrım ($2^{nd}$-D & $3^{rd}$-D) analizleri; kullanılan softwarede yapılan özel bir programlama yardımıyla, tek bir metot şeklinde yürütülmüştür. Oluşturulan program; $2^{nd}$-D HPLC kolonda ayrılan trigliserit, tokol, FFA, sterol, digliserit ve monogliserit nötral lipit türlerinin, valf-III (10PT/2PS) üzerine adapte edilen FIA loop sistemlerine fraksiyonlar halinde sırayla yönlendirilmesini, daha sonra her bir fraksiyon içerisindeki bileşenlerine ayrımını sağlamak üzere $3^{rd}$-D HPLC kolonu ve dedektör sistemlerine yönlendirilerek tayin edilmesini kapsamaktadır.

Şekil 3.11'de yer alan sistem işleyişi ve Çizelge 3.13 ve 3.14'de yer alan metot parametreleri kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir. Şekil.3.11'de yer alan sistem işleyişinden görüleceği üzere; $2^{nd}$-D HPLC kolonu **(VIII)** ile ayrımı sağlanan nötral lipitlerin alıkonma süreleri dikkate alınarak, sırayla valf-III (10PT/2PS) **(IX)** üzerine adapte edilen FIA loop sistemlerine **(XI)** yönlendirilmesi ve fraksiyonlar şeklinde toplanması sağlanmıştır. Loop sistemlerine **(XI)** nötral lipit fraksiyonlarının sırayla toplanmaya başlaması ile; valf-III (10PT/2PS) **(IX)** pozisyonu değiştirilmiş, pompa **(I)** durdurulmuş ve pompa **(X)**'nın işler hale gelmesi sağlanmıştır. Daha sonra; loop sistemlerinde toplanan nötral lipit türlerinin, uygun özellikteki kolonlarda kendi izomerlerine/ türlerine ayrımını sağlayacak uygun hareketli faz sistemleri, gradient pompa **(X)** yardımıyla gönderilmiştir. Toplanan fraksiyonların, devam eden akış içerisine enjeksiyonu (FIA) şeklinde gerçekleştirilen III. boyut analizlerinde; analiz edilecek türlere uygun seçilen $3^{rd}$-D HPLC kolonu **(XII)**, DAD **(XIII)**, FL **(XIV)** yada RI **(XV)** dedeksiyon sistemleri devreye koyulmuştur. III. boyut ayrım analizlerinin, lipit türlerin tamamına uygulanmasının ardından; SPE kolon **(IV)** üzerinde kalan lipit türlerinin analizi için sistemin, ilk halindeki programlamaya geçmesi sağlanmıştır.

NP-HPLC, FIA ve $Ag^+$-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı II. ve III. boyut ayrım ($2^{nd}$-D & $3^{rd}$-D) analizleri için sistem işleyişinin değişmesiyle birlikte; gerekli görülen kısımlar için, tekrar optimizasyon uygulamalarına gerek olduğu düşünülmüştür. Analizler için optimize edilen başlıca deneysel parametreler;

- Sabit faz yapısı ve harekeli faz türü ve
- Valf sistemi pozisyonlarının değiştirilme sürelerine ilişkin programlama şeklindedir.

#### 4.1.5.1. Sabit faz ve hareketli faz türü etkisi

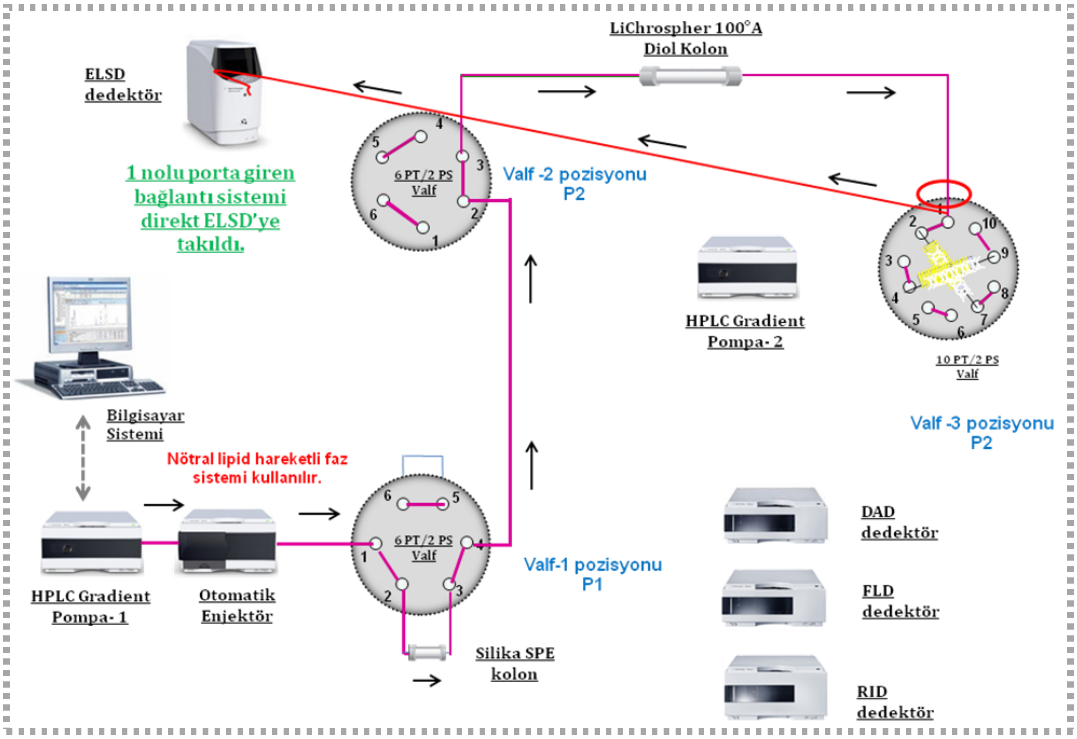
İlk aşama olarak tamamlanan birleştirilmiş sistem uygulamalarında; teoride "*birleştirilmiş çok boyutlu ayırma (MD-HPLC) tekniği*" olarak tanımlanan teknik kullanılarak çalışmalar tamamlanmıştı. İkinci aşama olan; NP-HPLC, FIA ve $Ag^{+}$-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı II. ve III. boyut ayrım ($2^{nd}$-D & $3^{rd}$-D) analizlerinde ise; "*kolon geçişli çok boyutlu ayırma (MD-HPLC) tekniği*" uygulamaları ile çalışmaların yürütülmesinin, daha uygun bir yaklaşım olacağı düşünülmüştür. Kolon geçişli çok boyutlu ayırma (MD-HPLC) tekniğinde; en az iki farklı kolon yapısı ve yönlendirme valf sistemleri kullanılarak; ters-faz, iyon değiştirme, boyut eleme gibi farklı sıvı kromatografi şartlarında eş zamanlı tayin yapabilme imkânı bulunmaktadır.

Bu amaç doğrultusunda yürütülen çalışmalara; $2^{nd}$-D ve $3^{rd}$-D HPLC kolon yapılarının seçimi ile başlanmıştır. Analizlerde; $2^{nd}$-D HPLC kolon yapısı sabit tutularak, $3^{rd}$-D HPLC kolon yapısının, temel bileşenler olan trigliserit ayrımları üzerine etkisi iki farklı kısımda incelenmiştir.

- **I. kısımda;**
  ***$2^{nd}$-D HPLC kolon: normal-faz HPLC kolon***
  [Inertsil Sil 100A kolon (5µm 50x4.6mm)+LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm)+LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 250x4.6mm)]
  ***$3^{rd}$-D HPLC kolon: ters-faz HPLC kolon***
  [ACE C18 kolon (5µm 250x4.6mm)]
- **II. kısımda;**
  ***$2^{nd}$-D HPLC kolon: normal-faz HPLC kolon***
  [Inertsil Sil 100A kolon (5µm 50x4.6mm)+LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm)+LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 250x4.6mm)]
  ***$3^{rd}$-D HPLC kolon: gümüş-iyon HPLC kolon***
  [ChromSpher 5 Lipids kolon (5µm 250x4.6mm)]

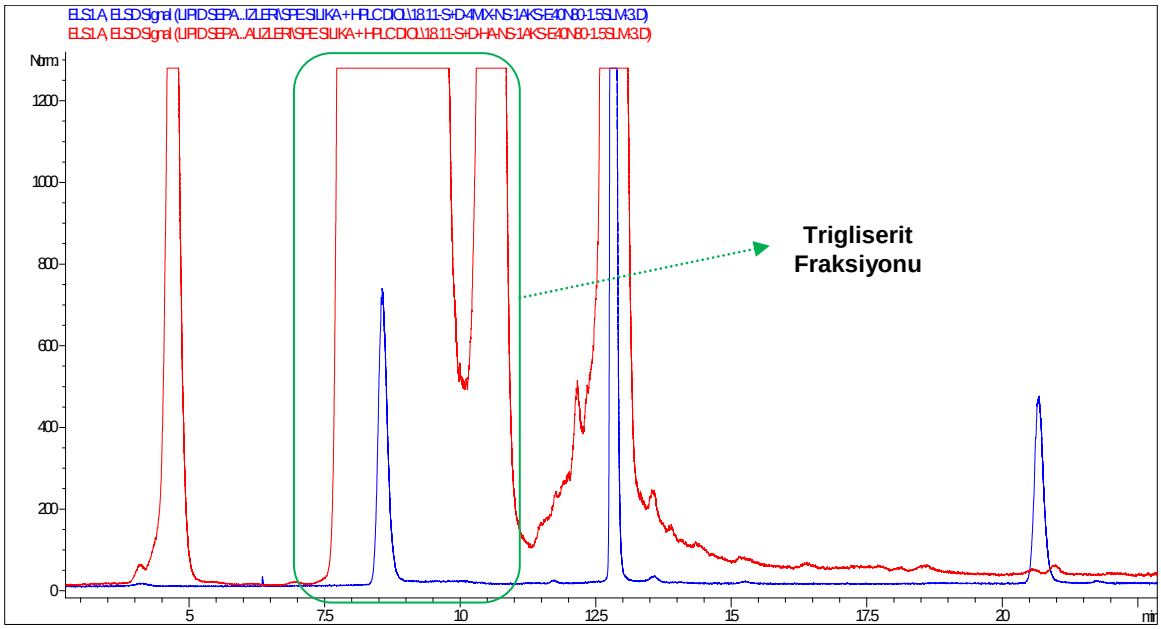
#### 4.1.5.1.1. NP-HPLC, FIA ve RP-HPLC tekniklerinin birlikte uygulandığı analizler

Bu aşamada yürütülen analizler ile; 2nd-D HPLC kolon ile trigliserit, tokol, FFA, sterol, digliserit ve monogliserit nötral lipit türlerinin fraksiyonlar halinde ayrımları gerçekleştirilmiş, daha sonra bu fraksiyonlardan bitkisel yağların temel bileşenleri olan trigliseritlerin 3rd-D HPLC kolonuna aktarılarak, ayrımı ve tayini sağlanmıştır. III. boyut ayrım aşamasına aktarılan trigliserit fraksiyonunun, kendi bileşenlerine ayrımı için; AOCS resmi yöntem (AOCS Ce 5b-89) kullanılmıştır. Önerilen yönteme göre; 3rd-D HPLC kolonu olarak ACE C18 kolon (5µm, 250x4.6mm) kullanılmıştır. Software de yapılan programlama ile, daha önce ayrı aşamalar halinde optimize edilen II. ve III. boyut ayrım analizleri birleştirilerek uygulanmıştır. Analizlerde öncelikle; trigliserit fraksiyonunun 3rd-D HPLC kolonuna aktarılmadan önce biriktirilerek bekletildiği, FIA loop sistemlerine ulaştığı sürenin tespit edilmesi sağlanmıştır. Bu işlem için; valf-III sisteminin (10PT/2PS) 1 nolu portuna giren bağlantı sistemi, direkt ELSD dedektör girişine takılmış ve TG fraksiyonunun bekletme hücresine ulaşma süresi tespit edilmiştir. (Şekil 4.82). Çizelge 3.13'de yer alan metot programlamalarında bu süre esas alınmıştır.




**Şekil 4. 82.** II. boyut ayrım aşamasından elde edilen fraksiyonların, 10PT/2PS valf sistemi üzerindeki loop sistemlerine ulaşma sürelerini tespiti için sisteminin işleyişine ait şematik gösterim

Şekil 4.82'de yer alan sistem işleyişi kullanılarak analiz edilen ham ayçiçek yağı numunesine ait kromatogram (Şekil 4.83) incelendiğinde; trigliserit fraksiyonunun yaklaşık olarak 7,5. dakikada bekletme hücresine (loop sistemine) ulaştığı görülmektedir.




**Şekil 4. 83.** Şekil 4.82'deki sistem işleyişine göre analiz edilen ham ayçiçeği yağı numunesine ve TG, DG, MG standart maddesine ait kromatogramlar

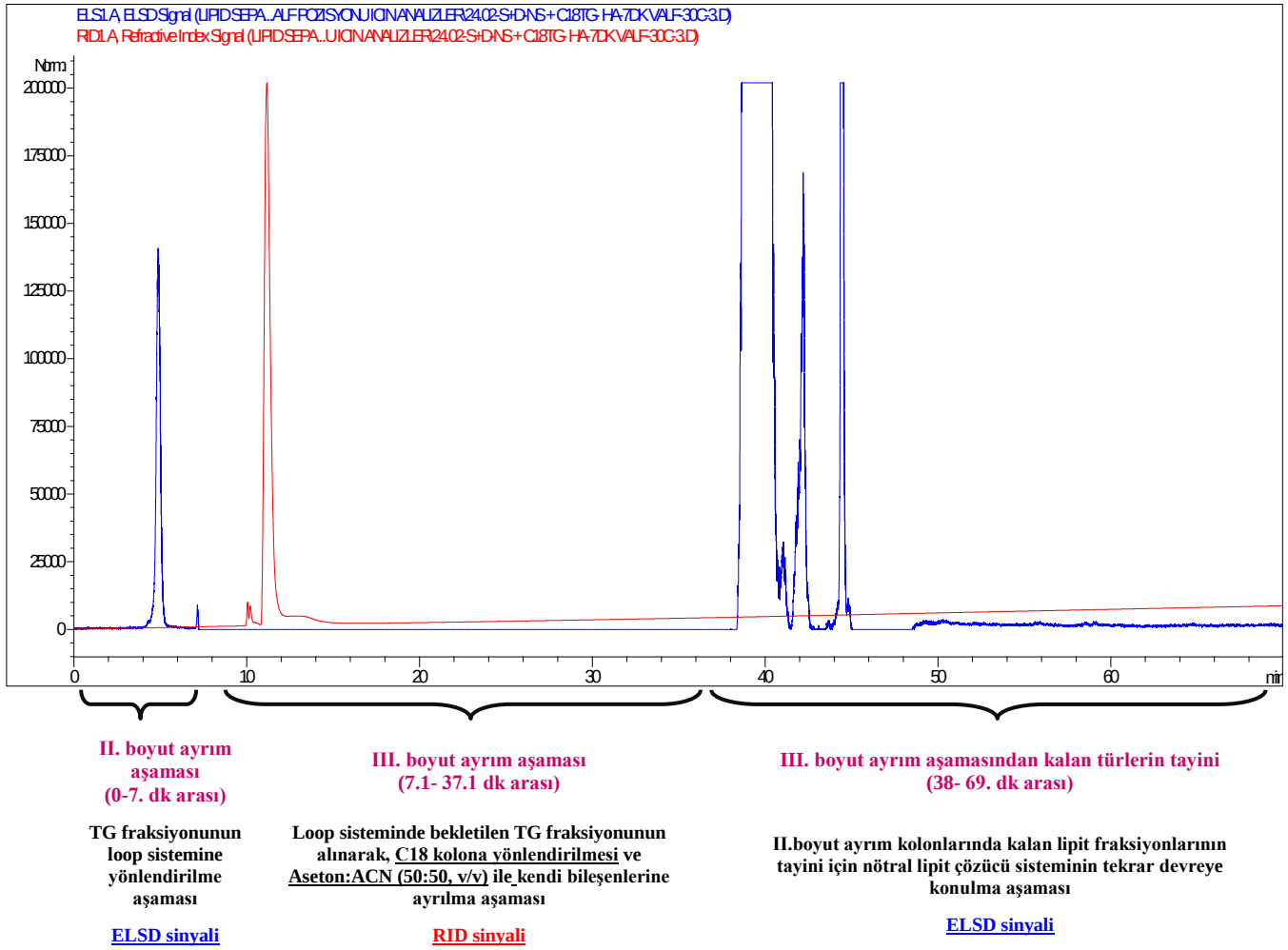
| | |
|---|---|
| Numune enjeksiyonu: | 5 µL (Otomatik enjeksiyon) |
| Hareketli faz türü: | Nötral lipit H.F.S., gradient program |
| 2nd-D HPLC kolonu: | Inertsil Sil 100A (5µm 50x4.6mm) kolon+LiChrospher 100 A Diol (5µm 75x4.6mm)+ LiChrospher 100 Diol kolon (5µm 250x4.6mm) |
| Akış hızı: | 1 mL/dk |
| Sıcaklık: | 40°C |
| ELSD programı: | Neb. sıcaklığı 80°C, Buh. sıcaklığı 40 °C, Azot gazı akış 1.5 SLM |

**— 0,1 mg/µL ham ayçiçeği yağı numunesi analizi**

**— 0,16 µg/µL trigliserit, digliserit ve monogliserit içeren mix. standart madde analizi**

Bu bilgiler esas alınarak, Çizelge 3.13'de yer alan metot programlaması oluşturulmaya çalışılmıştır. Yapılan örnek bir programlamada;

| | |
|---|---|
| 0- 7. dk arasında: | trigliserit fraksiyonunun II. boyut ayrım aşamasından III. boyut ayrım aşamasına aktarılmak üzere loop sistemine yönlendirilmesi, |
| 7.1- 37.1 dk arasında: | loop sisteminde bekletilen trigliserit fraksiyonunun, 2.pompa ile alınarak III. boyut ayrım aşaması için C18 kolon ve RID sistemine yönlendirilmesi ve analiz edilmesi, |
| 38- 69. dk arasında: | II. boyut ayrım kolonunda kalan fraksiyonların (TG haricindeki lipit fraksiyonları) tayini için tekrar nötral lipit çözücü sistemine geçiş yapılması sağlanmıştır (Çizelge 3.13). |




**Şekil 4. 84.** II. ve III. boyut ayrım tekniğinin birlikte uygulandığı analizlerde 7. dk esas alınarak yapılan programlama analizinden elde edilen kromatogram, 0.1 mg/µL ham ayçiçeği yağı numunesi analizi için eş zamanlı alınan ELSD Sinyali ve RID sinyali

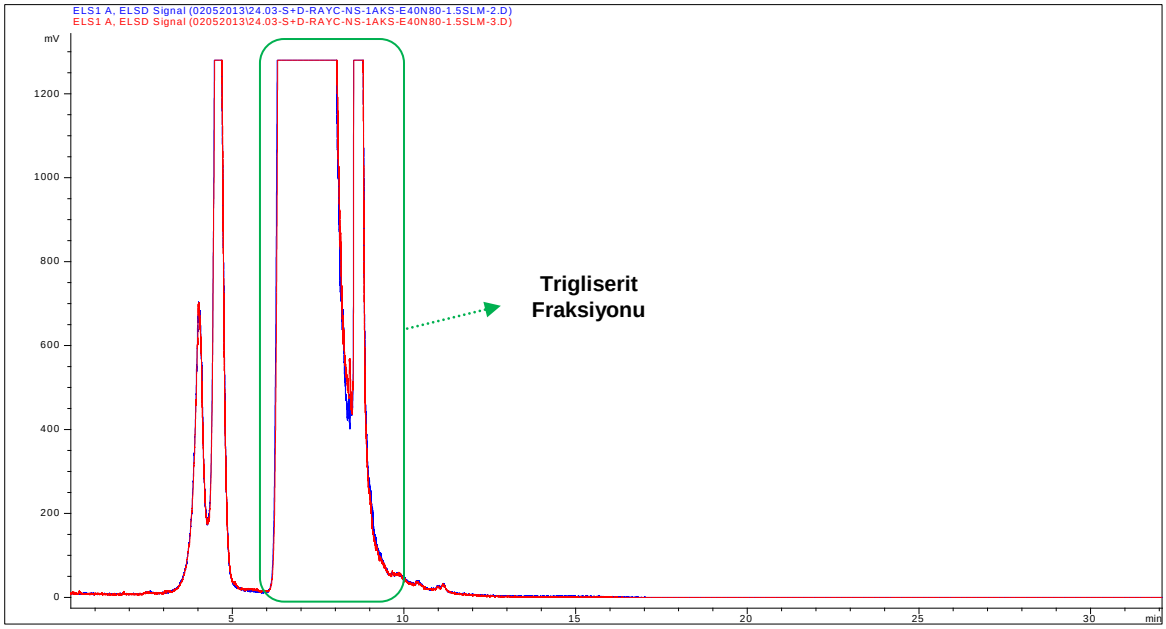
Şekil 4.84'de yer alan kromatogramdan görüleceği üzere; yapılan metot programlaması ile, 0 ile 7. dakika arasında, II.boyut ayrımdan elue edilen TG fraksiyonu bekletme hücresine yönlendirilmiş ve 7. dakikada I. HPLC pompası durdurulmuş, II. HPLC pompanın devreye geçmesi sağlanmıştır. II. HPLC pompasının işler hale gelmesi ve valf sistemlerinin pozisyon değiştirilmesiyle; 7 ile 38. dakika arasındaki III. boyut ayrım aşamasına geçilmiştir. Bu aşamada; loop sisteminden TG fraksiyonu alınarak, III. boyut ayrım kolonunda yani C18 kolonda trigliserit bileşenlerine ayrımı sağlanmaya çalışılmıştır. III. boyut ayrım için C18 kolona gönderilen TG fraksiyonunun, AOCS Ce 5b-89 standart metodu ile trigliserit bileşenlerine ayrımı sağlanmaya çalışılmış fakat Şekil 4.84'de yer alan kromatogramdan görüleceği üzere istenilen ayrım sağlanamamış, TG fraksiyonu toplu bir şekilde elue edilmiştir. Bu durum; II. boyut ve III. boyut ayrım aşamalarında uygulanan NP-HPLC ve RP-HPLC tekniği uygulamalarındaki hareketli ve sabit fazların farklılığından kaynaklanması ile ilişkilendirilmiştir. 38 ile 69. dakika arasında ise; II. boyut ayrım aşamasında yarım bırakılan analiz nedeniyle kolon içerisinde kalan TG fraksiyonu haricindeki lipit türlerinin kolonlardan elue edilmesi için, nötral lipit hareketli faz sistemi ile gradient program tekrar uygulanmıştır.

#### 4.1.5.1.2. NP-HPLC, FIA ve $Ag^{+}$-HPLC tekniklerinin birlikte uygulandığı analizler

Bu aşamada yürütülen analizler ile; $2^{nd}$-D HPLC kolon ile trigliserit, tokol, FFA, sterol, digliserit ve monogliserit nötral lipit türlerinin fraksiyonlar halinde ayrımları gerçekleştirilmiş, daha sonra bu fraksiyonlardan bitkisel yağların temel bileşenleri olan trigliseritlerin $3^{rd}$-D HPLC kolonuna aktarılarak, ayrımı ve tayini sağlanmıştır. III. boyut ayrım aşamasına aktarılan trigliserit fraksiyonunun, kendi bileşenlerine ayrımı için; $Ag^{+}$-HPLC tekniği uygulanmıştır. Önerilen yönteme göre; $3^{rd}$-D HPLC kolonu olarak ChromSpher 5 Lipids kolon (5µm 250x4.6mm) kullanılmıştır. Software de yapılan programlama ile, daha önce ayrı aşamalar halinde optimize edilen II. ve III. boyut ayrım analizleri birleştirilerek uygulanmıştır. Analizlerde öncelikle; trigliserit fraksiyonunun $3^{rd}$-D HPLC kolonuna aktarılmadan önce biriktirilerek bekletildiği, FIA loop sistemlerine ulaştığı sürenin tespit edilmesi sağlanmıştır. Bu işlem için; valf-III sisteminin (10PT/2PS) 1 nolu portuna giren bağlantı sistemi, direkt ELSD dedektör girişine takılmış ve TG fraksiyonunun bekletme hücresine (loop sistemine) ulaşma süresi tespit edilmiştir. (Şekil 4.82). Çizelge 3.14'de yer alan metot programlamalarında

bu süre esas alınmıştır.

Şekil 4.82'de yer alan sistem işleyişi kullanılarak analiz edilen ham ayçiçek yağı numunesine ait kromatogram (Şekil 4.85) incelendiğinde; trigliserit fraksiyonunun yaklaşık olarak 5,5.-6,0. dakikada bekletme hücresine (loop sistemine) ulaştığı görülmektedir.



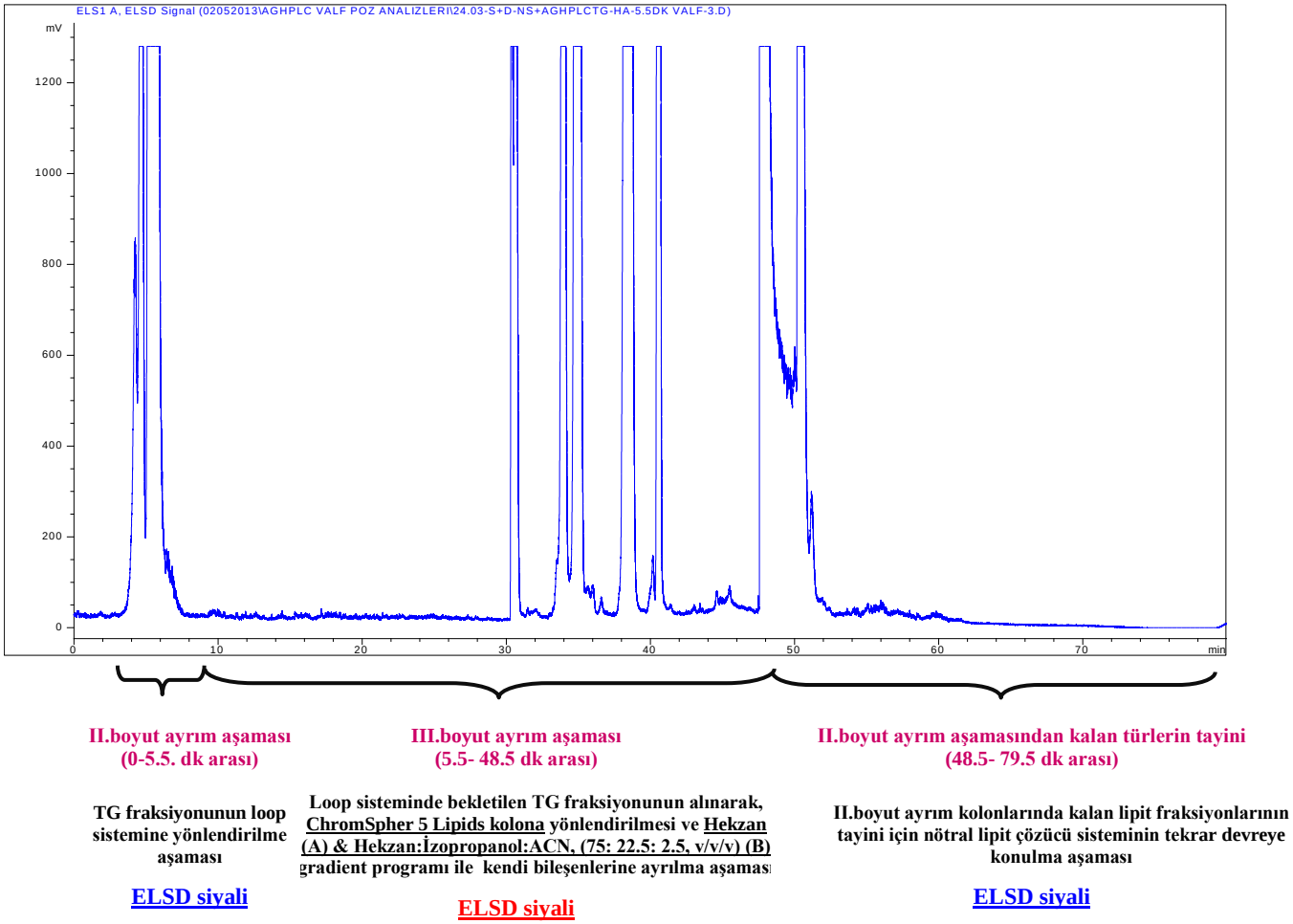

**Şekil 4. 85.** Şekil 4.82'deki sistem işleyişine göre analiz edilen rafine ayçiçeği yağı numunesine ait kromatogram

| | |
|---|---|
| Numune enjeksiyonu: | 5 µL (Otomatik enjeksiyon) |
| Hareketli faz türü: | Nötral lipit H.F.S., gradient program |
| 2nd-D HPLC kolonu: | Inertsil Sil 100A (5µm 50x4.6mm) kolon+LiChrospher 100 A Diol (5µm 75x4.6mm)+ LiChrospher 100 Diol kolon (5µm 250x4.6mm) |
| Akış hızı: | 1 mL/dk |
| Sıcaklık: | 40°C |
| ELSD programı: | Neb. sıcaklığı 80°C, Buh. sıcaklığı 40 °C, Azot gazı akış 1.5 SLM |

**— 0,1 mg/µL ham ayçiçeği yağı numunesi analizi, — 0,1 mg/µL ham ayçiçeği yağı numunesi analizi**

Bu bilgiler esas alınarak, Çizelge 3.14'de yer alan metot programlaması oluşturulmaya çalışılmıştır. Yapılan örnek bir programlamada;

| | |
|---|---|
| 0- 5.5 dk arasında: | trigliserit fraksiyonunun II. boyut ayrım aşamasından III. boyut ayrım aşamasına aktarılmak üzere, loop sistemine yönlendirilmesi, |
| 5.6- 48.5 dk arasında: | loop sisteminde bekletilen trigliserit fraksiyonunun, II. pompa ile alınarak III. boyut ayrım aşaması için ChromSpher 5 Lipids kolon ve ELSD sistemine yönlendirilerek analiz edilmesi |
| 48.5-79.5 dk arasında: | II. boyut ayrım kolonlarında kalan fraksiyonların (TG haricindeki lipit fraksiyonları) tayini için tekrar nötral lipit sistemine geçiş yapılması sağlanmıştır (Çizelge 3.14). |




**Şekil 4. 86.** II. ve III. boyut ayrım tekniğinin birlikte uygulandığı analizlerde 5,5. dk esas alınarak yapılan programlama analizinden elde edilen kromatogram, 0.1 mg/µL ham ayçiçeği yağı numunesi analizi

Şekil 4.86'da yer alan kromatogramdan görüleceği üzere; yapılan metot programlaması ile, 0 ile 5,5. dakika arasında, II. boyut ayrımdan elue edilen TG fraksiyonu bekletme hücresine yönlendirilmiş ve 5,5. dakikada I. HPLC pompası durdurulmuş, II. HPLC pompanın devreye geçmesi sağlanmıştır. II. pompasının işler hale gelmesi ve valf sistemlerinin pozisyon değiştirilmesiyle; 5,6 ile 48,5. dakika arasındaki III. boyut ayrım aşamasına geçilmiştir. Bu aşamada; loop sisteminden TG fraksiyonu alınarak, III. boyut ayrım kolonunda yani ChromSpher 5 Lipids kolonda trigliserit bileşenlerine ayrımı sağlanmaya çalışılmıştır. III. boyut ayrım için ChromSpher 5 Lipids kolona gönderilen TG fraksiyonunun, $Ag^{+}$-HPLC tekniği ile trigliserit bileşenlerine ayrımı sağlanmaya çalışılmıştır. Şekil 4.86'da yer alan kromatogramdan görüleceği üzere trigliserit türlerinin istenilen düzeyde ayrımı sağlanarak, tayinleri gerçekleştirilmiştir. Bir önceki aşamada başarılamayan bu durum; II. boyut ve III. boyut ayrım aşamalarında uygulanan NP-HPLC ve $Ag^{+}$-HPLC tekniği uygulamalarındaki hareketli fazların farklılığının ortadan kalkması ile ilişkilendirilmiştir. 48,5 ile 79,5. dakika arasında ise; II. boyut ayrım aşamasında yarım bırakılan analiz nedeniyle kolon içerisinde kalan TG fraksiyonu haricindeki lipit türlerinin kolonlardan elue edilmesi için, nötral lipit hareketli faz sistemi ile gradient program tekrar uygulanmıştır.

### 4.1.5.2. Valf pozisyonlarının değiştirilme sürelerinin etkisi

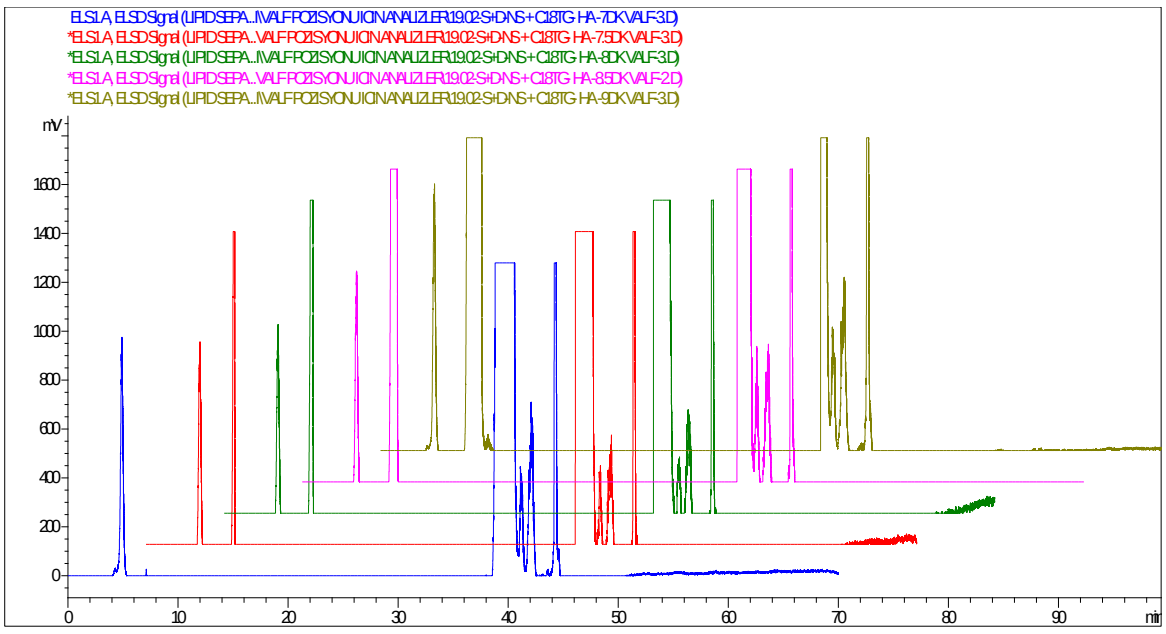
II. ve III. boyut ayrım analizlerinin birleştirilerek uygulandığı bu aşamada, valf-III (10PT/2PS) sisteminin programlaması üzerine bazı çalışmalar yürütülmüştür. Yürütülen çalışmalarda; bir önceki aşamada olduğu gibi loop sistemlerine TG fraksiyonlarının toplanma süreleri tespit edilmiş (Şekil 4.82), daha sonra bu süreye yakın süreler kullanılarak valf-II (6PT/2PS) ve valf-III (10PT/2PS) sisteminin pozisyonunun değiştirilmesine dair farklı programlar oluşturulmuştur. Valf pozisyonlarının değiştirilme süreleri üzerine yapılan programlamalar sayesinde; II. boyut ayrım aşamasından III. boyut ayrım aşamasına TG türlerinin en verimli aktarım programı tespit edilmiştir (Çizelge 3.13 ve 3.14).

Valf-II (6PT/2PS) ve valf-III (10PT/2PS) pozisyonunun değiştirilme sürelerine ilişkin analizler; III. boyut ayrım aşamasında RP-HPLC ve $Ag^{+}$-HPLC tekniklerinin uygulandığı deney aşamalarının her ikisi için de gerçekleştirilmiştir.

#### 4.1.5.2.1. NP-HPLC, FIA ve RP-HPLC tekniklerinin birlikte uygulandığı analizler için valf pozisyonu değiştirilme süresinin etkisi

Bu aşamada yürütülen analizlerde; III. boyut ayrım aşamasına aktarılan trigliserit fraksiyonunun, ACE C18 kolon (5µm 250x4.6mm) 3rd-D HPLC kolonu ile kendi bileşenlerine ayrımının iyileştirilmesi amacıyla bazı optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.82'de yer alan sistem işleyişi ile TG fraksiyonunun loop sistemine ulaşma süresi tespit edilmiş, fakat bu sürelerin öncesi ve sonrası için nasıl bir durum gelişebileceği öngörülememiştir. Bu durumu öngörebilmek ve III. boyut ayrım aşamasına TG fraksiyonlarının aktarım sürelerinin farklılaştırılabilmesi amacıyla; valf-II (6PT/2PS) ve valf-III (10PT/2PS) pozisyonunun değiştirilme sürelerine ilişkin analizler yürütülmüştür.

Şekil 4.82'de yer alan sistem işleyişi ile yaklaşık 7.-10. dakikalar arasında, TG fraksiyonunun loop sisteminde bulunduğu tespit edilmiş ve bu yaklaşımla 7.; 7,5.; 8.; 8,5. ve 9. dakikalardaki valf-II (6PT/2PS) ve valf-III (10PT/2PS) pozisyonunun değiştirilme süreleri için metotlar oluşturulmuştur (Çizelge 3.13). Elde edilen kromatogramlar, karşılaştırmalı olarak Şekil 4.87'de verilmiştir.




**Şekil 4. 87.** II. ve III. boyut ayrım tekniğinin birlikte uygulandığı analizler için; 7., 7.5., 8., 8.5 ve 9. dakikalar esas alınarak yapılan programlama analizlerinden elde edilen kromatogramlar

| | |
|---|---|
| Numune enjeksiyonu: | 5 µL (Otomatik enjeksiyon) |
| II. ve III. boyut ayrım hareketli faz türü: | Nötral lipit H.F.+ Aseton:ACN + Nötral lipit H.F. |

| | |
|---|---|
| 2nd-D HPLC kolonu: | Inertsil Sil 100A (5µm 50x4.6mm) kolon+LiChrospher 100 A Diol (5µm 75x4.6mm)+ LiChrospher 100 Diol kolon (5µm 250x4.6mm) |
| FIA loop: | 100 µL |
| 3rd-D HPLC kolonu: | **ACE C18 kolon (5µm 250x4.6mm)** |
| Akış hızı: | 1 mL/dk |
| Sıcaklık: | 40°C |
| RID sıcaklığı: | 35°C |
| ELSD programı: | Neb. sıcaklığı 80°C, Buh. sıcaklığı 40 °C, Azot gazı 1.5 SLM |

— **7. dk valf programlamasına ait ham ayçiçek yağı analizi,**
— **7,5. dk valf programlaması ait ham ayçiçek yağı analizi,**
— **8. dk valf programlaması ait ham ayçiçek yağı analizi,**
— **8,5. dk valf programlaması ait ham ayçiçek yağı analizi,**
— **9. dk valf programlaması ait ham ayçiçek yağı analizi**

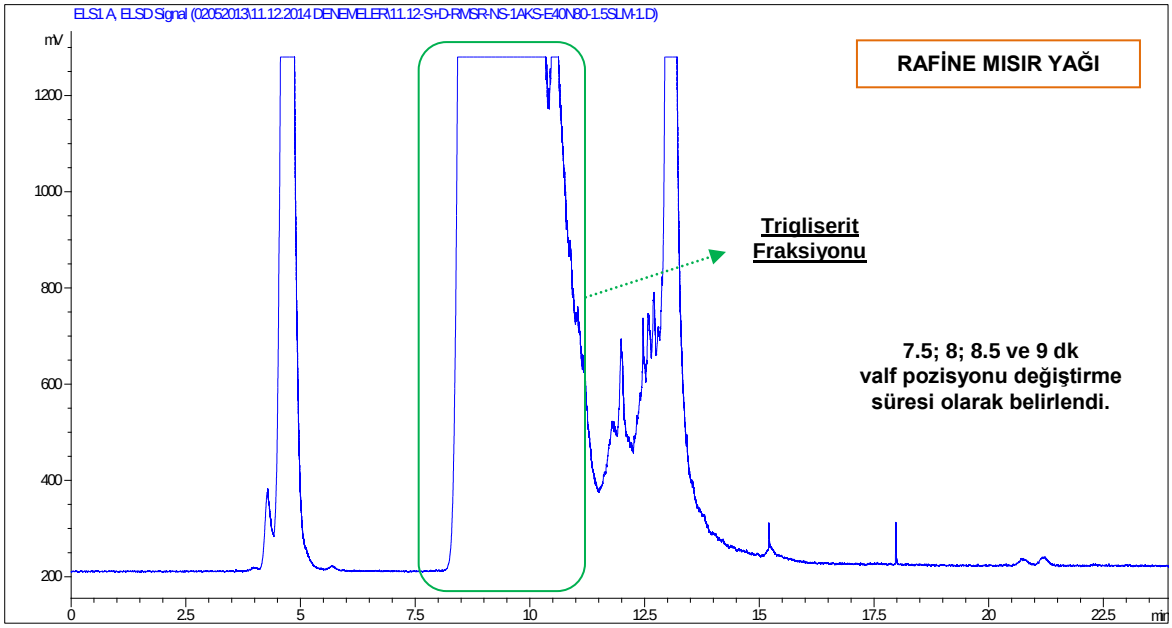
* Şekil 3.10'da yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.14'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

Şekil 4.87'de yer alan kromatogramdan görüleceği üzere; 7.; 7,5.; 8.; 8,5. ve 9. dakikalarda valf-II (6PT/2PS) ve valf-III (10PT/2PS) pozisyonunun değiştirilme süreleri ayarlanarak loop sisteminden TG fraksiyonu alınmış ve III. boyut ayrım kolonunda yani C18 kolonda trigliserit bileşenlerine ayrımı sağlanmaya çalışılmıştır. III. boyut ayrım için C18 kolona gönderilen TG fraksiyonunun, AOCS Ce 5b-89 standart metodu ile trigliserit bileşenlerine ayrımı sağlanmaya çalışılmış fakat Şekil 4.87'de yer alan kromatogramlardan görüleceği üzere istenilen ayrım sağlanamamış ve TG fraksiyonu toplu bir şekilde elue edilmiştir. Bu durumun; valf-II (6PT/2PS) ve valf-III (10PT/2PS) pozisyonunun değiştirilme süreleri ile ilgili olmayıp, sadece NP-HPLC ve RP-HPLC tekniği uygulamalarındaki hareketli ve sabit fazların farklılığından kaynaklandığı kesinleştirilmiştir. Bu nedenle; III. boyut ayrım aşamasında kullanılan tekniğin, RP-HPLC yerine $Ag^{+}$-HPLC tekniği olmasının, daha uygun bir yaklaşım olacağı kanaatine varılmıştır.

#### 4.1.5.2.2. NP-HPLC, FIA ve $Ag^{+}$-HPLC tekniklerinin birlikte uygulandığı analizler için valf pozisyonu değiştirilme süresinin etkisi

Bu aşamada yürütülen analizlerde; bir önceki aşamada olduğu gibi, III. boyut ayrım aşamasına aktarılan trigliserit fraksiyonunun, ChromSpher 5 Lipids kolon (5µm 250x4.6mm) $3^{rd}$-D HPLC kolonu ile kendi bileşenlerine ayrımının iyileştirilmesi amacıyla bazı optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.82'de yer alan sistem işleyişi ile TG fraksiyonunun loop sistemine ulaşma süresi tespit edilmiş, fakat bu sürelerin öncesi ve sonrası için nasıl bir durum gelişebileceği öngörülememiştir. Bu durumu öngörebilmek ve III. boyut ayrım aşamasına TG fraksiyonlarının aktarım

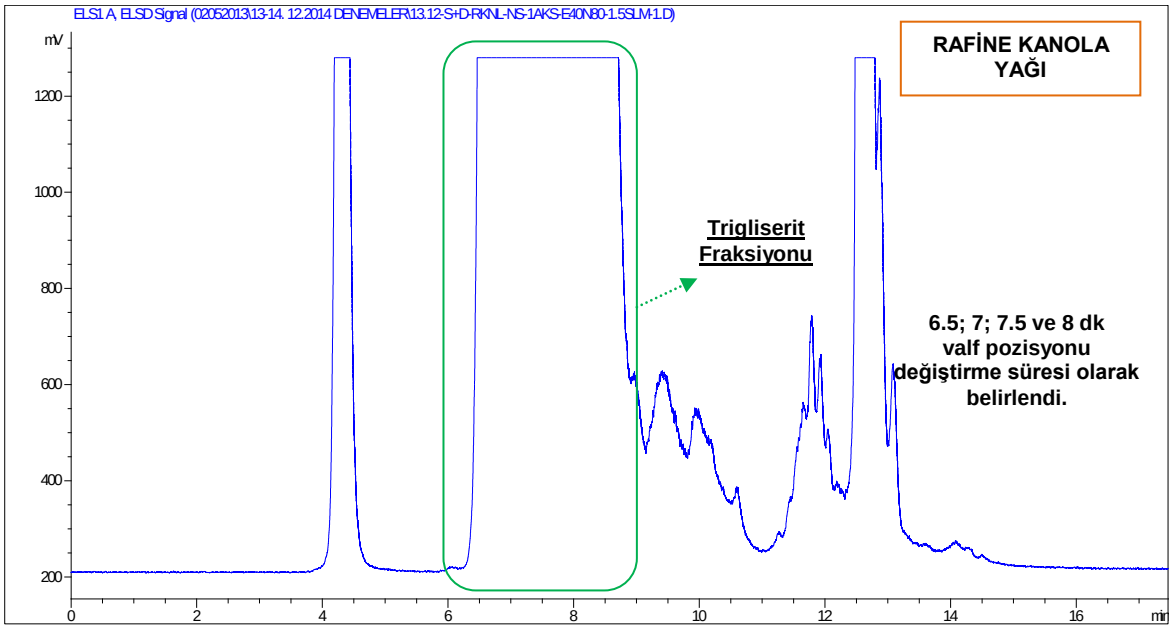
sürelerinin farklılaştırılabilmesi amacıyla; valf-II (6PT/2PS) ve valf-III (10PT/2PS) pozisyonunun değiştirilme sürelerine ilişkin analizler yürütülmüştür. Şekil 4.82'de yer alan sistem işleyişi kullanılarak; rafine ayçiçek, mısır, kanola, zeytinyağı ve palm yağı için gerçekleştirilmiş ve her bir yağ türü için TG fraksiyonlarının loop sistemine ulaşma süreleri ayrı ayrı belirlenmiştir (Şekil 4.88 4.89 ve 4.90).




**Şekil 4. 88.** Şekil 4.82'deki sistem işleyişine göre analiz edilen rafine mısır yağı numunesine ait kromatogram

| | |
|---|---|
| Numune enjeksiyonu: | 5 µL (Otomatik enjeksiyon) |
| Hareketli faz türü: | Nötral lipit H.F.S., gradient program |
| 2nd-D HPLC kolonu: | Inertsil Sil 100A (5µm 50x4.6mm) kolon+LiChrospher 100 A Diol (5µm 75x4.6mm)+ LiChrospher 100 Diol kolon (5µm 250x4.6mm) |
| Akış hızı: | 1 mL/dk |
| Sıcaklık: | 30°C |
| ELSD programı: | Neb sıcaklığı 80°C, Buh sıcaklığı 40 °C, Azot gazı akış 1.5 SLM |

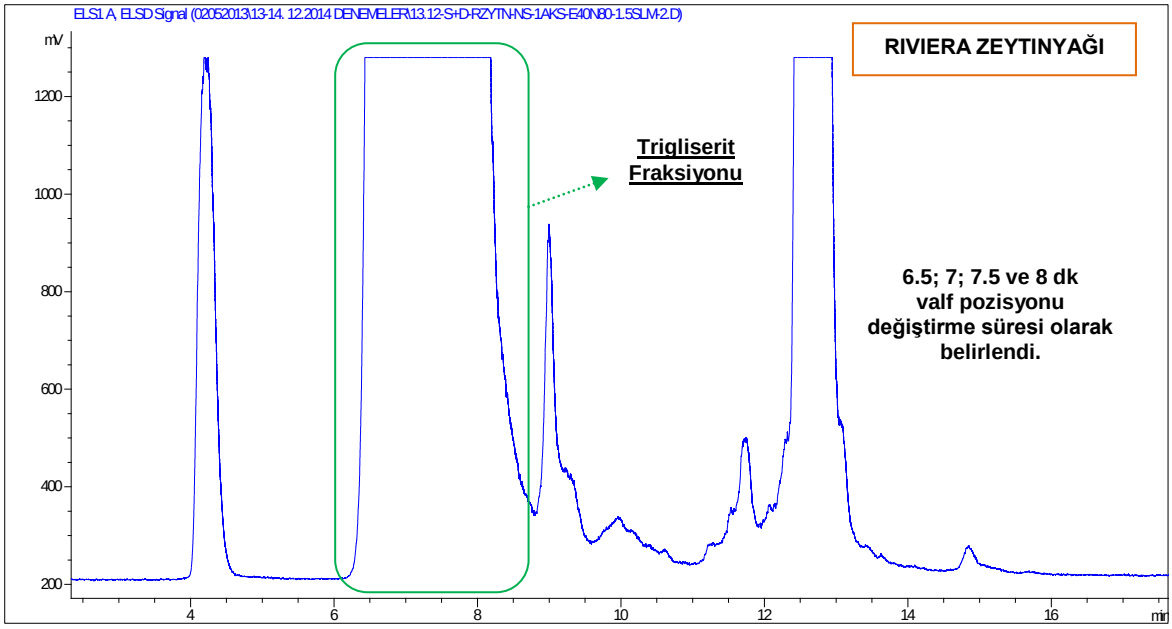
* Şekil 4.82 de yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.14.'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.




**Şekil 4. 89.** Şekil 4.82'deki sistem işleyişine göre analiz edilen rafine kanola yağı numunesine ait kromatogram

| | |
|---|---|
| Numune enjeksiyonu: | 5 µL (Otomatik enjeksiyon) |
| Hareketli faz türü: | Nötral lipit H.F.S., gradient program |
| 2nd-D HPLC kolonu: | Inertsil Sil 100A (5µm 50x4.6mm) kolon+LiChrospher 100 A Diol (5µm 75x4.6mm)+ LiChrospher 100 Diol kolon (5µm 250x4.6mm) |
| Akış hızı: | 1 mL/dk, |
| Sıcaklık: | 30°C, |
| ELSD programı: | Neb sıcaklığı 80°C, Buh sıcaklığı 40 °C, Azot gazı akış 1.5 SLM |

* Şekil 4.82 de yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.14.'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.



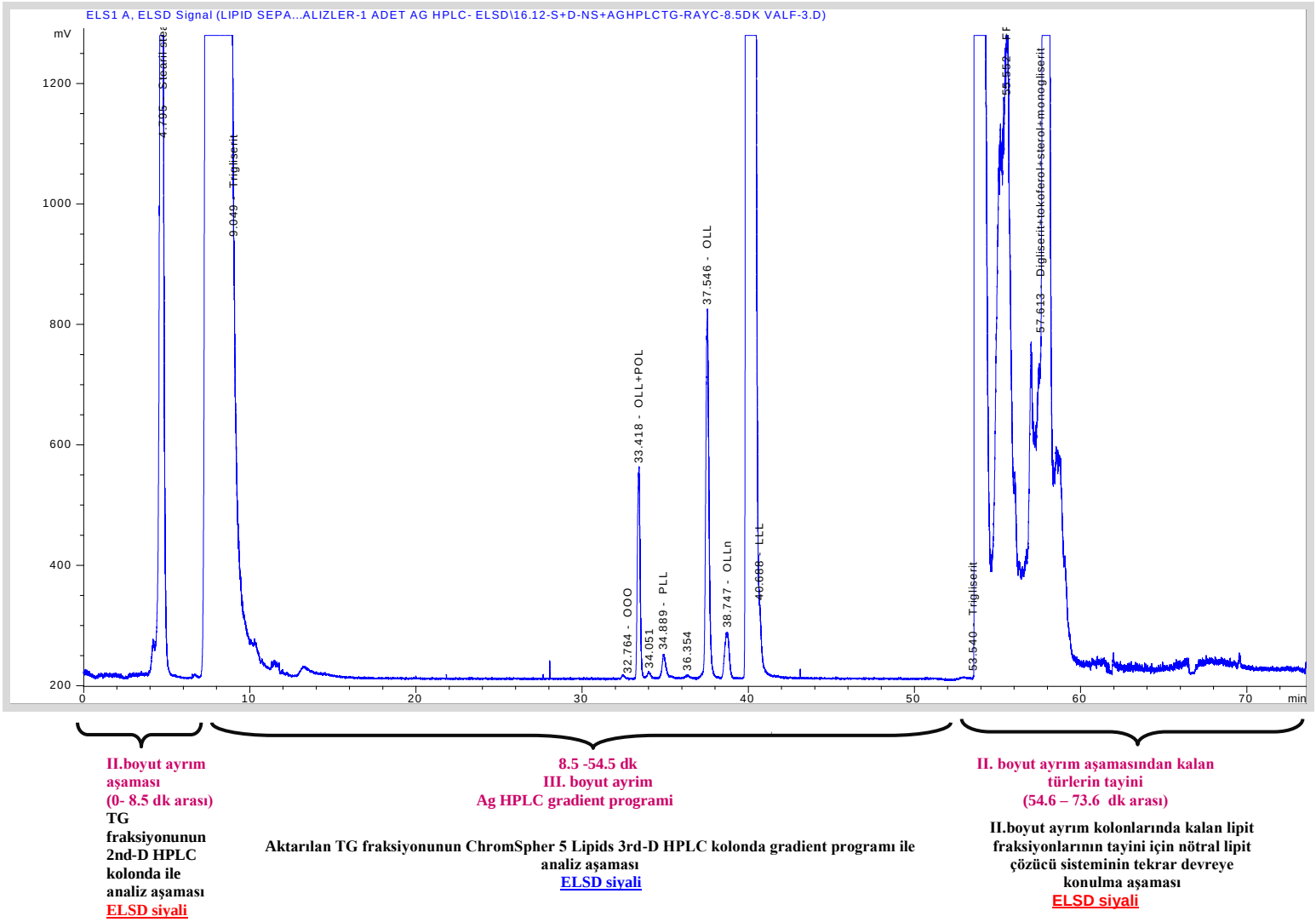

**Şekil 4. 90.** Şekil 4.82'deki sistem işleyişine göre analiz edilen riviera zeytinyağı numunesine ait kromatogram

| | |
|---|---|
| Numune enjeksiyonu: | 5 µL (Otomatik enjeksiyon) |
| Hareketli faz türü: | Nötral lipit H.F.S., gradient program |

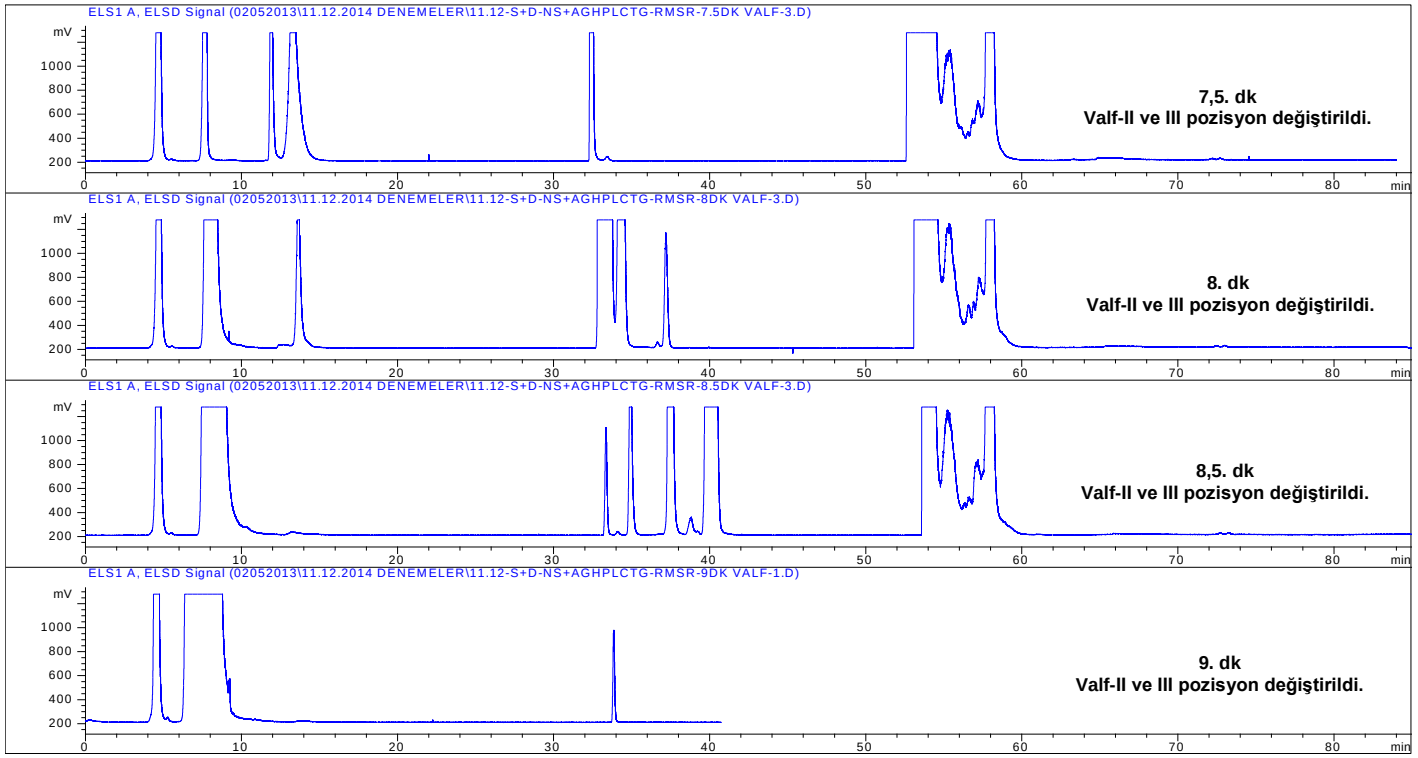
| | |
|---|---|
| 2nd-D HPLC kolonu: | Inertsil Sil 100A (5µm 50x4.6mm) kolon+LiChrospher 100 A Diol (5µm 75x4.6mm)+ LiChrospher 100 Diol kolon (5µm 250x4.6mm) |
| Akış hızı: | 1 mL/dk, |
| Sıcaklık: | 30°C, |
| ELSD programı: | Neb sıcaklığı 80°C, Buh sıcaklığı 40 °C, Azot gazı akış 1.5 SLM |

* Şekil 4.82 de yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.14.'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

Şekil 4.82'de yer alan sistem işleyişi kullanılarak; TG fraksiyonlarının loop sistemine ulaşma süreleri ayrı ayrı belirlenmiş, daha sonra belirlenen bu süreler esas alınarak valf-II (6PT/2PS) ve valf-III (10PT/2PS) pozisyonunun değiştirilme süreleri için farklı metotlar oluşturulmuştur. Genel itibariyle; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5 ve 9,0. dakikalardaki valf-II (6PT/2PS) ve valf-III (10PT/2PS) pozisyonunun değiştirilme süreleri için metotlar oluşturulmuştur (Çizelge 3.14). Elde edilen kromatogramlar, karşılaştırmalı olarak Şekil 4.91, 4.92, 4.93, 4.94, 4.95 ve 4.96'da verilmiştir.



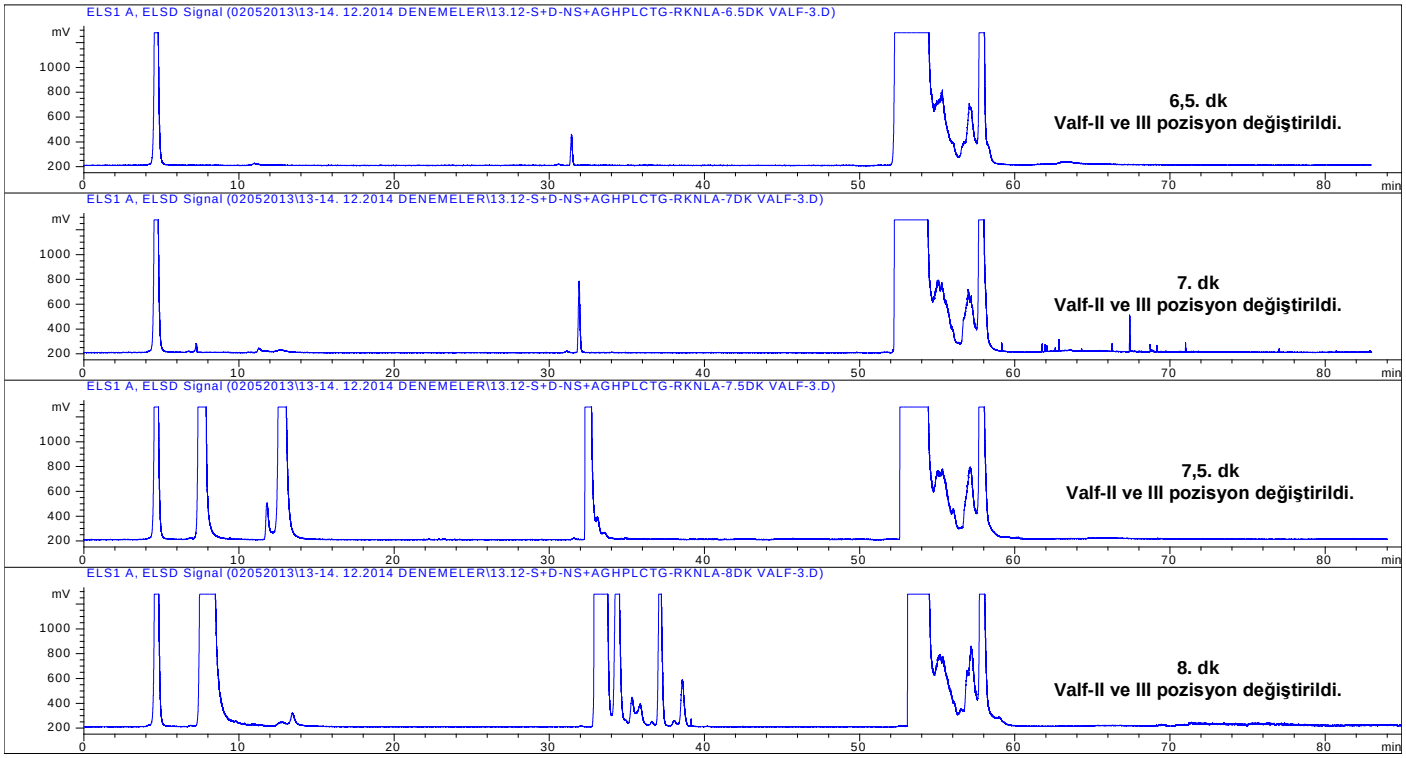

**Şekil 4. 91.** NP-HPLC, FIA ve $Ag^{+}$-HPLC tekniklerinin birleştirilerek uygulandığı II. ve III. boyut ayrım analizleri için tespit edilen optimum şartlarda gerçekleştirilen, rafine ayçiçek yağı analizine ait kromatogram




**Şekil 4. 92.** II. ve III. boyut ayrım tekniğinin birlikte uygulandığı analizler için; 7.5., 8., 8.5 ve 9. dakikalar esas alınarak gerçekleştirilen rafine mısır yağı analizlerinden elde edilen kromatogramlar

| | |
|---|---|
| Numune enjeksiyonu: | 5 µL (Otomatik enjeksiyon) |
| 2nd-D HPLC kolonu: | Inertsil Sil 100A (5µm 50x4.6mm) kolon+LiChrospher 100 A Diol (5µm 75x4.6mm)+ (5µm 250x4.6mm) |
| FIA loop: | 100 µL |
| 3rd-D HPLC kolonu: | **1 adet ChromSpher 5 Lipids kolon (5µm 250x4.6mm)** |
| Akış hızı: | 1 mL/dk, |
| Sıcaklık: | 30°C, |
| ELSD programı: | Nebülizasyon sıcaklığı 80°C, Buharlaştırma sıcaklığı 40 °C, Azot gazı akış 1.5 SLM |

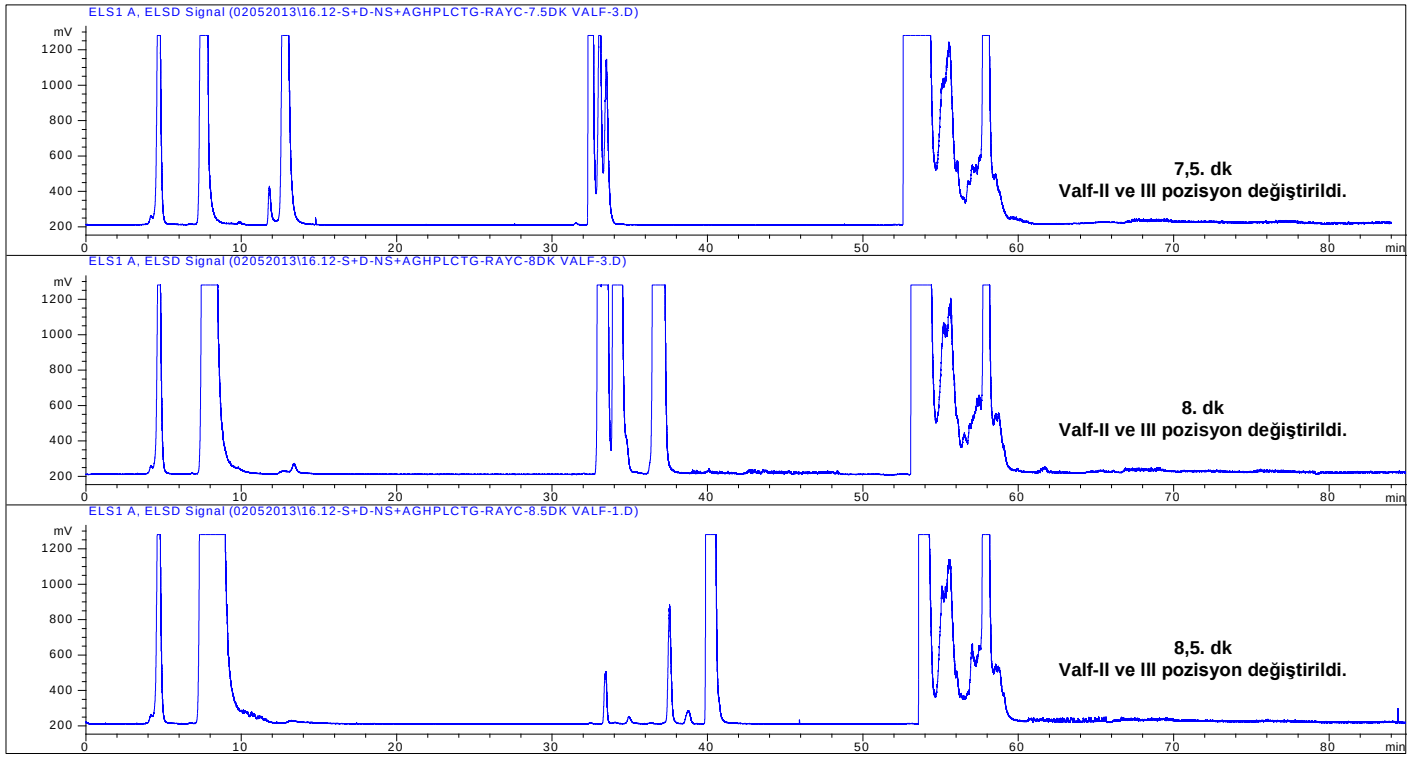
*Şekil.3.11'de yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.14.'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.




**Şekil 4. 93.** II. ve III. boyut ayrım tekniğinin birlikte uygulandığı analizler için; 6.5., 7., 7.5 ve 8. dakikalar esas alınarak gerçekleştirilen rafine kanola yağı analizlerinden elde edilen kromatogramlar

| | |
|---|---|
| Numune enjeksiyonu: | 5 µL (Otomatik enjeksiyon) |
| 2nd-D HPLC kolonu: | Inertsil Sil 100A (5µm 50x4.6mm) kolon+LiChrospher 100 A Diol (5µm 75x4.6mm)+ (5µm 250x4.6mm) |
| FIA loop: | 100 µL |
| 3rd-D HPLC kolonu: | **1 adet ChromSpher 5 Lipids kolon (5µm 250x4.6mm)** |
| Akış hızı: | 1mL/dk, |
| Sıcaklık: | 30°C, |
| ELSD programı: | Nebülizasyon sıcaklığı 80°C, Buharlaştırma sıcaklığı 40 °C, Azot gazı akış 1.5 SLM |

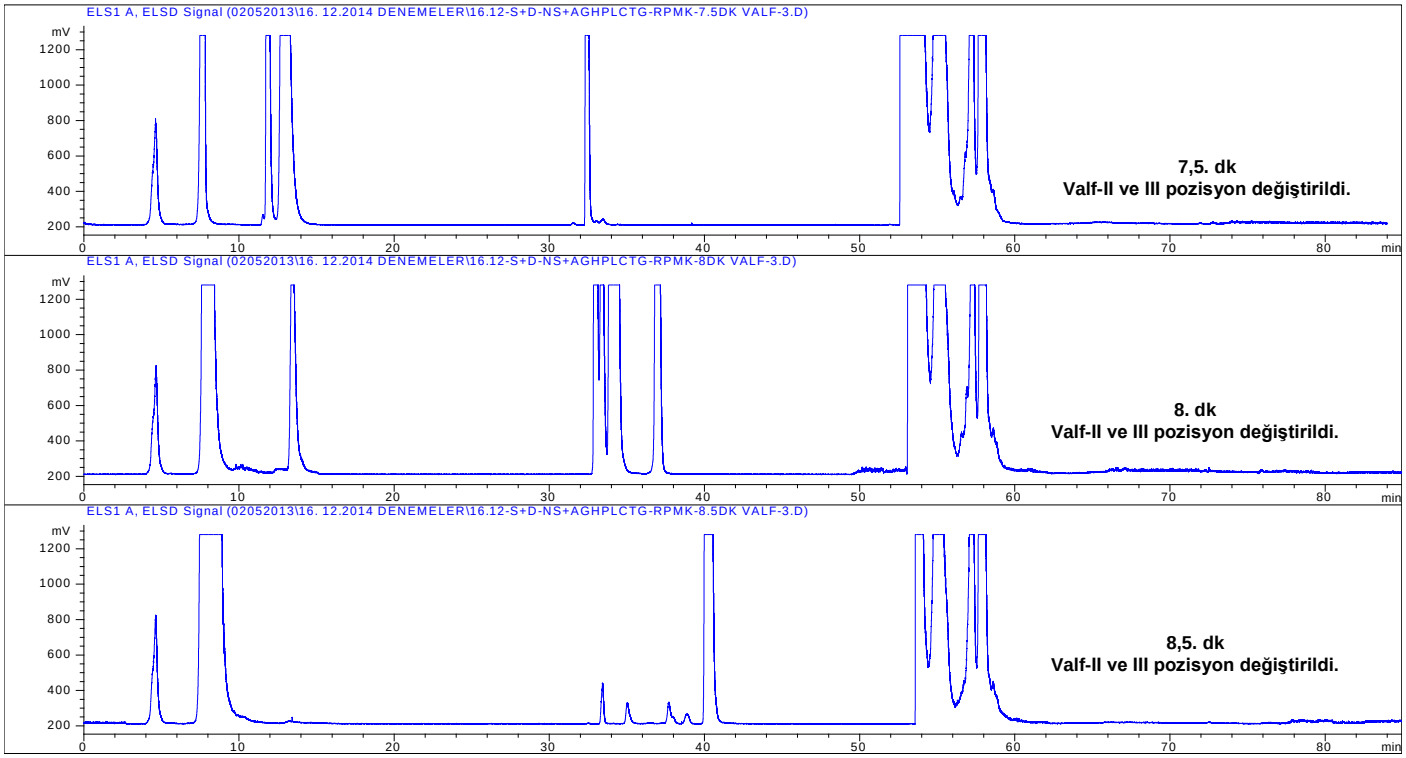
*Şekil. 3.11'de yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.14.'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.




**Şekil 4. 94.** II. ve III. boyut ayrım tekniğinin birlikte uygulandığı analizler için; 7.5., 8., 8.5 dakikalar esas alınarak gerçekleştirilen rafine ayçiçek yağı analizlerinden elde edilen kromatogramlar

| | |
|---|---|
| Numune enjeksiyonu: | 5 µL (Otomatik enjeksiyon) |
| 2nd-D HPLC kolonu: | Inertsil Sil 100A (5µm 50x4.6mm) kolon+LiChrospher 100 A Diol (5µm 75x4.6mm)+ (5µm 250x4.6mm) |
| FIA loop: | 100 µL |
| 3rd-D HPLC kolonu: | **1 adet ChromSpher 5 Lipids kolon (5µm 250x4.6mm)** |
| Akış hızı: | 1 mL/dk, |
| Sıcaklık: | 30°C, |
| ELSD programı: | Nebülizasyon sıcaklığı 80°C, Buharlaştırma sıcaklığı 40 °C, Azot gazı akış 1.5 SLM |

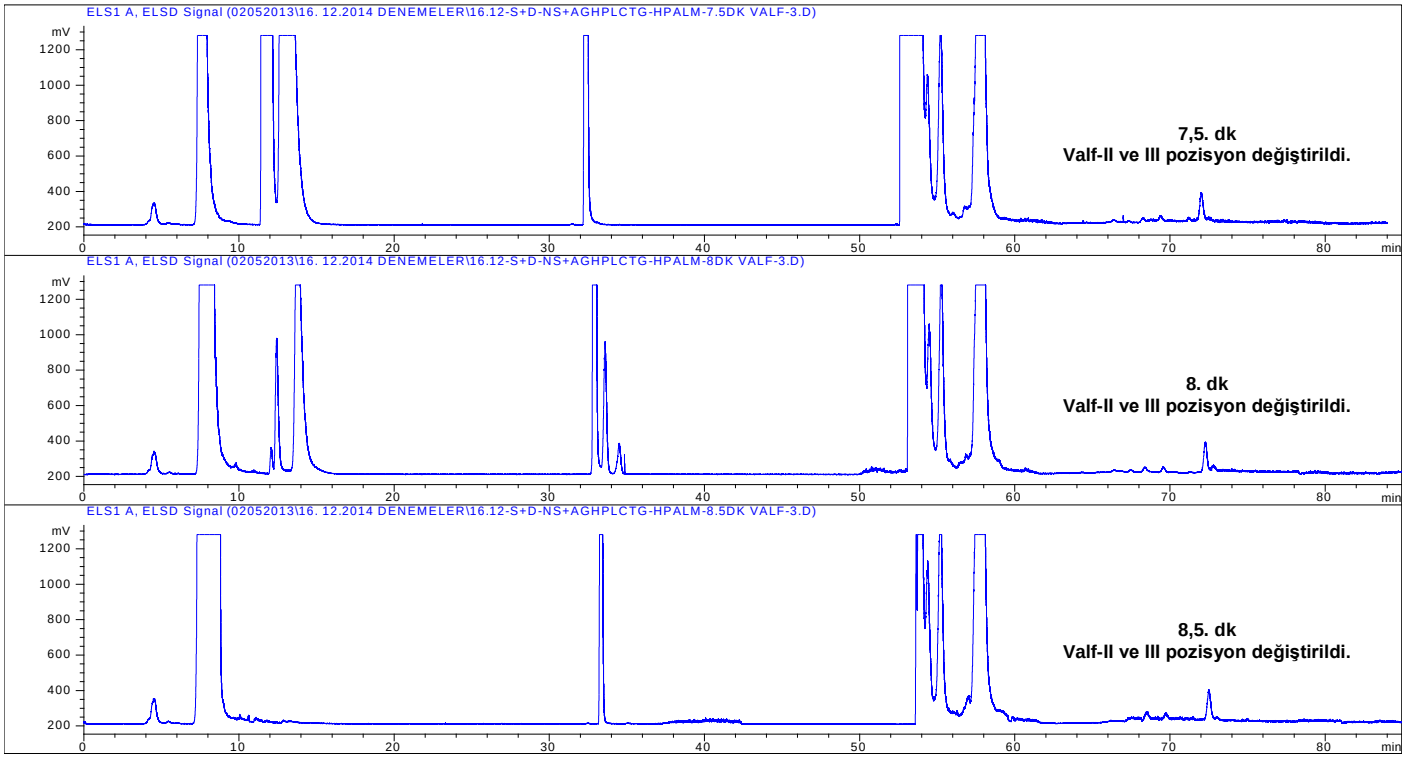
*Şekil. 3.11'de yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.14.'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.




**Şekil 4. 95.** II. ve III. boyut ayrım tekniğinin birlikte uygulandığı analizler için; 7.5., 8., 8.5 dakikalar esas alınarak gerçekleştirilen rafine pamuk yağı analizlerinden elde edilen kromatogramlar

| | |
|---|---|
| Numune enjeksiyonu: | 5 µL (Otomatik enjeksiyon) |
| 2nd-D HPLC kolonu: | Inertsil Sil 100A (5µm 50x4.6mm) kolon+LiChrospher 100 A Diol (5µm 75x4.6mm)+ (5µm 250x4.6mm) |
| FIA loop: | 100 µL |
| 3rd-D HPLC kolonu: | **1 adet ChromSpher 5 Lipids kolon (5µm 250x4.6mm)** |
| Akış hızı: | 1 mL/dk, |
| Sıcaklık: | 30°C, |
| ELSD programı: | Nebülizasyon sıcaklığı 80°C, Buharlaştırma sıcaklığı 40 °C, Azot gazı akış 1.5 SLM |

*Şekil. 3.11'de yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.14.'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.



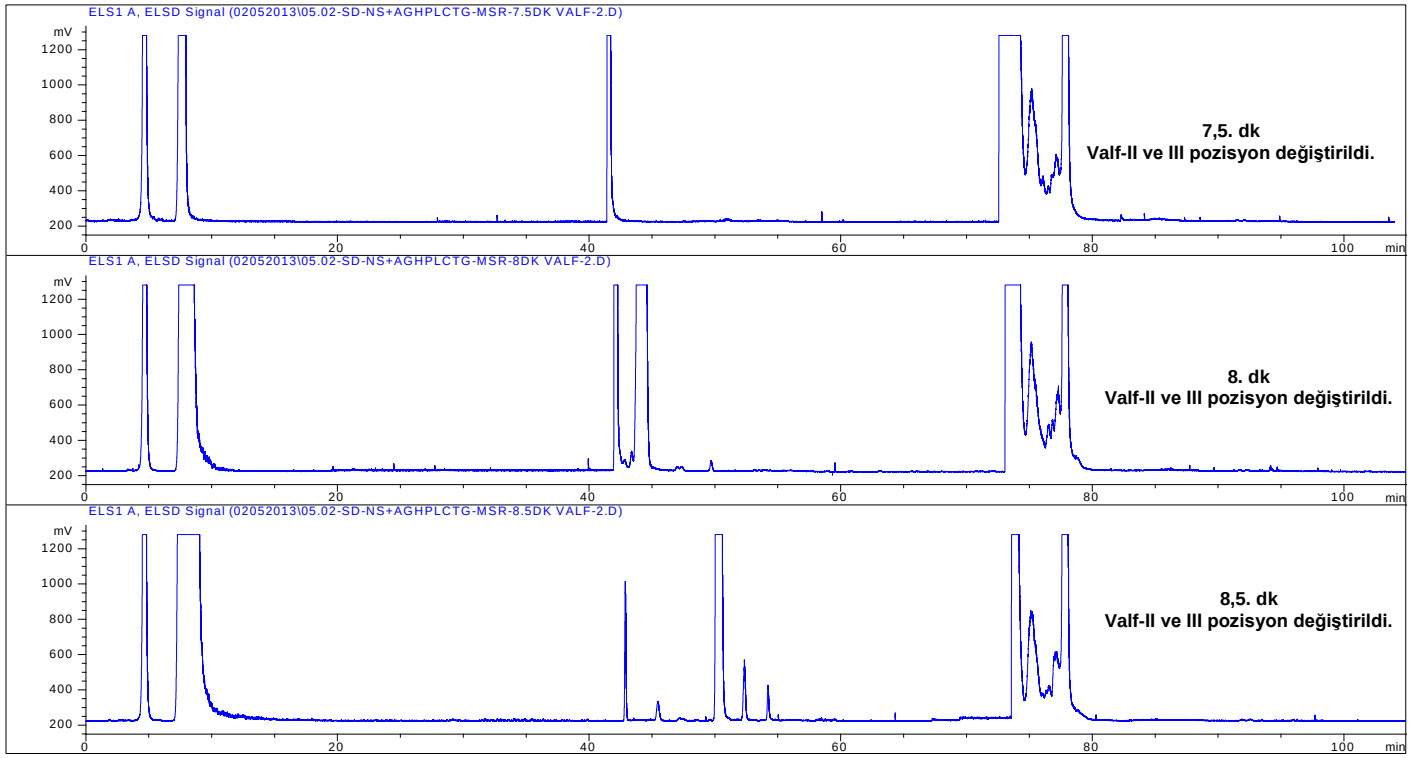

**Şekil 4. 96.** II. ve III. boyut ayrım tekniğinin birlikte uygulandığı analizler için; 7.5., 8., 8.5 dakikalar esas alınarak gerçekleştirilen palm yağı analizlerinden elde edilen kromatogramlar

| | |
|---|---|
| Numune enjeksiyonu: | 5 µL (Otomatik enjeksiyon) |
| 2nd-D HPLC kolonu: | Inertsil Sil 100A (5µm 50x4.6mm) kolon+LiChrospher 100 A Diol (5µm 75x4.6mm)+ (5µm 250x4.6mm) |
| FIA loop: | 100 µL |
| 3rd-D HPLC kolonu: | **1 adet ChromSpher 5 Lipids kolon (5µm 250x4.6mm)** |
| Akış hızı: | 1 mL/dk |
| Sıcaklık: | 30°C |
| ELSD programı: | Nebülizasyon sıcaklığı 80°C, Buharlaştırma sıcaklığı 40°C, Azot gazı akış 1.5 SLM |

*Şekil. 3.11'de yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.14.'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

NP-HPLC, FIA ve $Ag^{+}$-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı II. ve III. boyut ayrım ($2^{nd}$-D & $3^{rd}$-D) analizleri için tespit edilen metot parametreleri ile; farklı bitkisel yağ numuneleri için analizler gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kromatogramlar incelendiğinde; mısır yağı, kanola yağı, ayçiçek yağı, pamuk yağı ve palm yağı için en uygun valf programlamasının, sırasıyla 8,5.; 8,0.; 8,5.; 8,0. ve 8,0. dakikalar olduğu görülmektedir.

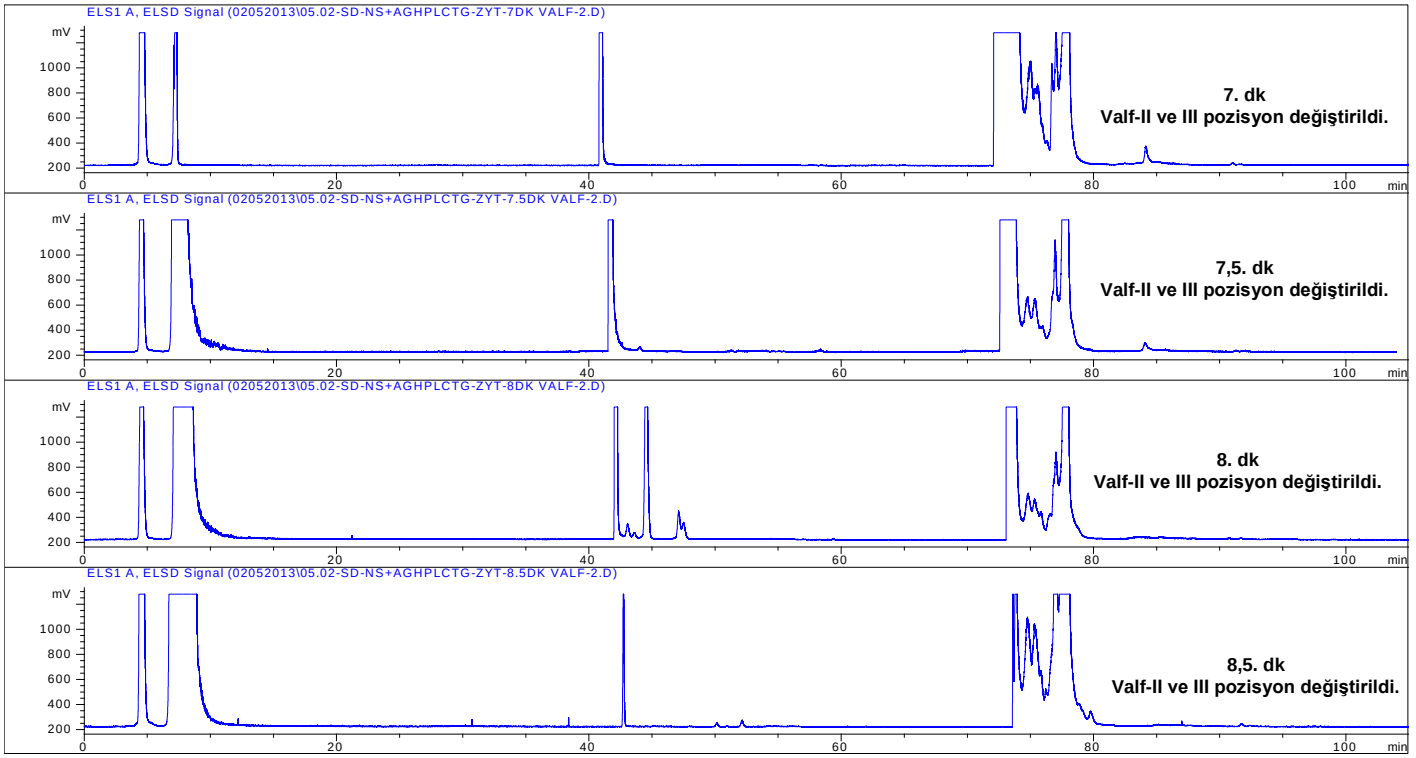
III. boyut ayrım aşamasında kullanılan ChromSpher 5 Lipids kolon (5µm 250x4.6mm) ile verimli sonuçlar elde edilmesinin ardından; aynı kolonun çift kolon şeklinde kullanılmasıyla ayırma verimliliği artırılmaya çalışılmıştır. Bu amaçla yürütülen çalışmalardan elde edilen kromatogramlar; Şekil 4.97, 4.98, 4.99, 4.100, 4.101 ve 4.102'de verilmiştir.




**Şekil 4. 97.** II. ve III. boyut ayrım tekniğinin birlikte uygulandığı analizler için; 7.5., 8., 8.5 dakikalar esas alınarak gerçekleştirilen mısır yağı analizlerinden elde edilen kromatogramlar

| | |
|---|---|
| Numune enjeksiyonu: | 5 µL (Otomatik enjeksiyon) |
| 2nd-D HPLC kolonu: | Inertsil Sil 100A (5µm 50x4.6mm) kolon+LiChrospher 100 A Diol (5µm 75x4.6mm)+ (5µm 250x4.6mm) |
| FIA loop: | 100 µL |
| 3rd-D HPLC kolonu: | **2 adet ChromSpher 5 Lipids kolon (5µm 250x4.6mm)** |
| Akış hızı: | 1 mL/dk, |
| Sıcaklık: | 30°C, |
| ELSD programı: | Neb sıcaklığı 80°C, Buh sıcaklığı 40 °C, Azot gazı akış 1.5 SLM |

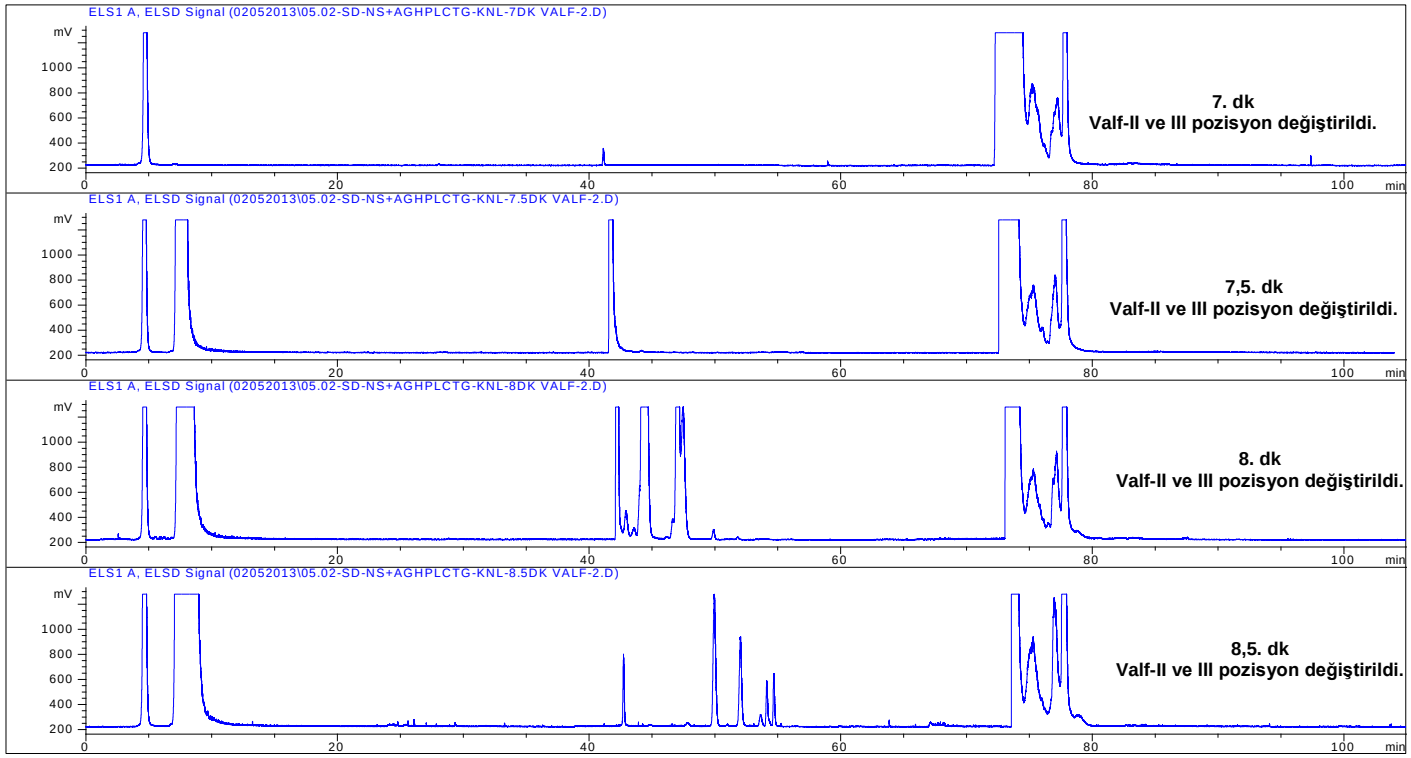
*Şekil. 3.11'de yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.14.'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.




**Şekil 4. 98.** II. ve III. boyut ayrım tekniğinin birlikte uygulandığı analizler için; 7, 7.5., 8., 8.5 dakikalar esas alınarak gerçekleştirilen riviera zeytinyağı analizlerinden elde edilen kromatogramlar

| | |
|---|---|
| Numune enjeksiyonu: | 5 µL (Otomatik enjeksiyon) |
| 2nd-D HPLC kolonu: | Inertsil Sil 100A (5µm 50x4.6mm) kolon+LiChrospher 100 A Diol (5µm 75x4.6mm)+ (5µm 250x4.6mm) |
| FIA loop: | 100 µL |
| 3rd-D HPLC kolonu: | **2 adet ChromSpher 5 Lipids kolon (5µm 250x4.6mm)** |
| Akış hızı: | 1 mL/dk, |
| Sıcaklık: | 30°C, |
| ELSD programı: | Nebülizasyon sıcaklığı 80°C, Buharlaştırma sıcaklığı 40 °C, Azot gazı akış 1.5 SLM |

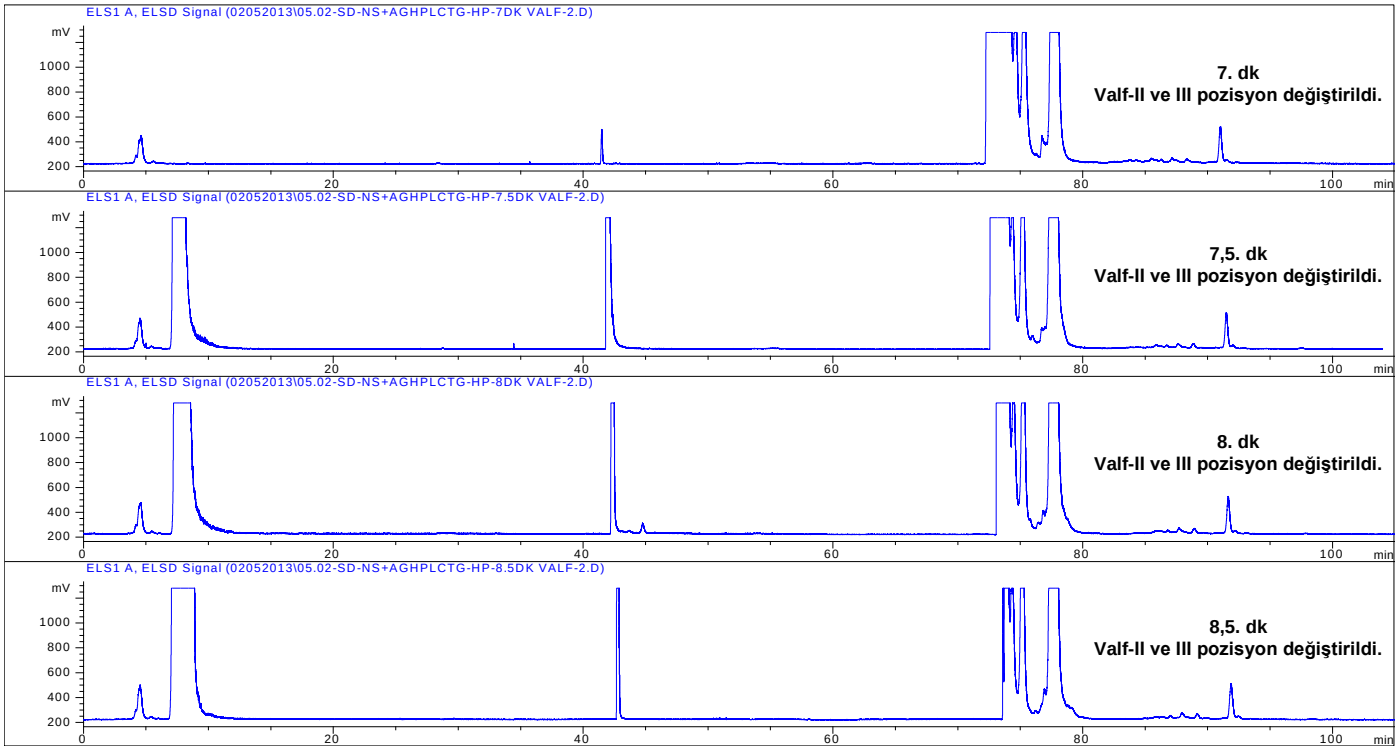
*Şekil. 3.11'de yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.14.'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.




**Şekil 4. 99.** II. ve III. boyut ayrım tekniğinin birlikte uygulandığı analizler için; 7., 7.5., 8., 8.5 dakikalar esas alınarak gerçekleştirilen rafine kanola yağı analizlerinden elde edilen kromatogramlar

| | |
|---|---|
| Numune enjeksiyonu: | 5 µL (Otomatik enjeksiyon) |
| 2nd-D HPLC kolonu: | Inertsil Sil 100A (5µm 50x4.6mm) kolon+LiChrospher 100 A Diol (5µm 75x4.6mm)+ (5µm 250x4.6mm) |
| FIA loop: | 100 µL |
| 3rd-D HPLC kolonu: | **2 adet ChromSpher 5 Lipids kolon (5µm 250x4.6mm)** |
| Akış hızı: | 1 mL/dk, |
| Sıcaklık: | 30°C, |
| ELSD programı: | Nebülizasyon sıcaklığı 80°C, Buharlaştırma sıcaklığı 40 °C, Azot gazı akış 1.5 SLM |

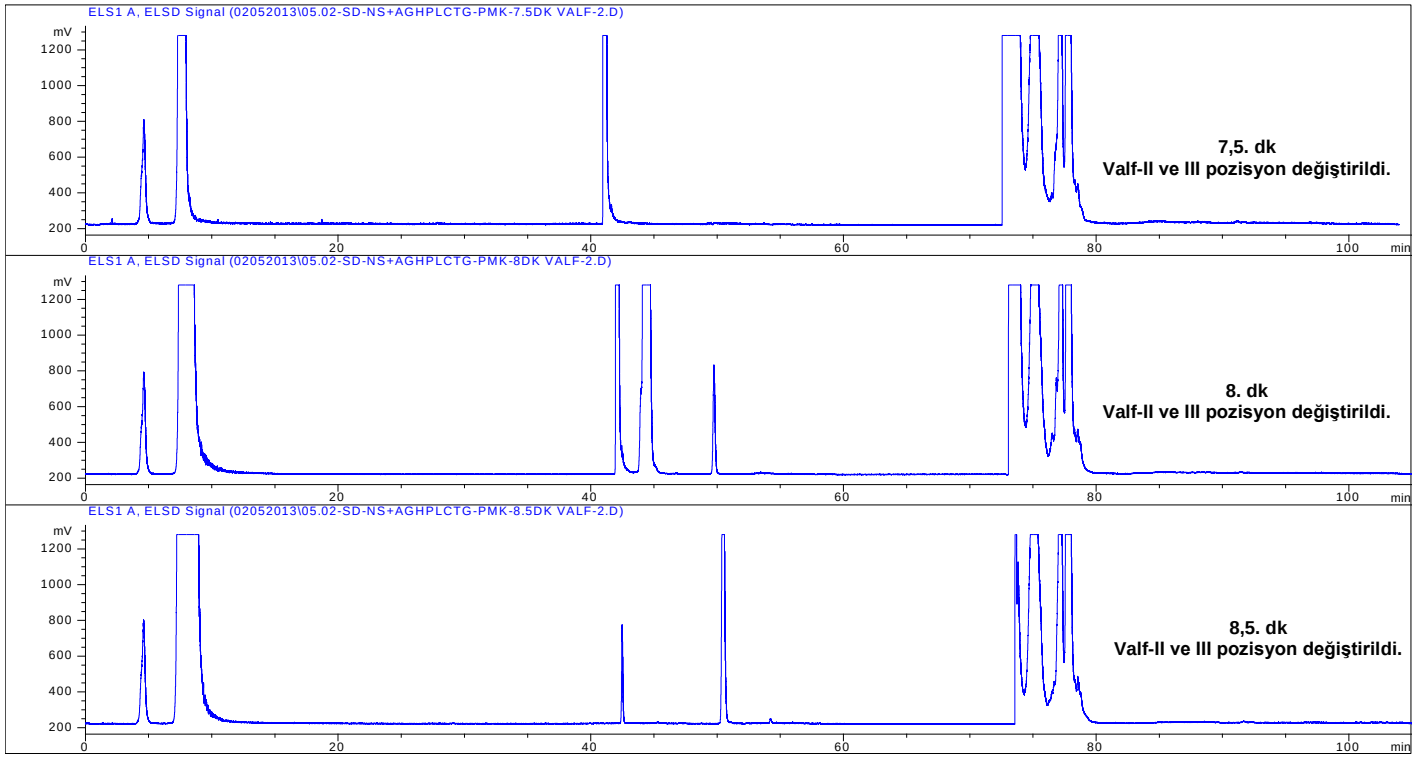
*Şekil. 3.11'de yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.14.'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.




**Şekil 4. 100.** II. ve III. boyut ayrım tekniğinin birlikte uygulandığı analizler için; 7.5., 8., 8.5 dakikalar esas alınarak gerçekleştirilen palm yağı analizlerinden elde edilen kromatogramlar

| | |
|---|---|
| Numune enjeksiyonu: | 5 µL (Otomatik enjeksiyon) |
| 2nd-D HPLC kolonu: | Inertsil Sil 100A (5µm 50x4.6mm) kolon+LiChrospher 100 A Diol (5µm 75x4.6mm)+ (5µm 250x4.6mm) |
| FIA loop: | 100 µL |
| 3rd-D HPLC kolonu: | **2 adet ChromSpher 5 Lipids kolon (5µm 250x4.6mm)** |
| Akış hızı: | 1 mL/dk, |
| Sıcaklık: | 30°C, |
| ELSD programı: | Nebülizasyon sıcaklığı 80°C, Buharlaştırma sıcaklığı 40 °C, Azot gazı akış 1.5 SLM |

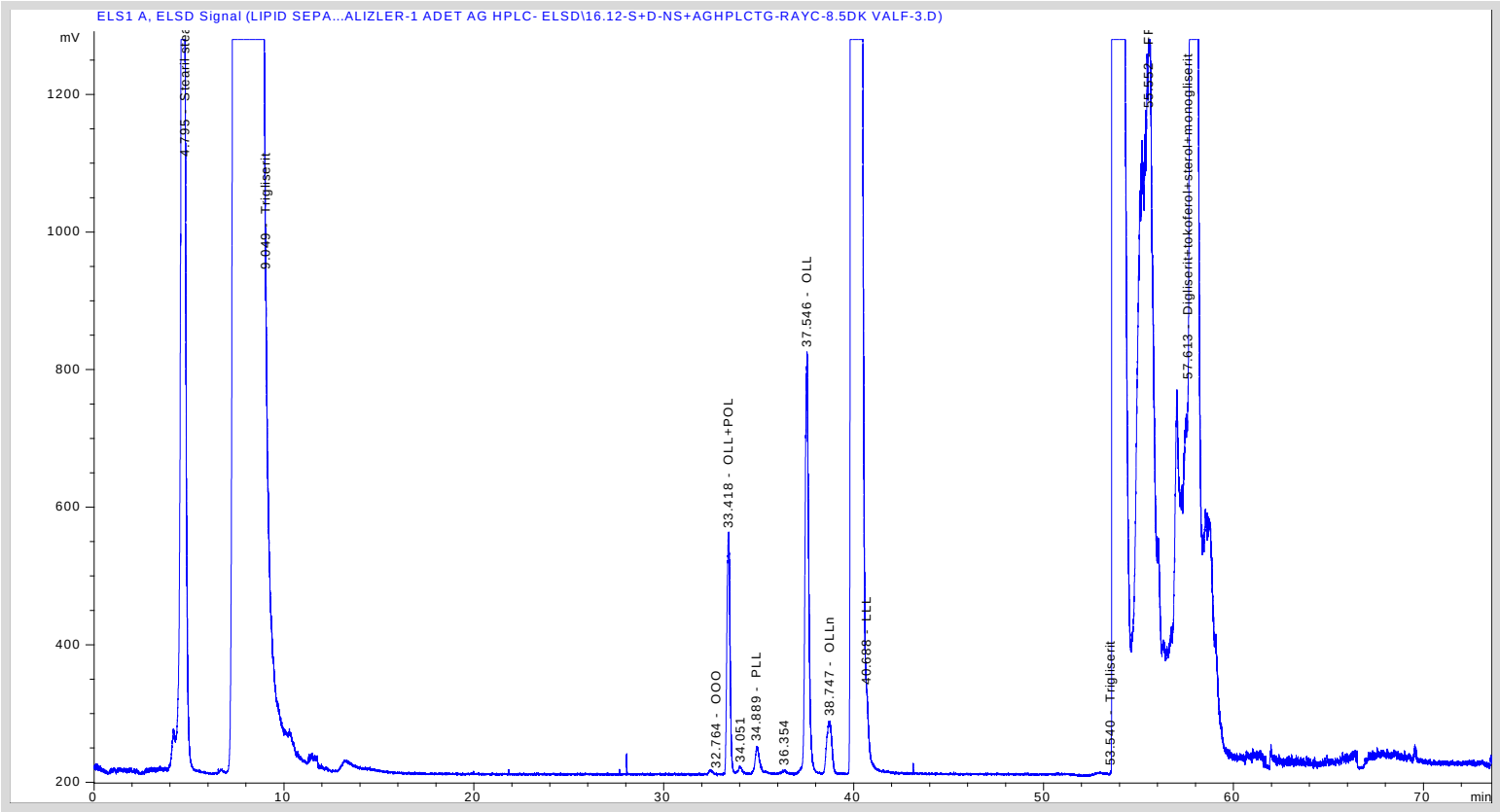
*Şekil. 3.11'de yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.14.'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.




**Şekil 4. 101.** II. ve III. boyut ayrım tekniğinin birlikte uygulandığı analizler için; 7.5., 8., 8.5 dakikalar esas alınarak gerçekleştirilen rafine pamuk yağı analizlerinden elde edilen kromatogramlar

| | |
|---|---|
| Numune enjeksiyonu: | 5 µL (Otomatik enjeksiyon) |
| 2nd-D HPLC kolonu: | Inertsil Sil 100A (5µm 50x4.6mm) kolon+LiChrospher 100 A Diol (5µm 75x4.6mm)+ (5µm 250x4.6mm) |
| FIA loop: | 100 µL |
| 3rd-D HPLC kolonu: | **2 adet ChromSpher 5 Lipids kolon (5µm 250x4.6mm)** |
| Akış hızı: | 1 mL/dk, |
| Sıcaklık: | 30°C, |
| ELSD programı: | Nebülizasyon sıcaklığı 80°C, Buharlaştırma sıcaklığı 40 °C, Azot gazı akış 1.5 SLM |

*Şekil. 3.11'de yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.14.'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.




**Şekil 4. 102.** NP-HPLC, FIA ve $Ag^{+}$-HPLC tekniklerinin birleştirilerek uygulandığı II. ve III. boyut ayrım analizleri için tespit edilen optimum şartlarda gerçekleştirilen, rafine ayçiçek yağı analizine ait kromatogram

| | |
|---|---|
| **Numune çözücüsü:** | Hekzan |
| **Numune enjeksiyonu:** | 5 µL (0,1 mg/µL yağ numunesi) |
| **2nd-D HPLC kolon:** | Sil 100A 5µm 50x4.6mm Inertsil + LiChrospher 100 Diol 5µm 75x4.6mm+ LiChrospher 100 Diol 5µm 250x4.6mm kolon |
| **FIA loop:** | 100 µL |
| **3rd-D HPLC kolon:** | ChromSpher 5 Lipids kolon (5µm 250x4.6mm) |
| **Akış hızı:** | 1 mL/dk , **Sıcaklık:** 30°C, **ELSD programı:** Neb. sıcaklığı 80°C, Buh.sıcaklığı 40°C, Azot gazı akış 1.5 SLM |

*Şekil. 3.11'de yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.14.'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

### 4.1.6. SPE, NP-HPLC, FIA ve $Ag^+$-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı I., II. ve III. boyut ayrım ($1^{st}$-D & $2^{nd}$-D & $3^{rd}$-D) analizleri

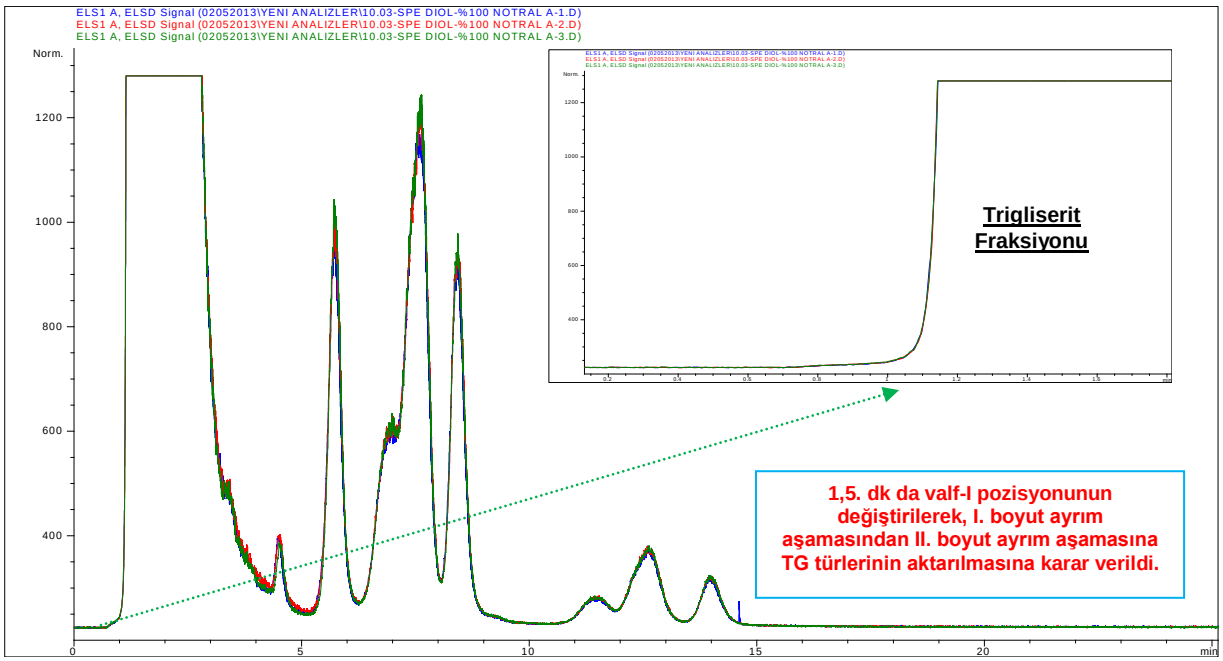
On-line SPE-FIA-HPLC birleştirilmiş yağ analiz sistemi üzerinde yürütülen nihai birleştirilmiş sistem uygulaması, " *SPE, NP-HPLC, FIA ve $Ag^+$-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı I., II. ve III. boyut ayrım ($1^{st}$-D & $2^{nd}$-D & $3^{rd}$-D) analizleri*"dir. SPE, NP-HPLC, FIA ve $Ag^+$-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı I., II. ve III. boyut ayrım (1st-D & 2nd-D & 3rd-D) analizleri; 5 temel aşamanın sırasıyla uygulanması ve tek metot programında birleştirilmesiyle gerçekleştirilmektedir. Her bir boyut ayrım aşaması ve birleştirilmiş analiz sistemi uygulamalarında tespit edilen optimum deney parametrelerinden faydalanılarak, metot programlamaları oluşturulmuştur. Oluşturulan program kapsamında; diol yapılı $1^{st}$-D SPE kolondan toplu şekilde elue edilen nötral lipit fraksiyonun öncelikle $2^{nd}$-D HPLC kolona aktarımı, daha sonra diol yapılı $2^{nd}$-D HPLC kolon ile, içerisinde mevcut olan *trigliserit, tokol, FFA, sterol, digliserit* ve *monogliserit* türlerine ayrımı sağlanmaktadır. Fraksiyonlar halinde ayrımı sağlanan bu türlerden, yağların temel bileşeni olan trigliserit fraksiyonunun valf-III (10PT/2PS) üzerine adapte edilen FIA loop sistemlerine yönlendirilmesi/toplanması sağlanmaktadır. Loop sisteminde toplanan trigliserit fraksiyonunun, ChromSpher 5 Lipids (5µm 250x4.6mm) $3^{rd}$-D HPLC kolonu üzerinde bileşenlerine ayrımının sağlanmasıyla birlikte, türlerin 3 boyutlu ayrımı ve tayini tamamlanmış olur. Daha sonraki aşamalarında ise; $2^{nd}$-D HPLC kolon ve $1^{st}$-D SPE kolon da tayin edilmeden kalan türlerin sırayla elue edilmeleri sağlanmaktadır.

Şekil 3.12-3.16'da yer alan sistem işleyişleri ve Çizelge 3.15'de yer alan metot parametreleri kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir. Şekil.3.12-16'da yer alan sistem işleyişlerinden görüleceği üzere; uygun bir çözücü ile hazırlanan yağ numunesi, gradient pompa **(I)** ve otomatik enjektör **(II)** vasıtasıyla sisteme enjekte edilmiştir. Enjeksiyon işleminin ardından termostatlı kolon fırınından geçen karışım, seçilen uygun pozisyon ile yönlendirme valfi (6PT/2PS) **(III)** üzerine adapte edilen diol yapılı SPE kolonuna **(IV)** yönlendirmiştir. %100 nötral lipit A çözücü sistemi kullanılarak oluşturulan başlangıç programı sayesinde; nötral lipit bileşenlerinin SPE kolon **(IV)** üzerinden toplu şeklinde ayrımı sağlanmıştır. "***I. boyut ayrım analizleri***" olarak adlandırılan bu aşama ile; yağlarda mevcut nötral lipitlerin (*trigliserit, tokoferol, tokotrienol, FFA, sterol, digliserit, monogliserit, ester bileşikleri*), polar lipitlerden (*fosfolipitler*) tamamen ayrımı sağlanmıştır. SPE kolon **(IV)** üzerinde izole edilen toplu

haldeki nötral lipit fraksiyonu, ELS dedektörde **(VII)** gözlemlendiği anda, valf-I (6PT/2PS) **(III)** ve valf-II (6PT/2PS) **(V)** sistemlerinin pozisyonları değiştirilmiştir. Valf pozisyonlarının değişmesi ile; SPE kolon **(IV)** üzerinde devam eden I. boyut ayrım analizinin, nötral lipit fraksiyonun tamamen izole edildiği, polar fraksiyonun ise ileriki aşamada ayrımı sağlanmak üzere kolonda bırakıldığı aşamada kesilmesi/ara verilmesi sağlanmıştır. Bu esnada; valf-II (6PT/2PS) **(V)** ve $2^{nd}$-D HPLC kolon **(VIII)** arasında kullanılan akış yolunda bulunan nötral lipit fraksiyonu, devam eden akışla birlikte II. boyut ayrım analizlerinin gerçekleştirildiği $2^{nd}$-D HPLC kolonuna **(VIII)** ulaşması sağlanmıştır. Nötral lipit fraksiyonun, $2^{nd}$-D HPLC kolonuna **(VIII)** ulaşmasıyla birlikte; ***"II. boyut ayrım aşaması"***na tamamen geçiş sağlanmıştır. II. boyut ayrım aşamasında; pompa **(I)** üzerinde oluşturulan yeni bir gradient program ile, nötral lipit çözücü sistemi/ hareketli faz karışımı sisteme gönderilmiştir. Valf-I (6PT/2PS) **(III)** ve valf-II (6PT/2PS) **(V)** sistemleri için seçilen uygun pozisyonlarla sağlanan bu işlem ile; $2^{nd}$-D HPLC kolonu **(VIII)** üzerinde nötral lipit fraksiyondaki türlerin ayrımı sağlanmıştır. II. boyut ayrım aşamasında elde edilen veriler/ kromatogramlar; I. boyut ayrımda olduğu gibi ELS dedektörde **(VII)** gözlenmekte ve alıkonma süreleri tespit edilmiştir. ELSD sisteminde **(VII)**; trigliserit, tokoferol, tokotrienol, FFA, sterol, digliserit, ester ve monogliserit piklerine ait alıkonma sürelerinin tespitinin ardından; bu türlerin her birisinde mevcut izomerlerin/ türlerin ayrım aşamasına, yani "***III. boyut ayrım analizleri***"ne geçiş yapılmıştır. III. boyut ayrım analizleri için öncelikle; $2^{nd}$-D HPLC kolonu **(VIII)** ile ayrımı sağlanan nötral lipitlerin alıkonma süreleri dikkate alınarak, sırayla valf-III (10PT/2PS) **(IX)** üzerine adapte edilen FIA loop sistemlerine **(XI)** yönlendirilmesi ve fraksiyonlar şeklinde toplanması sağlanmıştır. Loop sistemlerine **(XI)** nötral lipit fraksiyonlarından trigliserit türünün, toplanmaya başlaması ile; valf-III (10PT/2PS) **(IX)** pozisyonu değiştirilmiş, pompa **(I)** durdurulmuş ve pompa **(X)**'nın işler hale gelmesi sağlanmıştır. Loop sistemlerinde toplanan trigliserit lipit türlerinin, uygun özellikteki kolonda kendi izomerlerine/ türlerine ayrımını sağlayacak uygun hareketli faz sistemleri gradient pompa **(X)** yardımıyla gönderilmiştir. III. boyut ayrım analizlerinin, TG bileşenlerinin ayrım aşamasına uygulanmasının ardından; $2^{nd}$-D HPLC kolon **(VIII)** ve SPE kolon **(IV)** üzerinde kalan lipit türlerinin analizi için sistemin, ilk halindeki programlamaya geçişi sağlanmıştır. Sistem işleyişinin değişmesiyle birlikte; gerekli görülen kısımlar için, tekrar optimizasyon uygulamalarına gerek olduğu düşünülmüştür. Analizlerde; valf sistemi pozisyonlarının değiştirilme sürelerine ilişkin optimizasyon çalışmaları yürütülmüştür.

### 4.1.6.1. Valf pozisyonlarının değiştirilme sürelerinin etkisi

SPE, NP-HPLC, FIA ve Ag+-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı I., II. ve III. boyut ayrım (1st-D & 2nd-D & 3rd-D) analizlerinde; TG fraksiyonlarının bir sonraki ayrım aşamasına aktarılma prosedürlerinin iyileştirilmesi amacıyla, yönlendirme valf sistemlerinin pozisyonlarının değiştirilme sürelerine ilişkin optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. I. boyut ayrım aşamasından II. boyut ayrım aşamasına geçiş süresinin tespiti için; Şekil 3.12'de yer alan sistem işleyişi kullanılmış, ve aşamada 2$^{nd}$-D HPLC kolon girişindeki bağlantı elemanı direk ELSD sistemine takılmıştır. Rafine mısır yağı kullanılarak gerçekleştirilen analizlerde; sabit ve hareketli fazlar arasındaki farklılıkların oluşmaması için uygun sistemler kullanılmıştır. Elde edilen kromatogram, Şekil 4.103'da verilmiştir.

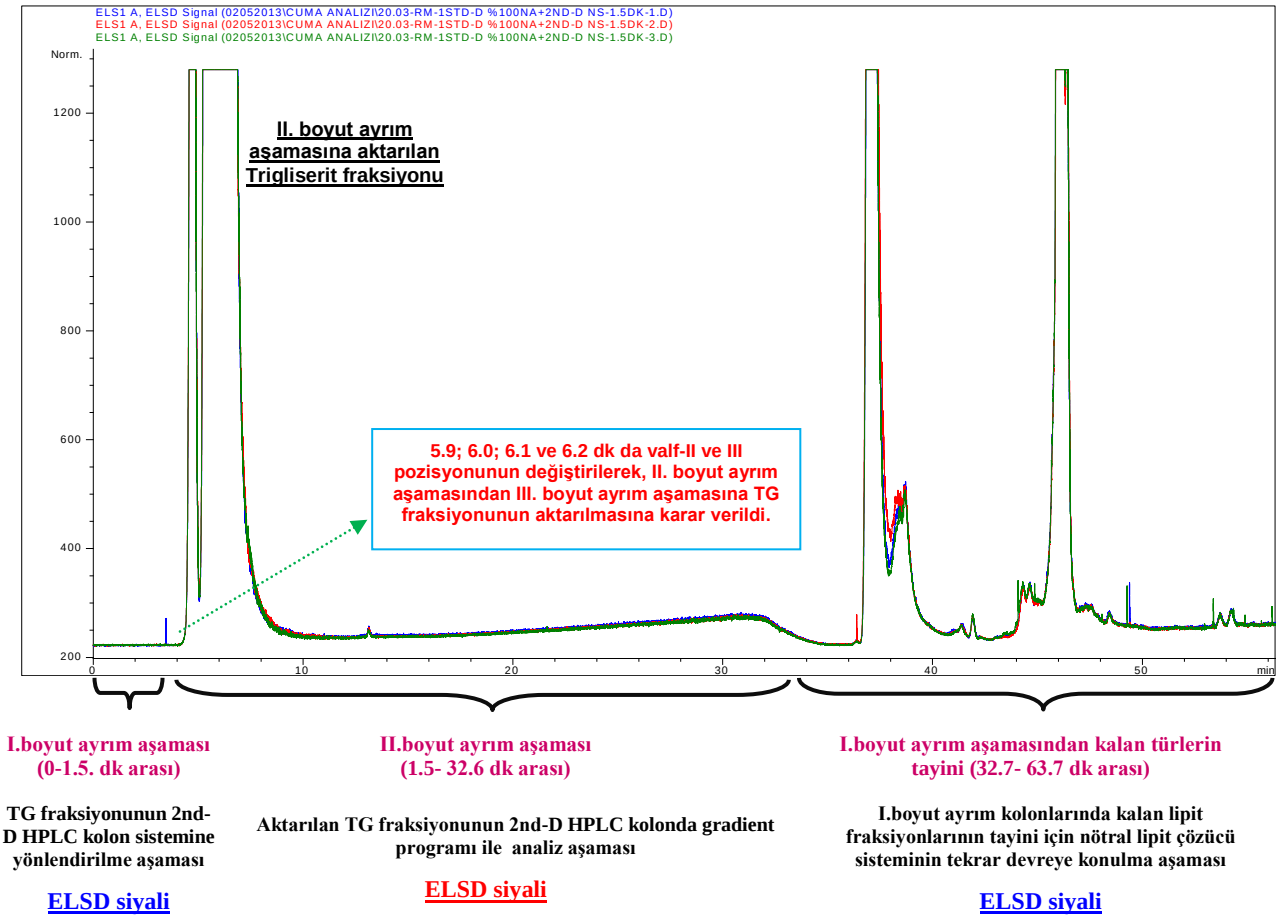



**Şekil 4. 103.** I. boyut ayrım aşamasından II. boyut ayrım aşamasına TG türlerinin aktarım süresinin tespiti için; Şekil 3.12'deki sistem işleyişine göre analiz edilen rafine mısır yağı numunesine ait kromatogram

| | |
|---|---|
| Numune enjeksiyonu: | 5 µL (Otomatik enjeksiyon) |
| Hareketli faz türü: | **%100 Nötral A çözücü sistemi (Hekzan: asetik asit (99:1.0, v/v/v))** |
| 1st-D SPE kolonu: | **LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm)** |
| Akış hızı: | 1 mL/dk, |
| Sıcaklık: | 35°C |
| ELSD programı: | Neb. sıcaklığı 80°C, Buh. sıcaklığı 40 °C, Azot gazı akış 1.5 SLM |

* Şekil.3.12.'de yer alan sistem akışı ve Çizelge 3.15.'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

Şekil 4.103'de yer alan kromatogramdan görüleceği üzere; 1,5. dakikada valf-I pozisyonunun değiştirilmesiyle; I. boyut ayrım aşamasından II. boyut ayrım aşamasına TG türlerinin aktarılmasının sağlanabileceği görülmektedir. I. boyut ayrım aşamasından II. boyut ayrım aşamasına geçiş süresi 1,5 dakika olarak sabit tutulmuş ve II. boyut ayrım aşamasından III. boyut ayrım aşamasına geçiş süresinin tespiti için analizler gerçekleştirilmiştir. II. boyut ayrım aşamasından III. boyut ayrım aşamasına geçiş süresinin tespiti için ise; Şekil 3.13'de yer alan sistem işleyişi kullanılmış, ve 10PT/2PS valf-III sisteminin 1 nolu girişindeki bağlantı elemanı yani loop sistemi girişi direk ELSD sistemine takılmıştır. Rafine mısır yağı kullanılarak gerçekleştirilen analizler de; sabit ve hareketli fazlar arasındaki farklılıkların oluşmaması için uygun sistemler kullanılmış ve elde edilen kromatogram Şekil 4.104'de verilmiştir.



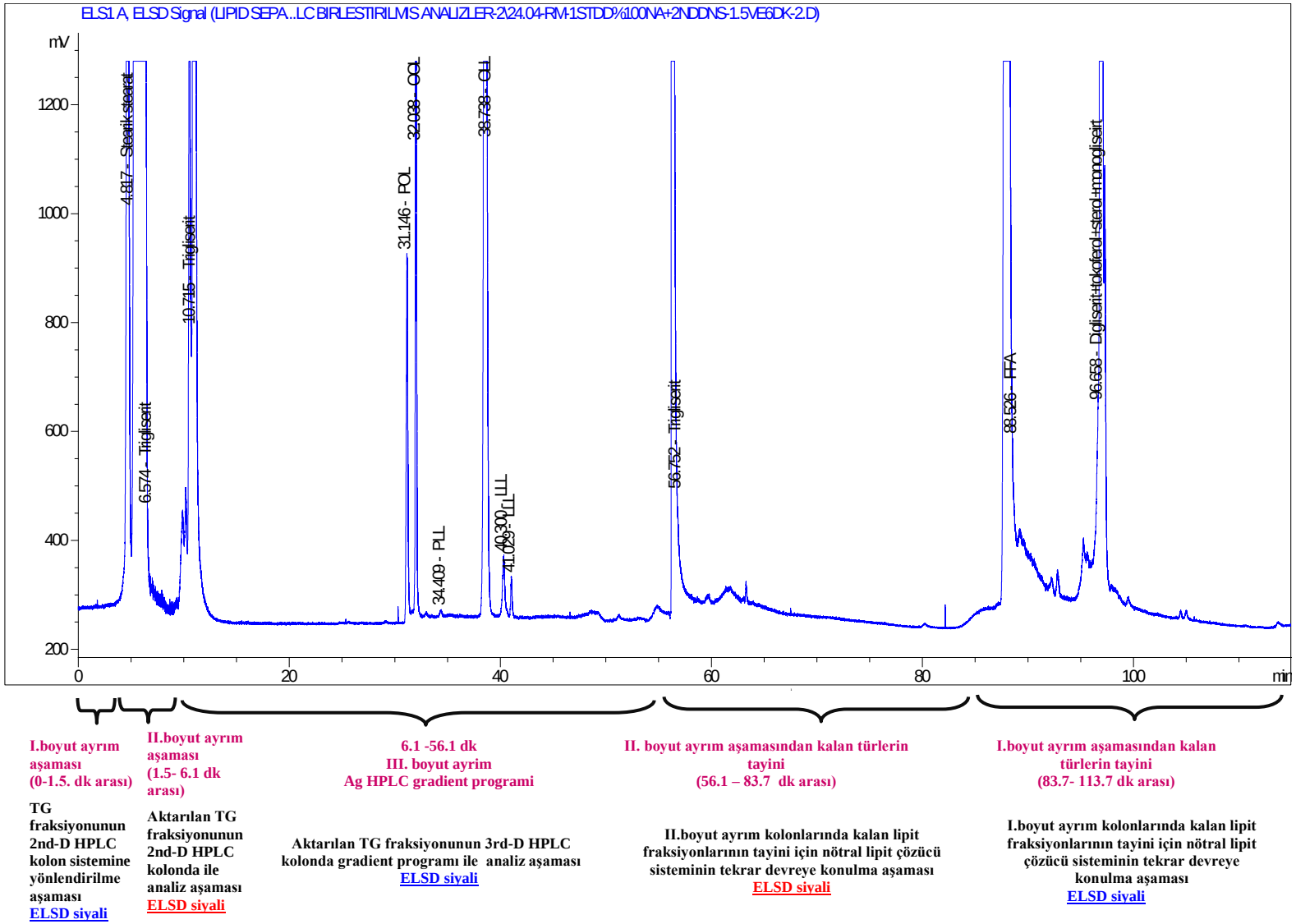

**Şekil 4. 104.** II. boyut ayrım aşamasından III. boyut ayrım aşamasına TG türlerinin aktarım süresinin tespiti için; Şekil 3.12'deki sistem işleyişine göre analiz edilen rafine mısır yağı numunesi analizi

Numune enjeksiyonu: 5 µL (Otomatik enjeksiyon)
1st-D SPE kolonu: **LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm)**
2nd-D HPLC kolonu: **LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm)+(5µm 250x4.6mm)**
Akış hızı: 1 mL/dk,

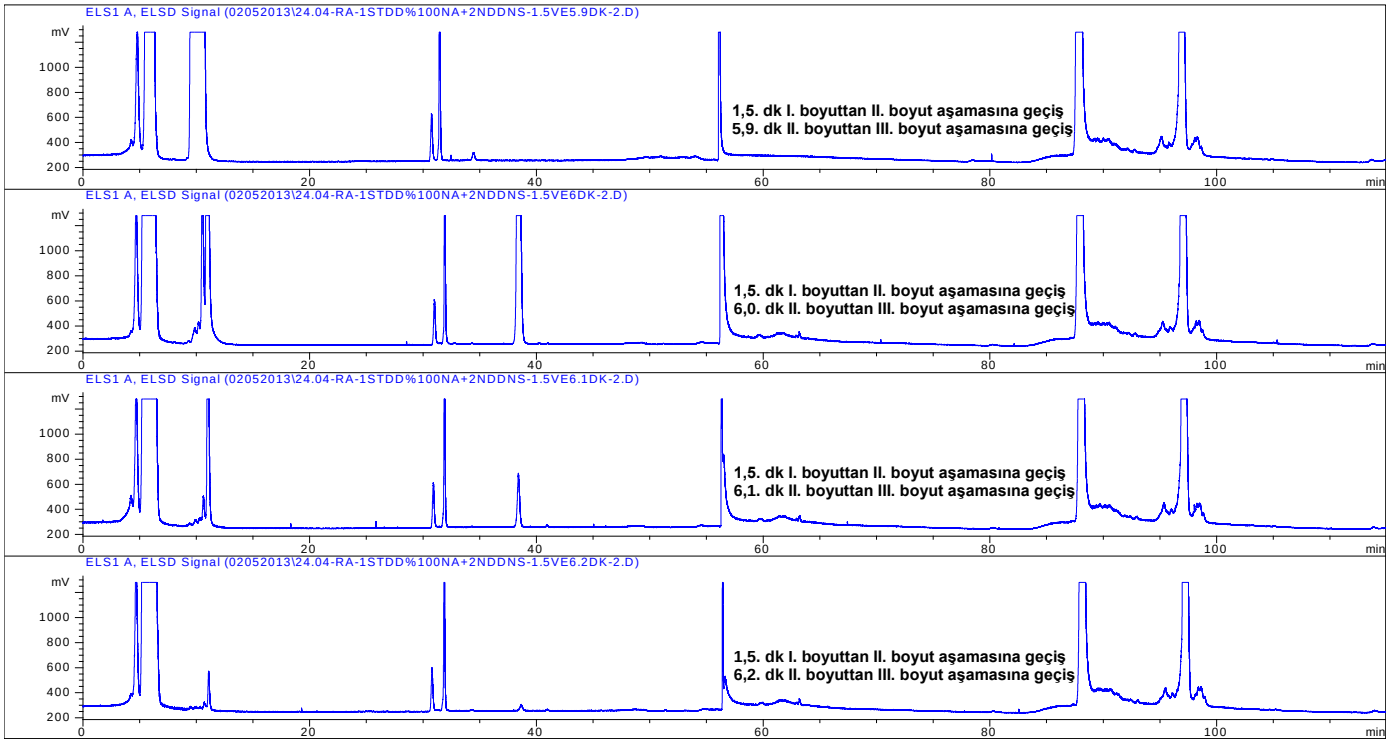
| | |
|---|---|
| Sıcaklık: | 35°C, |
| ELSD programı: | Nebülizasyon sıcaklığı 80°C, Buharlaştırma sıcaklığı 40 °C, Azot akış 1.5 SLM |

II. boyut ayrım aşamasından III. boyut ayrım aşamasına geçiş süresinin tespiti için; Şekil 3.12, 3.13, 3.14, 3.15 ve 3.16'da yer alan analiz sisteminde, yönlendirme valf sistemleri II ve III'e ait pozisyonlarının değiştirilme sürelerine ilişkin optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Trigliserit türlerinin loop sistemlerinde toplanma sürelerine göre valf pozisyonları için farklı süreler belirlenmiş (Şekil 4.104), metotlar oluşturulmuş ve farklı yağ numuneleri için analizler gerçekleştirilmiştir.

Şekil 3.12, 3.13, 3.14, 3.15 ve 3.16'da yer alan sistem işleyişi kullanılarak; rafine ayçiçek, mısır, kanola, pamuk, zeytinyağı ve palm yağı için analizler gerçekleştirilmiştir. 5,9.; 6,0.; 6,1. ve 6,2. dakikalar esas alınarak gerçekleştirilen analizler sonucu elde edilen kromatogramlar, karşılaştırmalı olarak Şekil 4.105, 4.106, 4.107, 4.108, 4.109 ve 4.110'da verilmiştir.



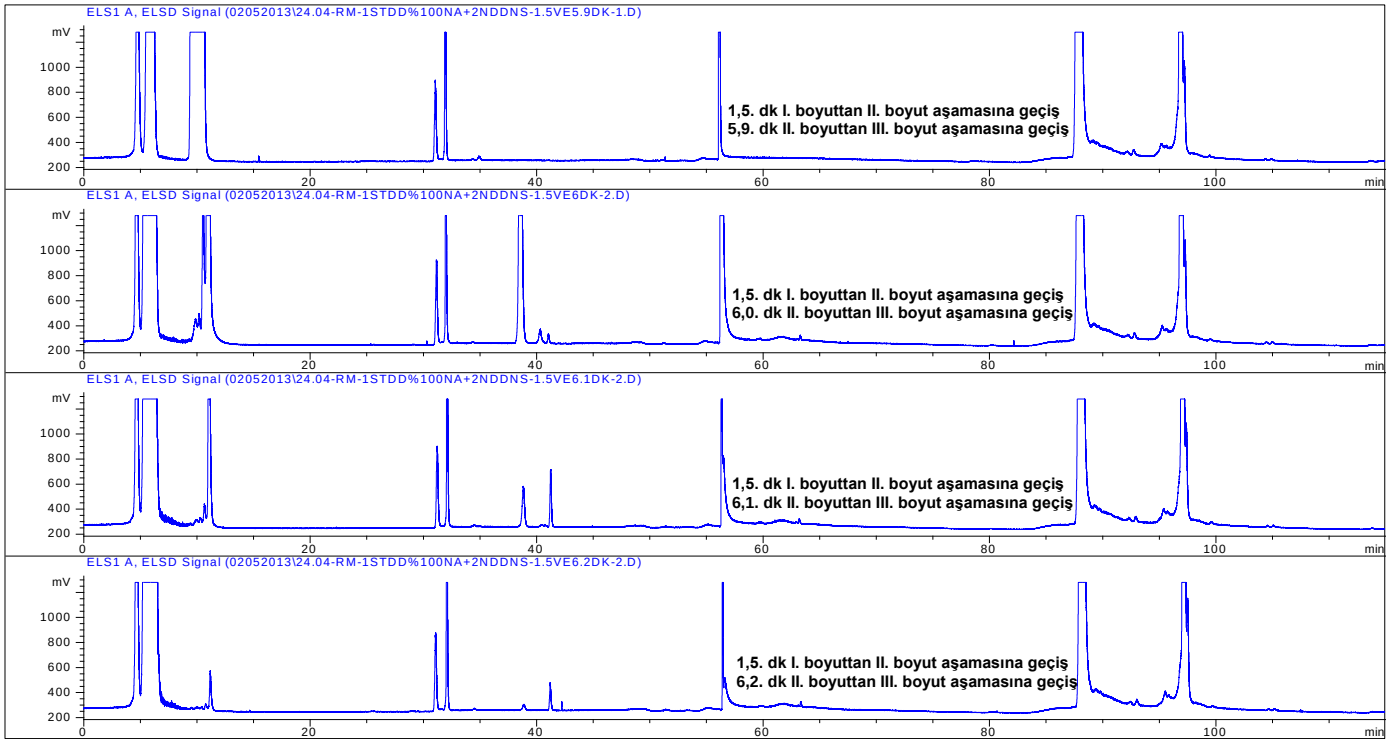

**Şekil 4. 98.** SPE, NP-HPLC, FIA ve Ag+-HPLC tekniklerinin birleştirilerek uygulandığı I., II. ve III. boyut ayrım analizleri için tespit edilen optimum şartlarda gerçekleştirilen, rafine mısır yağı analizine ait kromatogram




**Şekil 4. 105.** I. II. ve III. boyut ayrım tekniğinin birlikte uygulandığı analizler için gerçekleştirilen rafine ayçiçek yağı analizlerinden elde edilen kromatogramlar

| | |
|---|---|
| 1st-D SPE kolonu: | **LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm)** |
| 2nd-D HPLC kolonu: | **LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm)+ LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 250x4.6mm)** |
| FIA loop: | 100 µL |
| 3rd-D HPLC kolonu: | **ChromSpher 5 Lipids (5µm 250x4.6mm) kolon** |
| Akış hızı: | 1 mL/dk, |
| Sıcaklık: | 30°C, |
| ELSD programı: | Nebülizasyon sıcaklığı 80°C, Buharlaştırma sıcaklığı 40 °C, Azot gazı akış 1.5 SLM |

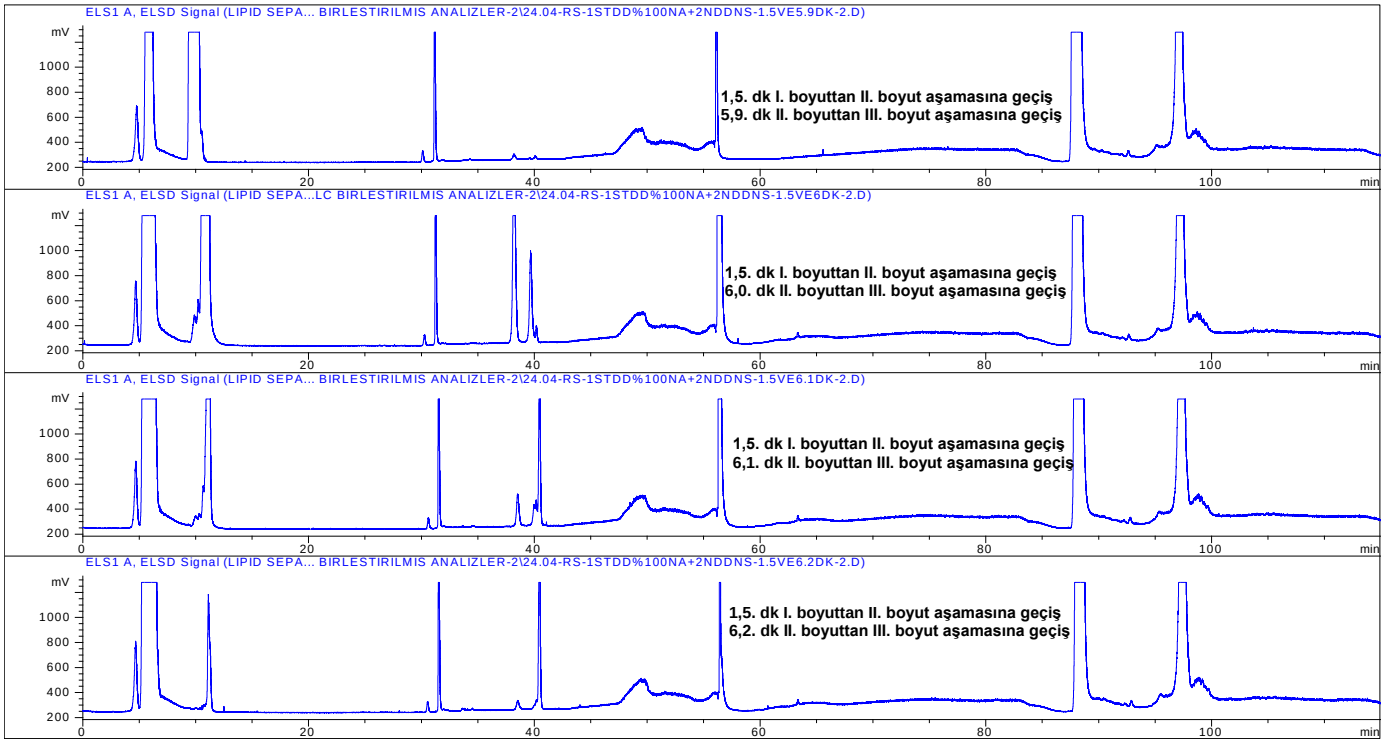
*Şekil 3.11, 12, 13, 14 ve 15'de yer alan sistem akışlarının sırayla uygulanması ve Çizelge 3.15'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.




**Şekil 4. 100.** I. II. ve III. boyut ayrım tekniğinin birlikte uygulandığı analizler için gerçekleştirilen rafine mısır yağı analizlerinden elde edilen kromatogramlar

| | |
|---|---|
| 1st-D SPE kolonu: | **LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm)** |
| 2nd-D HPLC kolonu: | **LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm)+ LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 250x4.6mm)** |
| FIA loop: | 100 µL |
| 3rd-D HPLC kolonu: | **ChromSpher 5 Lipids (5µm 250x4.6mm) kolon** |
| Akış hızı: | 1 mL/dk, |
| Sıcaklık: | 30°C, |
| ELSD programı: | Nebülizasyon sıcaklığı 80°C, Buharlaştırma sıcaklığı 40 °C, Azot gazı akış 1.5 SLM |

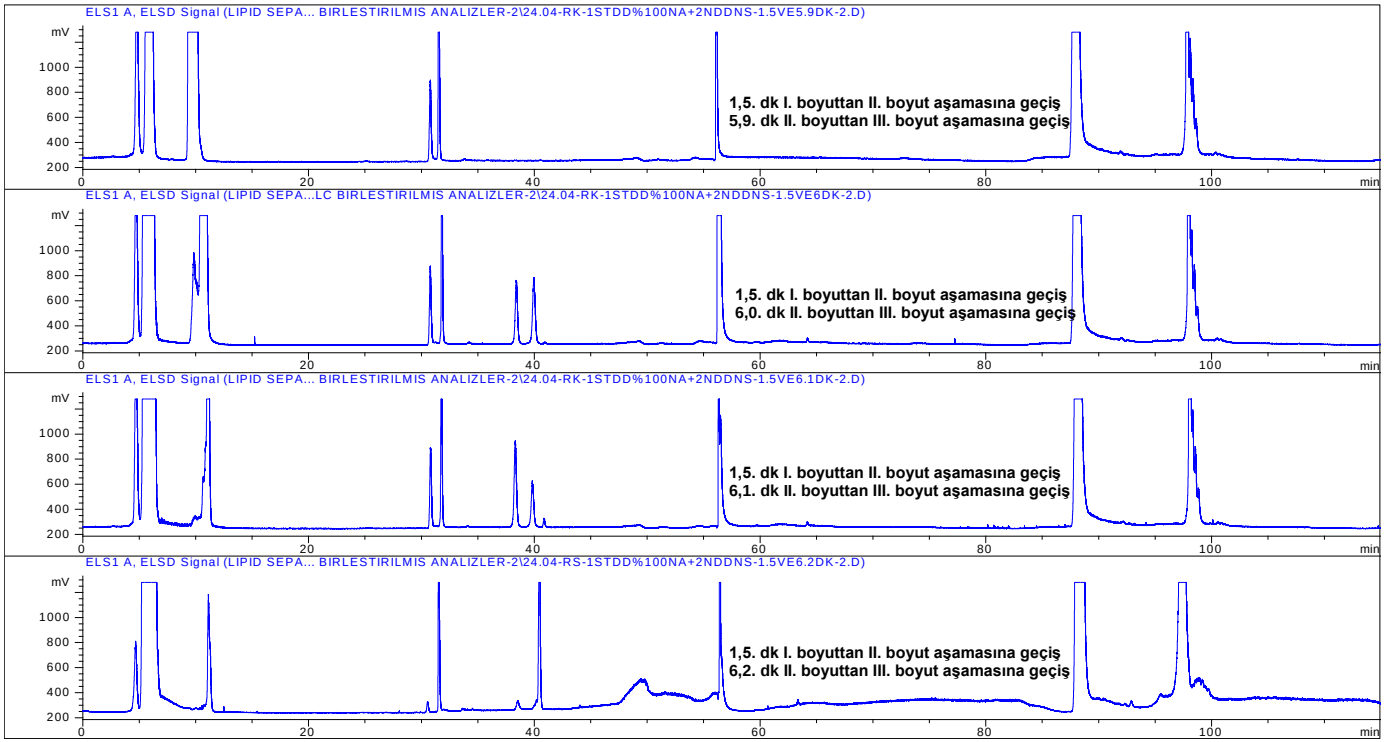
*Şekil 3.11, 12, 13, 14 ve 15'de yer alan sistem akışlarının sırayla uygulanması ve Çizelge 3.15'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.




**Şekil 4. 1061.** I. II. ve III. boyut ayrım tekniğinin birlikte uygulandığı analizler için gerçekleştirilen rafine soya yağı analizlerinden elde edilen kromatogramlar

| | |
|---|---|
| 1st-D SPE kolonu: | **LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm)** |
| 2nd-D HPLC kolonu: | **LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm)+ LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 250x4.6mm)** |
| FIA loop: | 100 µL |
| 3rd-D HPLC kolonu: | **ChromSpher 5 Lipids (5µm 250x4.6mm) kolon** |
| Akış hızı: | 1 mL/dk, |
| Sıcaklık: | 30°C, |
| ELSD programı: | Nebülizasyon sıcaklığı 80°C, Buharlaştırma sıcaklığı 40 °C, Azot gazı akış 1.5 SLM |

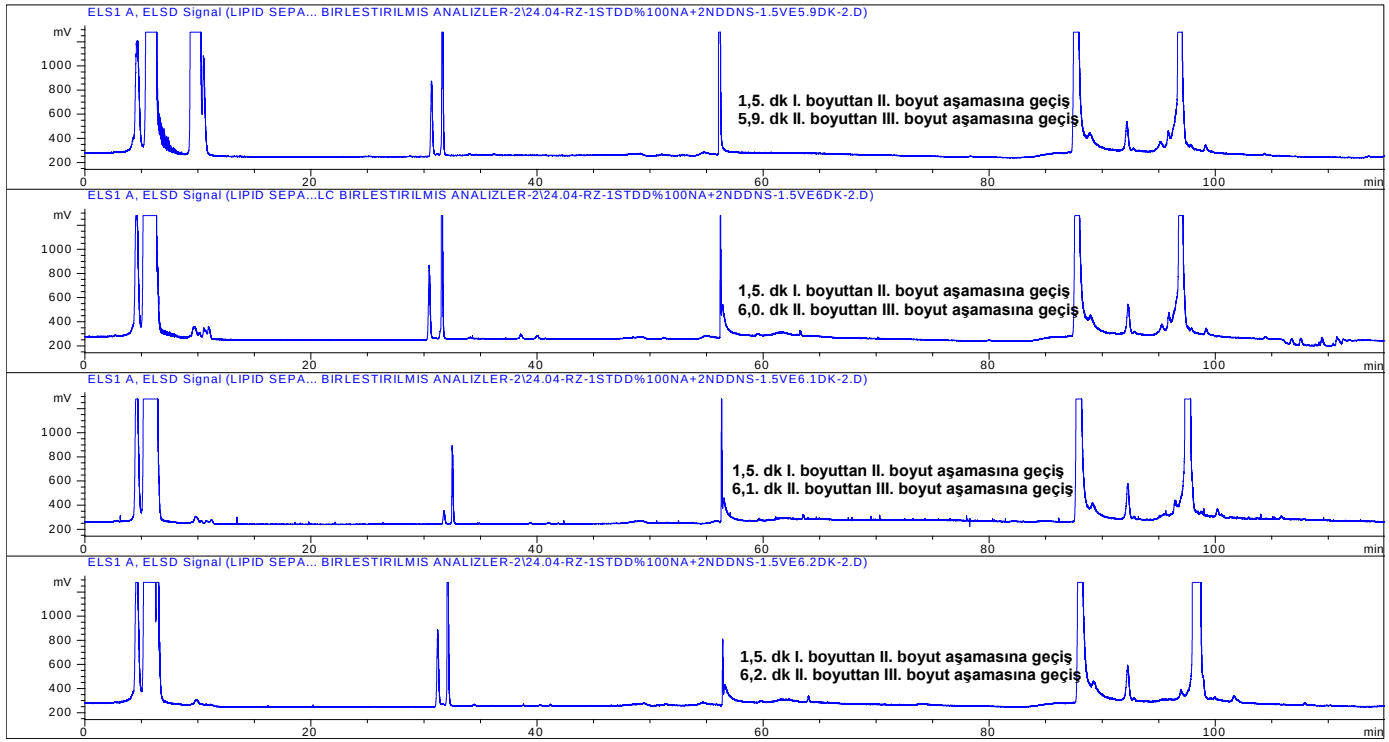
*Şekil 3.11, 12, 13, 14 ve 15'de yer alan sistem akışlarının sırayla uygulanması ve Çizelge 3.15'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.




**Şekil 4. 107.** I. II. ve III. boyut ayrım tekniğinin birlikte uygulandığı analizler için gerçekleştirilen rafine kanola yağı analizlerinden elde edilen kromatogramlar

| | |
|---|---|
| 1st-D SPE kolonu: | **LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm)** |
| 2nd-D HPLC kolonu: | **LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm)+ LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 250x4.6mm)** |
| FIA loop: | 100 µL |
| 3rd-D HPLC kolonu: | **ChromSpher 5 Lipids (5µm 250x4.6mm) kolon** |
| Akış hızı: | 1 mL/dk, |
| Sıcaklık: | 30°C, |
| ELSD programı: | Nebülizasyon sıcaklığı 80°C, Buharlaştırma sıcaklığı 40 °C, Azot gazı akış 1.5 SLM |

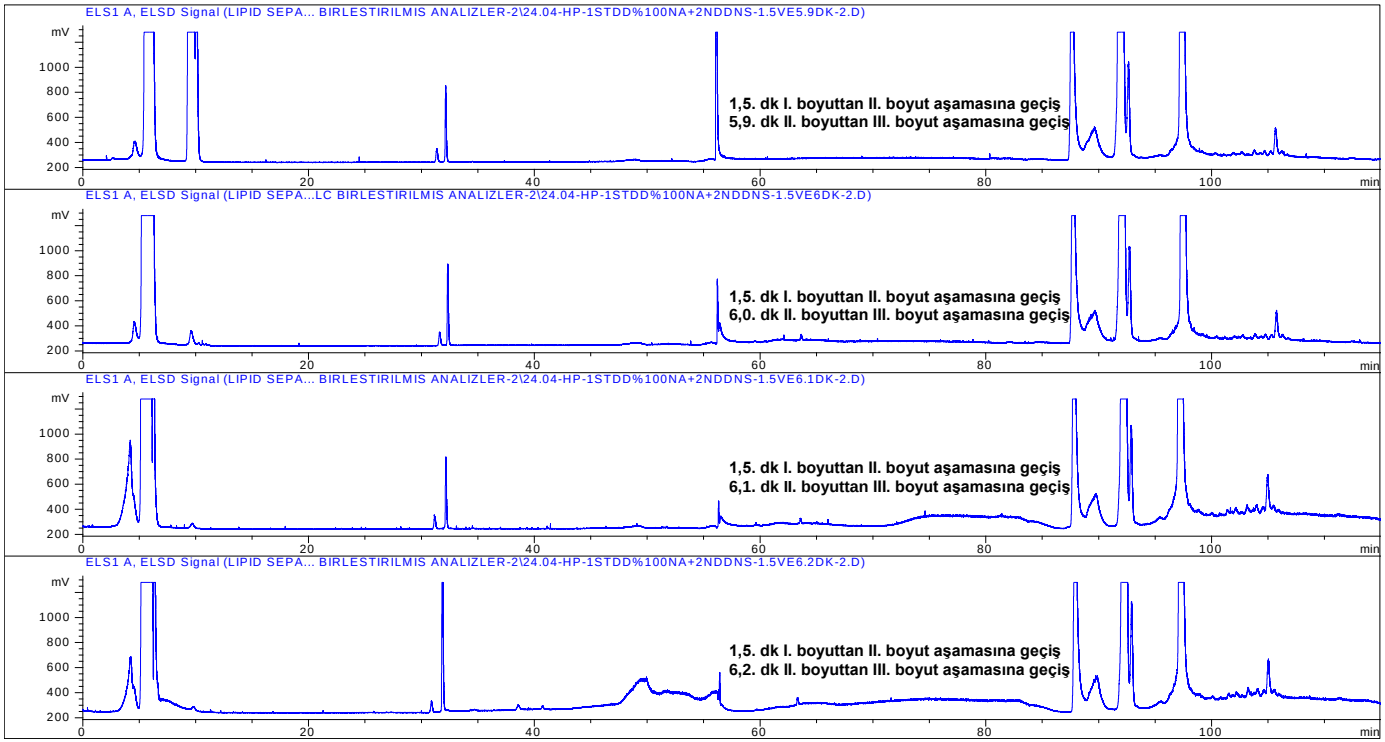
*Şekil 3.11, 12, 13, 14 ve 15'de yer alan sistem akışlarının sırayla uygulanması ve Çizelge 3.15'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.




**Şekil 4. 108.** I. II. ve III. boyut ayrım tekniğinin birlikte uygulandığı analizler için gerçekleştirilen riviera zeytinyağı analizlerinden elde edilen kromatogramlar

| | |
|---|---|
| 1st-D SPE kolonu: | **LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm)** |
| 2nd-D HPLC kolonu: | **LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm)+ LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 250x4.6mm)** |
| FIA loop: | 100 µL |
| 3rd-D HPLC kolonu: | **ChromSpher 5 Lipids (5µm 250x4.6mm) kolon** |
| Akış hızı: | 1 mL/dk, |
| Sıcaklık: | 30°C, |
| ELSD programı: | Nebülizasyon sıcaklığı 80°C, Buharlaştırma sıcaklığı 40 °C, Azot gazı akış 1.5 SLM |

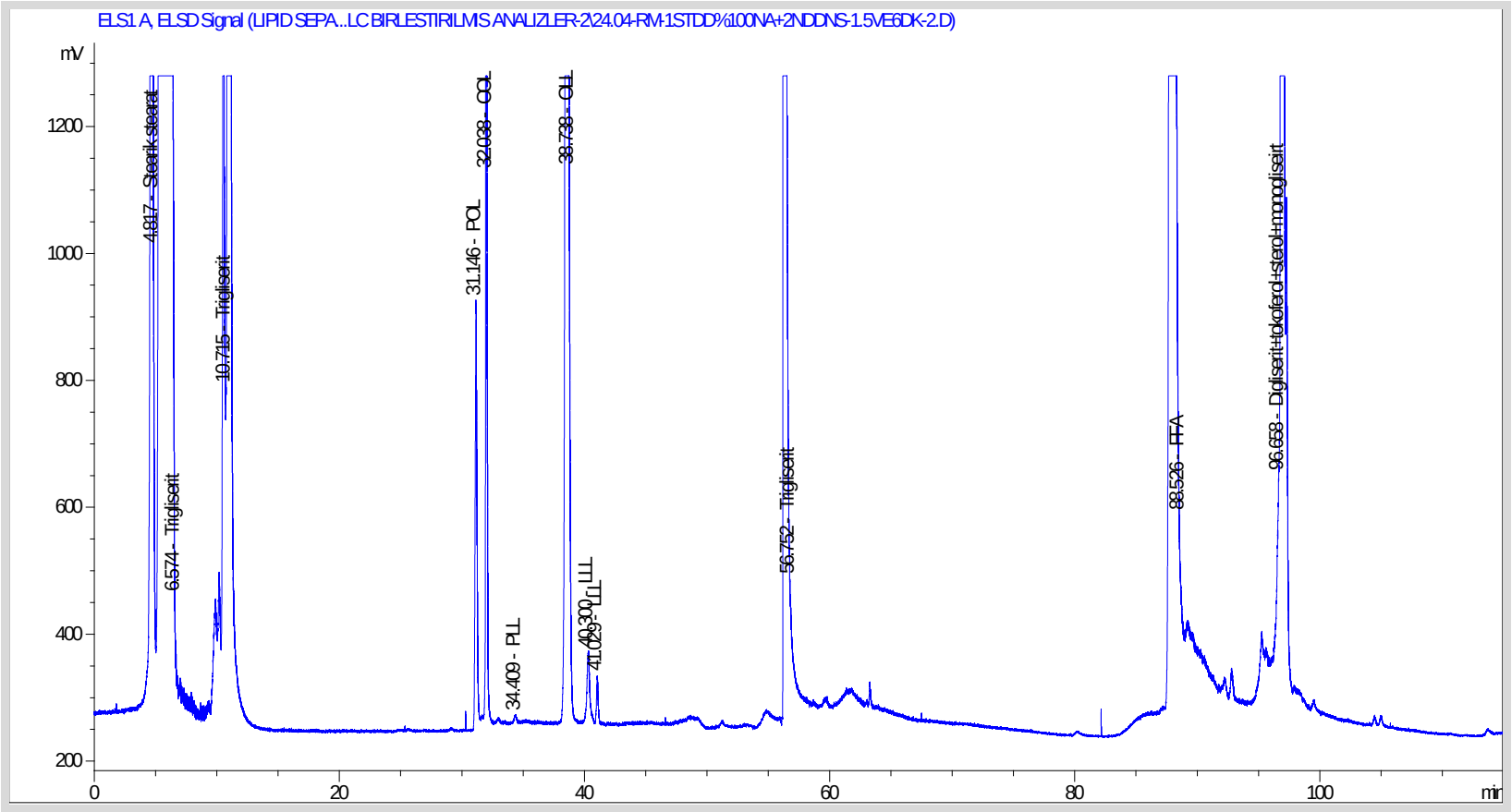
*Şekil 3.11, 12, 13, 14 ve 15'de yer alan sistem akışlarının sırayla uygulanması ve Çizelge 3.15'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.




**Şekil 4. 109.** I. II. ve III. boyut ayrım tekniğinin birlikte uygulandığı analizler için gerçekleştirilen ham palm yağı analizlerinden elde edilen kromatogramlar

| | |
|---|---|
| 1st-D SPE kolonu: | **LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm)** |
| 2nd-D HPLC kolonu: | **LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm)+ LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 250x4.6mm)** |
| FIA loop: | 100 µL |
| 3rd-D HPLC kolonu: | **ChromSpher 5 Lipids (5µm 250x4.6mm) kolon** |
| Akış hızı: | 1 mL/dk, |
| Sıcaklık: | 30°C, |
| ELSD programı: | Nebülizasyon sıcaklığı 80°C, Buharlaştırma sıcaklığı 40 °C, Azot gazı akış 1.5 SLM |

*Şekil 3.11, 12, 13, 14 ve 15'de yer alan sistem akışlarının sırayla uygulanması ve Çizelge 3.15'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.




**Şekil 4. 110.** SPE, NP-HPLC, FIA ve Ag+-HPLC tekniklerinin birleştirilerek uygulandığı I., II. ve III. boyut ayrım analizleri için tespit edilen optimum şartlarda gerçekleştirilen, rafine mısır yağı analizine ait kromatogram

| | |
|---|---|
| **Numune çözücüsü:** | Hekzan |
| **Numune enjeksiyonu:** | 5 µL (0,1 mg/µL yağ numunesi) |
| **1st-D SPE kolon:** | LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm) |
| **2nd-D HPLC kolon:** | LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 75x4.6mm)+ LiChrospher 100A Diol kolon (5µm 250x4.6mm) |
| **FIA loop:** | 100 µL |
| **3rd-D HPLC kolon:** | ChromSpher 5 Lipids kolon (5µm 250x4.6mm) |
| **Akış hızı:** | 1 mL/dk , **Sıcaklık:** 30°C, **ELSD programı:** Neb. sıcaklığı 80°C, Buh.sıcaklığı 40°C, Azot gazı akış 1.5 SLM |

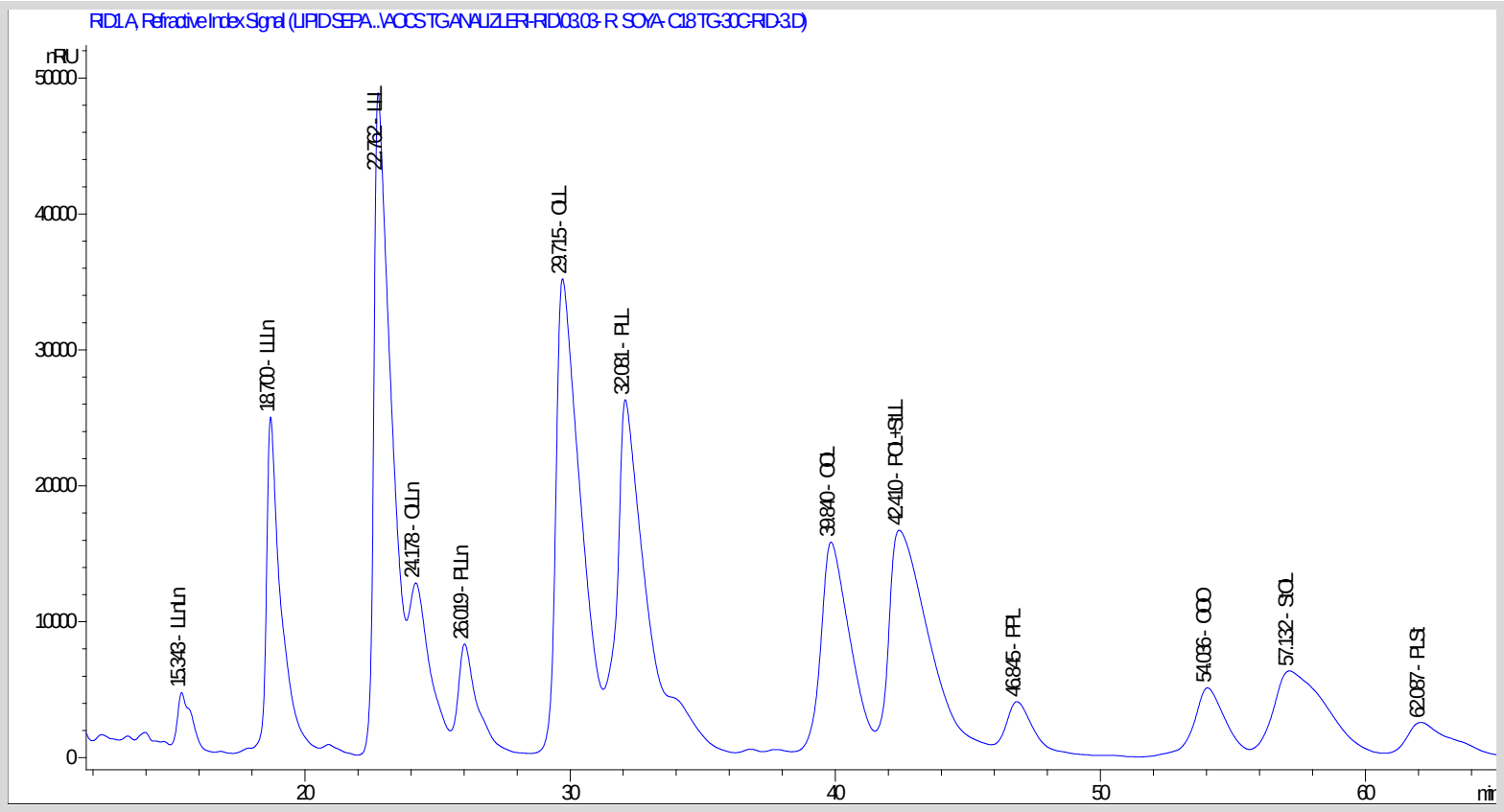
*Şekil 3.11, 12, 13, 14 ve 15'de yer alan sistem akışlarının sırayla uygulanması ve Çizelge 3.15'de yer alan metot şartları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

## 4.2. Standart Yağ Analiz Metotları

Önerilen sistem üzerinde yürütülen optimizasyon çalışmalarının ardından, yağ analizleri için çeşitli resmi kuruluşlar tarafından onaylı standart metotlar ile tayinler tekrar edilmiştir. Standart metotlar ile yürütülen tayinlerden elde edilen sonuçlar, geliştirilen metotlardan elde edilenlerle karşılaştırılmıştır. Böylece; geliştirilen metotların belirlenen tayinlerin yürütülmesinde, standart metotlara alternatif olarak kullanılıp/kullanılamayacağı ortaya konulmuştur. Yağların özelliklerini belirlemede büyük önem arz eden; trigliserit, tokoferol, tokotrienol, sterol, FFA, digliserit, monogliserit ve fosfolipit türlerinin tayini için geliştirilen metotların yanında, bu türlerin standart metotlar ile tayinlerinin gerçekleştirilmesi hedeflenmişti. Fakat, sistem üzerinde $1^{st}$-D & $2^{nd}$-D & $3^{rd}$-D birleştirilmiş analiz uygulamalarına geçildiğinde; bu bileşenlerin tümü için istenilen verimlilikte sonuç alınamayacağı görülmüş ve bu türlerin standart metot uygulamalarının gerçekleştirilmesinin anlamlı olmayacağına karar verilmiştir.

### 4.2.1. Trigliserit Analiz Sonuçları

Standart AOCS Ce 5b-89 metoduna göre gerçekleştirilen analizlerden elde edilen kromatogram Şekil 4.111'de, farklı bitkisel yağlar için tespit edilen sonuçlar ise Çizelge 4.33'de verilmiştir. ACE C18 kolon (5µm 250x4.6mm) kullanılarak gerçekleştirilen analizlerde, RP-HPLC tekniği uygulanmıştır. Elde edilen kromatogramlardan görüleceği üzere; trigliserit türlerinin istenilen verimlilikte tayinleri gerçekleştirilebilmiş ve bitkisel yağların herbirisi için farklı kompozisyondaki miktarlar, yüksek tekrarlanabilirlikteki sonuçlarla tespit edilebilmiştir.




**Şekil 4. 111.** Standart AOCS Ce 5b-89 metoduna göre rafine soya yağı kullanılarak gerçekleştirilen trigliserit analizinden elde edilen kromatogram

| | |
|---|---|
| **Numune çözücüsü:** | Aseton |
| **Numune enjeksiyonu:** | 20 µL (0.1mg yağ/ µL çözücü) (otomatik enjeksiyon) |
| **Kolon:** | ACE C18 kolon (5µm 250x4.6mm) |
| **Akış hızı:** | 1.5 mL/dk, |
| **Sıcaklık:** | 30°C |
| **Hareketli faz bileşimi:** | Aseton: ACN; 50:50%, v/v |
| **Dedeksiyon:** | RID, 35°C |

* Şekil. 3.8.'da yer alan sistem akışı kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

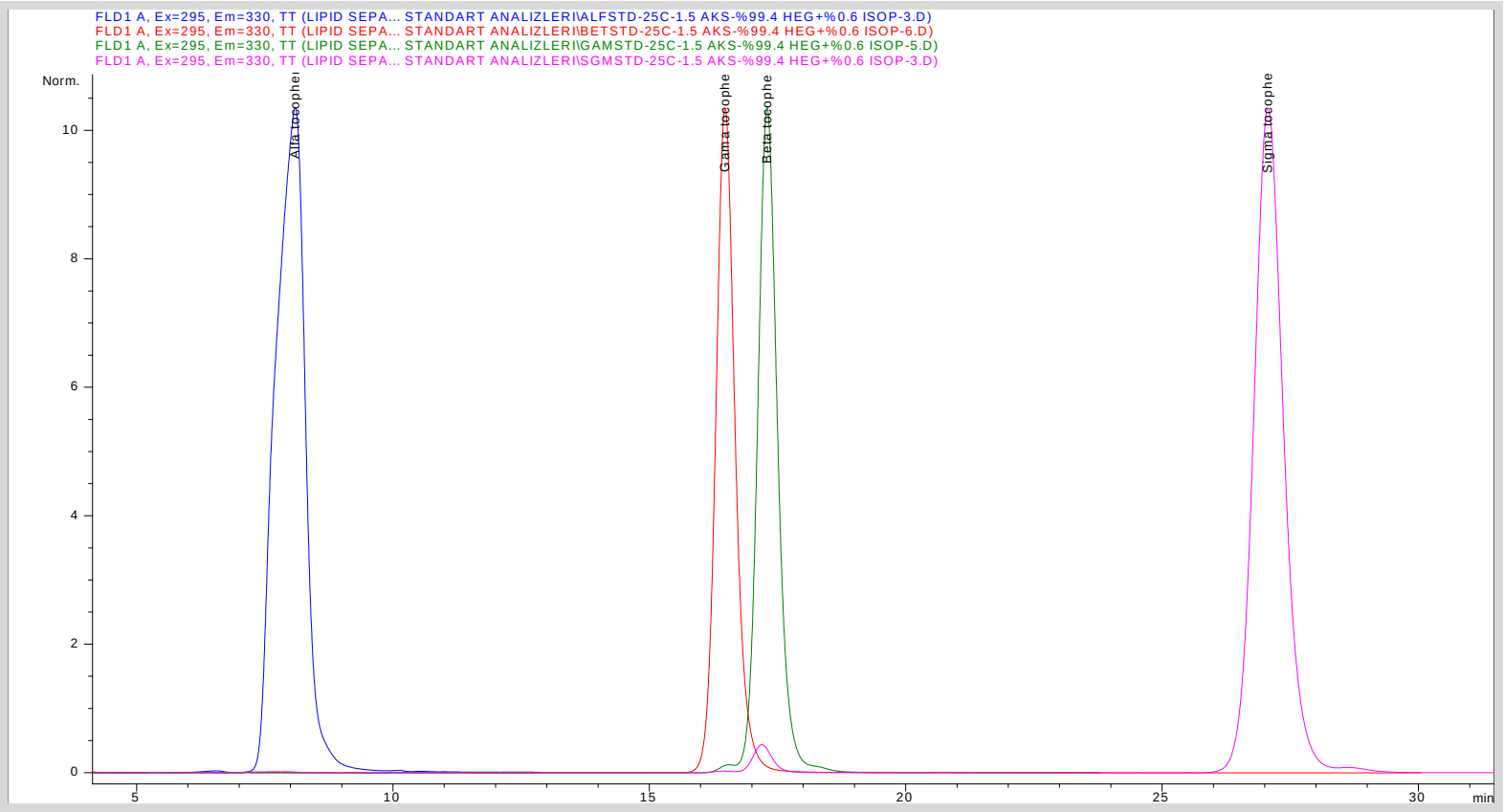
**Çizelge 4. 33.** Standart AOCS Ce 5b-89 metodu kullanılarak farklı bitkisel yağ numuneleri için gerçekleştirilen trigliserit tayini sonuçları

| | **Farklı bitkisel yağ numuneleri için AOCS Resmi metoduna göre gerçekleştirilen trigliserit tayini sonuçları, %** | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Trigliserit yapısı(*)** | **Ayçiçek yağı** | **Mısır yağı** | **Soya yağı** | **Kanola yağı** | **Pamuk yağı** | **Riviera Zeytinyağı** | **Ceviz yağı** | **Susam yağı** | **Aspir yağı** | **Keten T. yağı** | **Haşhaş yağı** | **Fıstık yağı** | **Çörek otu yağı** | **Kabak Ç. yağı** |
| **LLnLn** | 0.031 | 0.148 | 1.062 | 0.501 | 0.382 | - | 3.223 | 0.098 | 0.265 | 12.277 | 0.172 | 0.153 | 0.187 | 0.513 |
| **LLLn** | 0.125 | 1.33 | 7.325 | 2.335 | 0.364 | 0.066 | 14.207 | 0.382 | 0.558 | 2.958 | 0.967 | 0.317 | 0.53 | 0.472 |
| **LLL** | 22.401 | 19.056 | 16.396 | 5.995 | 20.289 | 0.257 | 26.229 | 14.775 | 43.107 | 0.494 | 39.776 | 6.118 | 23.534 | 8.073 |
| **OLLn** | 0.122 | 1.94 | 4.427 | 5.027 | 1.185 | - | 5.756 | - | 2.07 | 5.783 | 0.279 | 1.76 | 0.362 | - |
| **PLLn** | 0.024 | 0.66 | 2.163 | 0.744 | 13.96 | 0.131 | 3.997 | 0.142 | - | 2.395 | 17.816 | - | - | - |
| **OLL** | 29.649 | 22.75 | 16.865 | 12.401 | 27.462 | - | 15.669 | 22.932 | 16.24 | 1.153 | 18.574 | 13.882 | 18.407 | 17.749 |
| **PLL** | 9.055 | 14.722 | 15.896 | 5.598 | 4.224 | 1.714 | 13.332 | 8.679 | 12.953 | 7.577 | - | 4.172 | 19.448 | 8.313 |
| **OOL** | 14.385 | 13.264 | 8.835 | 21.58 | 15.842 | 16.492 | 6.143 | 17.82 | 5.485 | 1.913 | 6.644 | 21.158 | 10.566 | 19.223 |
| **POL+StLL** | 11.828 | 12.817 | 13.024 | 7.318 | 10.265 | 8.109 | 7.501 | 14.602 | 7.239 | 1.236 | 10.648 | 16.679 | 15.649 | 15.776 |
| **PPL** | 0.859 | 1.834 | 2.166 | 0.663 | 0.834 | 1.004 | 0.435 | 1.469 | 0.839 | 3.521 | 0.632 | 1.662 | 1.669 | 2.418 |
| **OOO** | 5.543 | 4.667 | 3.165 | 24.409 | 3.672 | 42.301 | 1.371 | 7.774 | 4.824 | 1.632 | 0.861 | 18.147 | 3.041 | 9.776 |
| **StOL** | 5.099 | 5.694 | 6.612 | 6.927 | 1.522 | 26.235 | 2.136 | 9.916 | 5.151 | 1.863 | 2.551 | 13.482 | 6.101 | 13.874 |
| **PLSt** | 0.871 | 1.119 | 2.064 | 0.431 | 0.382 | 3.691 | - | 1.411 | 1.268 | 0.603 | 1.081 | 2.469 | 0.507 | 3.813 |

* P; palmitik asit, St; stearik asit, O;oleik asit, L;linoleik asit, Ln; linolenik asit

### 4.2.2. Tokol (Tokoferol ve Tokotrienol) Analiz Sonuçları

Standart AOCS Ce 8-89 metoduna göre gerçekleştirilen analizlerden elde edilen kromatogram Şekil 112'de, farklı bitkisel yağlar için tespit edilen sonuçlar ise Çizelge 4.34'de yer almaktadır. ACE C18 kolon (5µm,250x4.6 mm) kullanılarak gerçekleştirilen bu yöntemde; NP-HPLC tekniği uygulanmaktadır. Elde edilen kromatogramlardan görüleceği üzere; tokoferol ve tokotrienol türlerinin istenilen verimlilikte tayinleri gerçekleştirilebilmiş ve bitkisel yağların herbirisi için farklı kompozisyondaki tokol miktarları, yüksek tekrarlanabilirlikteki sonuçlarla tespit edilebilmiştir.




**Şekil 4. 112.** Standart AOCS Ce 8-89 metoduna göre standart madde kullanılarak gerçekleştirilen tokoferol analizinden elde edilen kromatogram

| | |
|---|---|
| **Numune çözücüsü:** | hekzan |
| **Numune enjeksiyonu:** | 2 µL |
| **Kolon:** | ACE C18 kolon (5µm 250 x 4.6 mm ) |
| **Akış hızı:** | 1 mL/dk |
| **Sıcaklık:** | 20°C |
| **Hareketli faz bileşimi:** | Hekzan: izopropanol; 99.5:0.5, v/v |

* Şekil. 3.8.'da yer alan sistem akışı kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

**Çizelge 4. 34.** Standart AOCS Ce 8-89 metot şartları kullanılarak farklı bitkisel yağlar için gerçekleştirilen tokol analizlerine ait sonuçlar

| | **Tokol (tokoferol ve tokotrienol) kompozisyonu verileri. ortalama ± SD (mg/ kg yağ)** | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Rafine yağlar** | ***α-T**** | ***β-T*** | ***γ-T*** | ***δ-T*** | ***α-TT***** | ***β-TT*** | ***γ-TT*** | ***δ-TT*** | **Toplam tokol miktarı** |
| **Ayçiçek yağı** | 713.11±2.31 | 46.88±0.23 | 97.87±0.36 | - | - | - | - | - | 857.86±1.24 |
| **Soya yağı** | 77.27±0.84 | 19.80±0.09 | 539.78±4.20 | 277.17±3.28 | - | - | - | - | 914.02±7.01 |
| **Mısır yağı** | 188.21±4.24 | 35.90±0.26 | 514.87±4.28 | 125.57±0.54 | 11.87±1.26 | 12.35±1.54 | - | - | 886.77±4.53 |
| **Fındık yağı** | 610.01±2.65 | 31.13±0.38 | 240.74±0.63 | 25.02±0.59 | - | - | - | - | 906.90±3.28 |
| **Yer fıstığı yağı** | 243.99±3.10 | 27.86±1.61 | 150.17±2.02 | 65.25±1.27 | - | - | - | - | 487.27±3.64 |
| **Kanola yağı** | 261.54±1.02 | 48.10±0.18 | 497.46±2.43 | 19.26±0.11 | - | - | - | - | 826.36±3.37 |
| **Soğuk pres yağlar** | ***α-T**** | ***β-T*** | ***γ-T*** | ***δ-T*** | ***α-TT***** | ***β-TT*** | ***γ-TT*** | ***δ-TT*** | **Toplam tokol miktarı** |
| **Kabak çekir. yağı** | 9.56±2.12 | 741.23±3.88 | 88.84±1.81 | - | - | - | 17.11 ±1.03 | - | 856.74±1.69 |
| **Ceviz yağı** | 21.87±4.69 | 718.10±6.64 | 39.39±3.35 | - | 5.71±0.16 | 9.28±0.74 | 108.81±2.98 | - | 903.16±2.14 |
| **Keten tohumu yağı** | 16.11±4.46 | 222.81±1.73 | 721.16±6.61 | 17.23±0.46 | - | - | - | - | 977.31±5.13 |
| **Çörek otu yağı** | 12.56±0.21 | 28.20±2.12 | 38.79±2.79 | - | 100.62±0.29 | 295.65±1.73 | 13.58±3.31 | - | 489.40±1.01 |
| **Haşhaş yağı** | 87.17±3.14 | 9.07±1.22 | 819.27±7.61 | 16.10±3.06 | - | - | - | - | 931.61±7.21 |
| **Aspir yağı** | 896.77±6.33 | 22.26±0.25 | 22.91±2.72 | - | - | - | - | - | 941.94±5.38 |
| **Sızma zeytinyağı** | 172.11±4.50 | 21.90±4.21 | 66.69±3.10 | 20.43±1.38 | - | - | - | - | 281.13±0.54 |
| **Kanola yağı** | 282.86±1.02 | 56.01±0.31 | 563.85±4.12 | 20.63±0.20 | - | - | - | - | 923.35±6.03 |

* T; Tokoferol. TT; Tokotrienol

## 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Sunulan tez çalışması ile; birçok yağ analizinin ön işlem basamağında yer alan SPE tekniğinin, FIA ve HPLC sistemlerine entegrasyonu ile, bitkisel yağlarda mevcut türlerin tek bir enjeksiyon ile 3 boyutlu kromatografik tayinleri için, numune ön işlemlerinin otomatik olarak gerçekleştirilebildiği ve analizci müdahalesinin en aza indirildiği "*On-line SPE-FIA-HPLC yağ analiz sistemi*" oluşturulmuş ve sistem üzerinde yeni yağ analiz metotlarının geliştirilip/ uygulanabilirlik kazanması sağlanmıştır.

On-line SPE-FIA-HPLC yağ analiz sistemi üzerinde, bitkisel yağlarda mevcut lipit türlerinin kapsamlı bir şekilde tayin edilebilmesi için gerçekleştirilen analizler; SPE, NP-HPLC, RP-HPLC, FIA ve $Ag^{+}$-HPLC teknikleri uygulanarak 6 temel aşamada yürütülmüştür;

- I. aşamada SPE tekniğinin uygulandığı I. boyut ayrım ($1^{st}$-D) analizleri ile; bitkisel yağlarda bulunan nötral ve polar lipit türlerinin iki ana fraksiyon halinde ayrımı ve tayini sağlanmış,

- II. aşamada NP-HPLC tekniğinin uygulandığı II. boyut ayrım ($2^{nd}$-D) analizleri ile; I. boyut ayrım aşamasında toplu halde SPE kolondan izole edilen nötral lipit fraksiyonun, trigliserit, tokol, FFA, sterol, digliserit ve monogliserit gibi mevcut bileşenlerine; izole edilen polar lipit fraksiyonun ise, fosfolipit türlerine ayrımı ve tayini sağlanmış,

- III. aşamada NP-HPLC, RP-HPLC ve $Ag^{+}$-HPLC tekniğinin uygulandığı III. boyut ayrım ($3^{rd}$-D) analizleri ile; III. boyut ayrım aşamasına fraksiyonlar halinde aktarılan ve $3^{rd}$-D HPLC kolonda bileşenlerine ayrımı ve tayini planlanan lipit türlerinin analizleri için; birleştirilmiş sistem uygulamaları öncesinde ayrı ayrı optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiş,

- IV. aşamada SPE ve NP-HPLC tekniklerinin birleştirilerek uygulandığı I. ve II. boyut ayrım ($1^{st}$-D & $2^{nd}$-D) analizleri ile; I. boyut ayrım aşamasında SPE kolondan toplu halde izole edilen nötral lipit fraksiyonun; $2^{nd}$-D HPLC kolona yönlendirilmesi, daha sonra bu fraksiyonun, içerisinde mevcut lipit türlerine (trigliserit, tokol, FFA, sterol, digliserit ve monogliserit) ayrılarak fraksiyonlar halinde tayin edilmesi sağlanmış,

- V. aşamada NP-HPLC, FIA ve $Ag^+$-HPLC tekniklerinin birleştirilerek uygulandığı II. ve III. boyut ayrım ($2^{nd}$-D & $3^{rd}$-D) analizleri ile; II. boyut ayrım aşamasında $2^{nd}$-D HPLC kolondan izole edilen nötral lipit türlerinin (trigliserit, tokol, FFA, sterol, digliserit ve monogliserit) fraksiyonlar halinde $3^{rd}$-D HPLC kolona sırayla yönlendirilmesi, bileşenlerine ayrımı ve tayini sağlanmış,

- VI. aşamada SPE, NP-HPLC, FIA ve $Ag^+$-HPLC tekniklerinin birleştirilerek uygulandığı I., II. ve III. boyut ayrım ($1^{st}$-D & $2^{nd}$-D & $3^{rd}$-D) analizleri ile; I., II. ve III. boyut ayrım aşamalarının her birisi için tamamlanan optimizasyon çalışmaları doğrultusunda; sistem işleyişi, metot parametreleri netleştirilmiş ve SPE, NP-HPLC, FIA ve $Ag^+$-HPLC tekniklerinin tümünün sistem üzerinde birleştirilerek uygulanması sağlanmıştır. On-line SPE-FIA-HPLC yağ analiz sisteminin; $1^{st}$-D & $2^{nd}$-D & $3^{rd}$-D analizleri için nihai işleyişi ve optimum metot parametreleri kullanılarak; ülkemizde yaygın olarak tüketilen ayçiçek, mısır, pamuk, soya, kanola, palm yağı gibi farklı özellikteki bitkisel yağ numuneleri için analizler gerçekleştirilmiştir.

Bu doğrultuda gerçekleştirilen çalışmalardan elde edilen verileri ve sonuçları değerlendirildiğinde;

– Farklı dedektör, pompa, kolon, çok yollu valf sistemi ve bağlantı elemanları kullanılarak laboratuarımızda mevcut HPLC sistemi modifiye edilmiş, bitkisel yağ analizlerinde lipit türlerinin tayini için uygulanan ayırma ve tayin yöntemlerinin tek bir sistem üzerinde on-line olarak uygulanabildiği, yeni ve özgün bir SPE-HPLC-FIA yağ analiz sistemi oluşturulup / geliştirilmiştir.

– Oluşturulan sistem üzerinde, bitkisel yağların kalitesini belirlenmede son derece önem arz eden ve genellikle standart metotlar uygulanarak yürütülen; trigliserit, sterol, tokol, digliserit, monogliserit, FFA ve fosfolipit tayinlerinin her birisi için; literatür çalışmalarından faydalanılarak çeşitli deneysel parametrelerin optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Optimizasyon çalışmalarında kemometrik yaklaşım izlenerek, 5 seviyeli/ 3 faktörlü deneysel tasarımlardan faydalanılmış ve analizler için uygun standartlar, ayçiçek, mısır, pamuk, soya, kanola, palm yağı gibi farklı özellikteki bitkisel yağ numuneleri kullanılmıştır.

– Gerektirdiği ön işlemler oldukça zahmetli olan ve çevre açısından tehlikeli kimyasalların fazla miktarda kullanımını gerektiren uygulamadaki standart metotlara

alternatif olarak; çevre dostu yeni yağ kalite-kontrol analiz metotlarının geliştirilmesi sağlanmıştır.

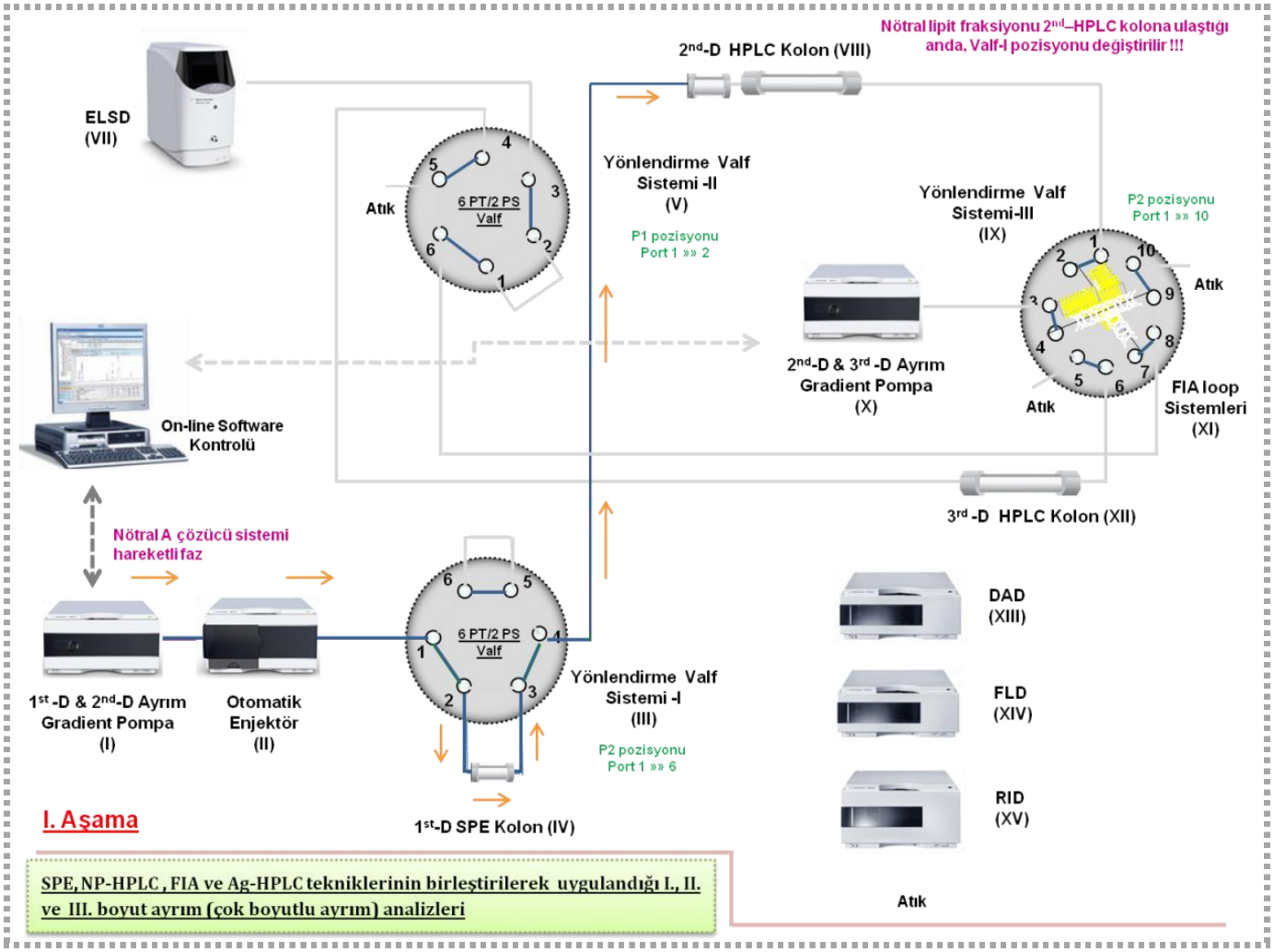
– Şu ana kadar yağ analiz metotları geliştirmeye yönelik önerilen literatür çalışmalarında; tayinlerin HPLC, FIA, GC, GC-MS, FT-IR gibi farklı analiz sistemleri üzerinde tek veya iki boyutlu ayrımlar uygulanarak gerçekleştirilmiş olması ve numune ön işlemlerinin bu sistemler üzerinde on-line olarak yapılmamış olması, çalışmanın özgünlüğünü açıkça ortaya koymaktadır.

– Sistemin işleyişi için kullanılan metot programlamalarının; istenilen analizlere kolaylıkla geçiş sağlanabilecek şekilde geliştirilmiş olması, çalışmanın özgünlüğünü daha fazla ön plana çıkarmaktadır.

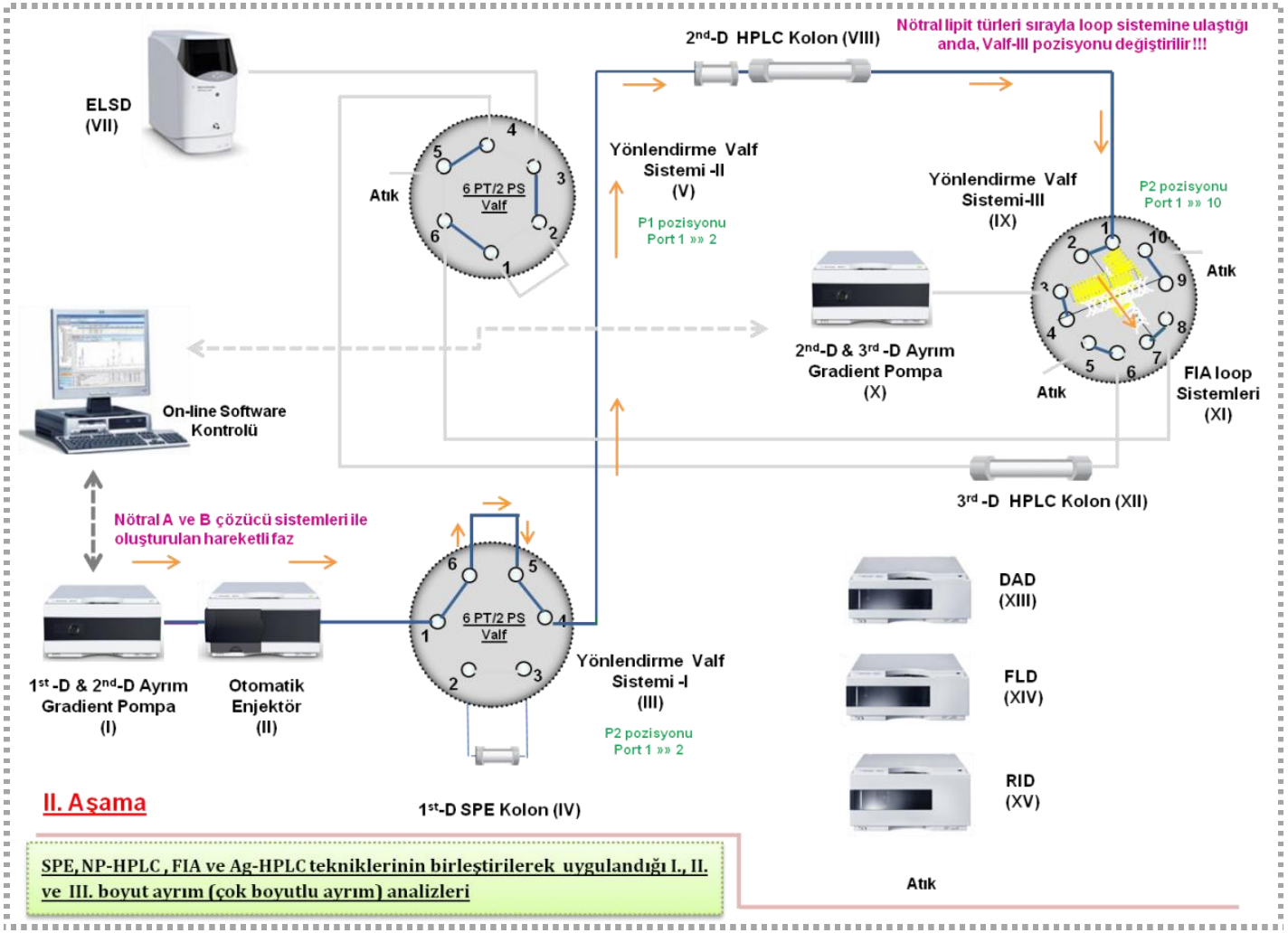
Sonuç olarak; çalışma ile bitkisel yağların kalite-kontrolünü belirlemede büyük önem arz eden tayinlerin tamamının; numune ön işlemlerinin on-line gerçekleştirilebildiği tek bir analiz sistemi üzerinde, tek bir enjeksiyon ile yapılabilirliği, dünya literatüründe ilk defa önerilmiş ve kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Elde edilen veriler neticesinde; bitkisel yağlarda mevcut lipit türlerinin tayini için daha kısa sürede, yüksek oranda iyileştirilmiş ayrımların elde edilebildiği analizler gerçekleştirilebilmiştir. Ayrıca, çalışmanın sanayide uygunlaması ile; ülkemiz yağ sektörü açısından son derece önem arz eden analizlerin otomatikleştirilmiş sistemlerde gerçekleştirilmesine imkan sağlayacaktır.

Yağlardaki farklı fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip önemli türlerin tayini için; özel bir sistem dizaynı ve enstrümantasyonu ile tamamlanan bu yeni sistem uygulamasının, "*modern birleştirilmiş analiz sistemlerinin geliştirilmesi ve uygulamaları*" ile ilgilenen araştırmacılar için yeni ufuklar açacağı kanaatindeyiz.

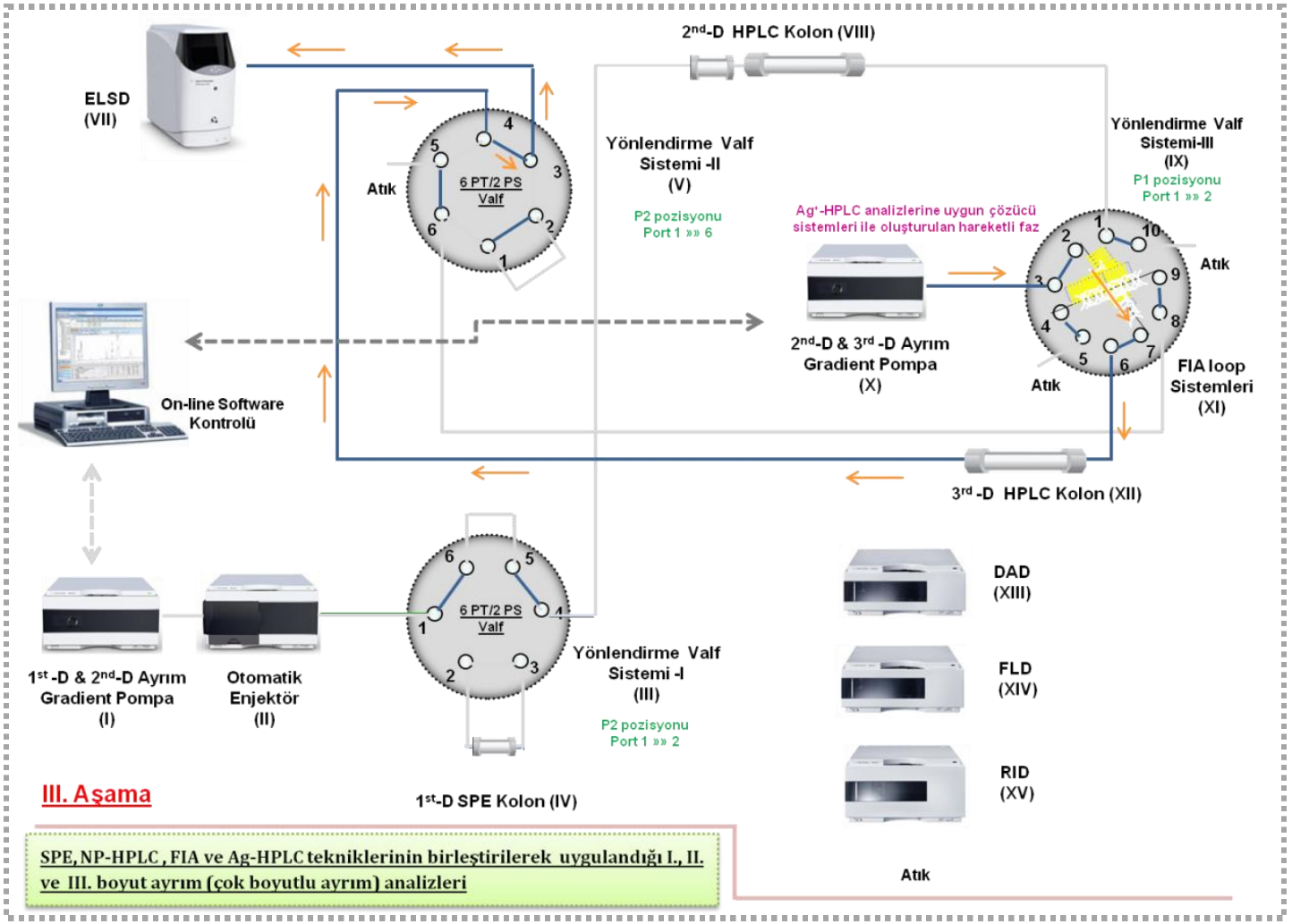
**Bitkisel yağların, 3 boyutlu kromatografik ayrımı için oluşturulup & geliştirilen On-line SPE-FIA-HPLC yağ analiz sisteminin işleyişine ait şematik gösterim**



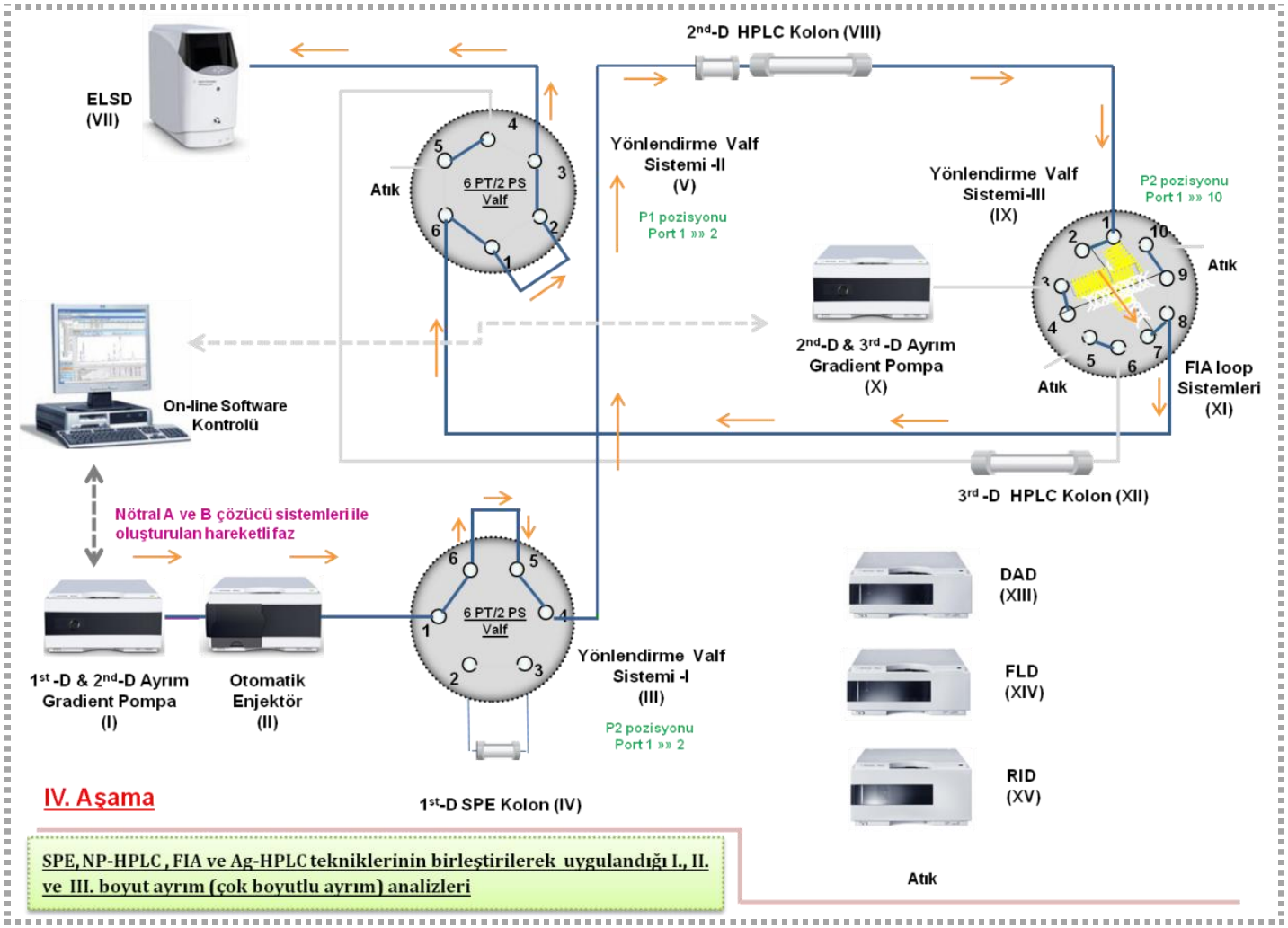

**I. aşama// SPE tekniğinin uygulandığı I. boyut ayrım basamağı**



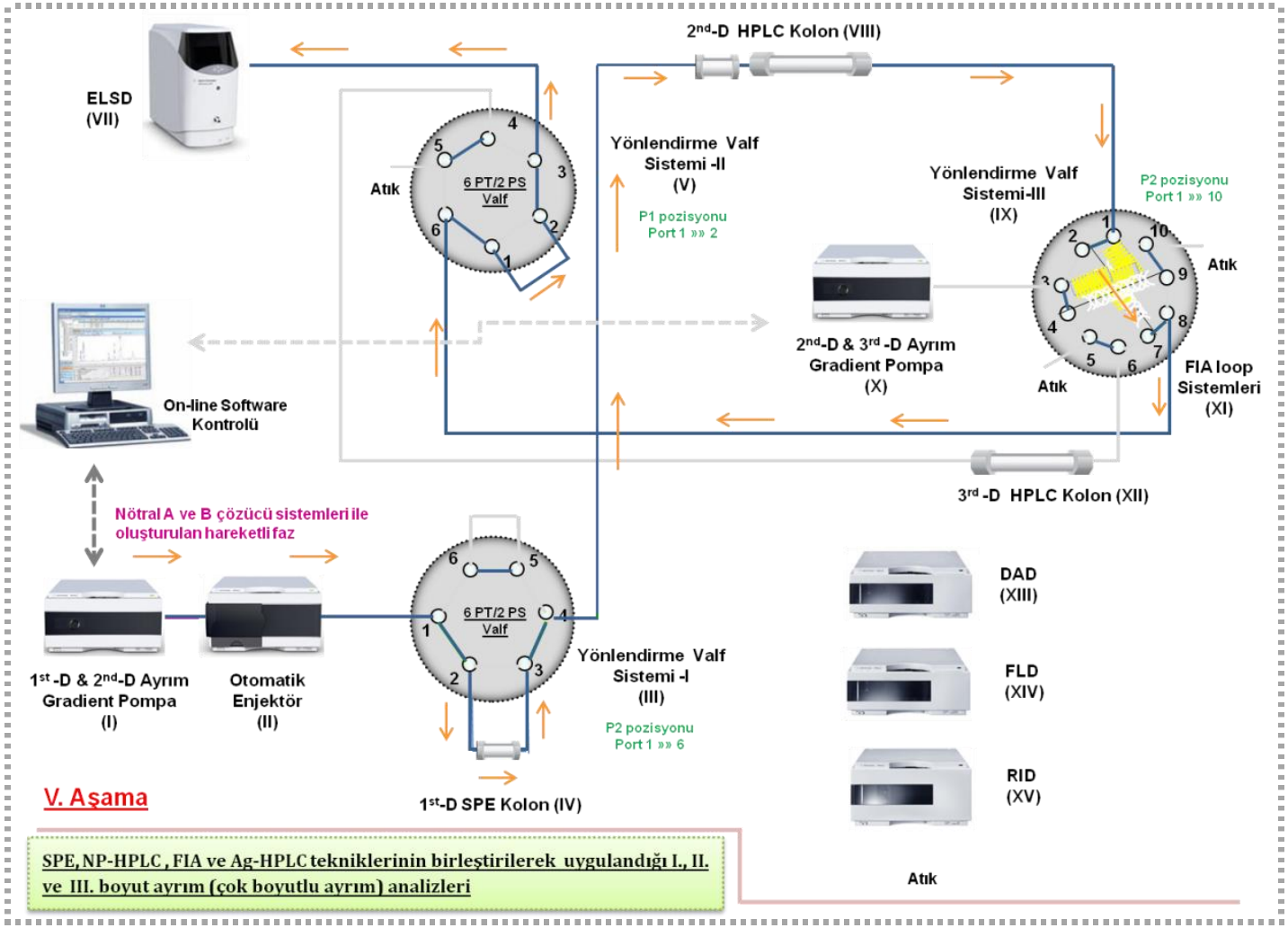

**II. aşama// NP-HPLC tekniğinin uygulandığı II. boyut ayrım basamağı**




**III. aşama// $Ag^{+}$-HPLC tekniğinin uygulandığı III. boyut ayrım basamağı**




**IV. aşama// NP-HPLC tekniğinin uygulandığı II. boyut ayrım aşamasında kalan türlerin tayini**




**V. aşama// SPE tekniğinin uygulandığı I. boyut ayrım aşamasında kalan türlerin tayini**

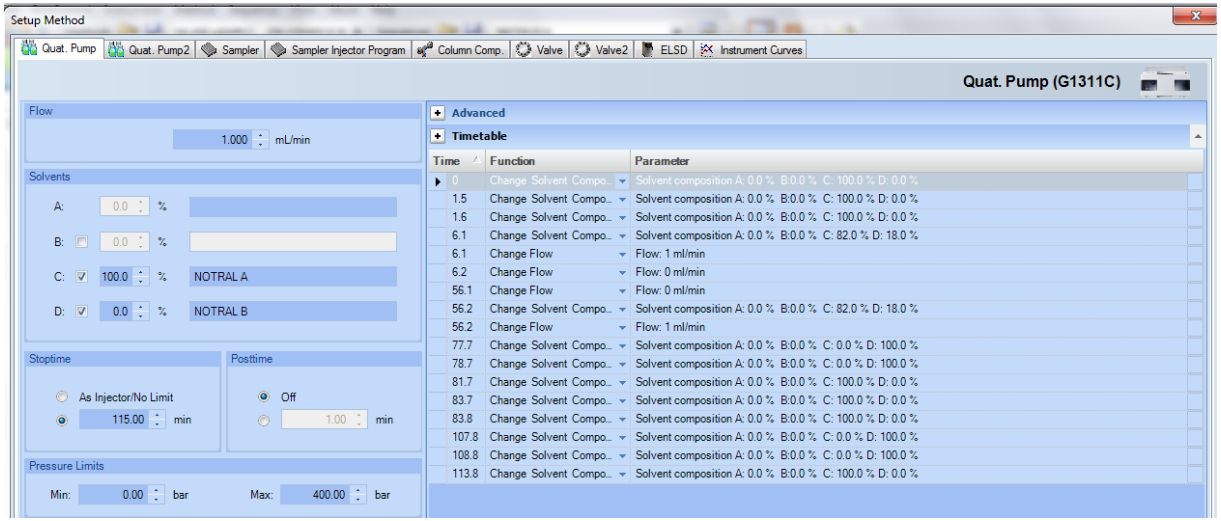
**Çizelge 4. 35.** SPE,NP-HPLC, FIA ve Ag+-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı I.,II. ve III. boyut ayrım analizleri için kullanılan parametreler

**SPE, NP-HPLC, FIA ve $Ag^{+}$-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı I., II. ve III. boyut ayrım analizleri için kullanılan parametreler**

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | **Türü Miktarı** | Bitkisel yağ numuneleri ve lipit standart maddeler 0.1 mg yağ/ µL çözücü, farklı konsantrasyonlardaki standart maddeler | | | |
| | **Enjeksiyon** | Otomatik enjeksiyon, 5 µL | | | |
| | **Çözücü türü** | Hekzan | | | |
| **SABİT FAZ** | **Türü ve Özelliği** | **$1^{st}$-D SPE kolon; LiChrospher 100Diol 5µm 75x4.0mm**<br>**$2^{nd}$-D HPLC kolon; LiChrospher 100Diol 5µm 75x4.0mm+LiChrospher 100Diol 5µm 250x4.0mm**<br>**$3^{rd}$-D HPLC kolon; ChromSpher 5 Lipids 5µm 250x4.6mm kolon** | | | |
| **HAREKETLİ FAZ** | **Çözücü sistemi (HPLC saflıkta)** | **Nötral lipid hareketli faz A:** | Hekzan: asetik asit (99:1.0, v/v/v) | | |
| | | **Nötral lipid hareketli faz B:** | Hekzan: izopropanol: asetik asit (84:15:1.0, v/v/v) | | |
| | | **III. boyut ayrım aşaması için:** | Hekzan (A), Hekzan:İzop:ACN, (75: 22.5: 2.5, v/v/v) (B) | | |
| | **1. ve 2. HPLC pompanın birlikte kullanılmasıyla uygulanan gradient program** | | **Nötral A** | **Nötral B** | **Hekzan (A)** | **Hekzan:İzop:ACN (B)** |
| | | **1.pompa 0. dk** | % 100 | % 0 | %0 | %0 |
| | | **1.pompa 1.5. dk** | % 100 | % 0 | %0 | %0 |
| | | **1.pompa 1.6. dk** | %100 | %0 | %0 | %0 |
| | | **1.pompa 6.1. dk** | %82.4 | %17.6 | %0 | %0 |
| | | **I. HPLC pompa durdurulur, II. HPLC pompa devreye konulur.** | | | | |
| | | **2.pompa 6.1 dk** | %0 | %0 | %100 | %0 |
| | | **2.pompa 16.1 dk** | %0 | %0 | %100 | %0 |
| | | **2.pompa 38.1 dk** | %0 | %0 | %82 | %18 |
| | | **2.pompa 43.1 dk** | %0 | %0 | %65 | %35 |
| | | **2.pompa 46.1 dk** | %0 | %0 | %0 | %100 |
| | | **2.pompa 49.1 dk** | %0 | %0 | %0 | %100 |
| | | **2.pompa 56 dk** | %0 | %0 | %100 | %0 |
| | | **II. HPLC pompa durdurulur, I. HPLC pompa devreye konulur.** | | | | |
| | | **1.pompa 56.1 dk** | %82.4 | %17.6 | %0 | %0 |
| | | **1.pompa 77.6.dk** | %0 | %100 | %0 | %0 |
| | | **1.pompa 78.6. dk** | %0 | %100 | %0 | %0 |
| | | **1.pompa 81.6 dk** | %100 | %0 | %0 | %0 |
| | | **1.pompa 83.6. dk** | %100 | %0 | %0 | %0 |
| | | **1.pompa 83.7.dk** | %100 | %0 | %0 | %0 |
| | | **1.pompa 107.7 dk** | %0 | %100 | %0 | %0 |
| | | **1.pompa 108.7 dk** | %0 | %100 | %0 | %0 |
| | | **1.pompa 111.7 dk** | %100 | %0 | %0 | %0 |
| | | **1.pompa 113.7 dk** | %100 | %0 | %0 | %0 |
| | **Kolon Fırını Sıcaklık** | 30 - 35°C **Akış Hızı:** 1 mL/dk | | | | |
| | **Valf Sistemi Pozisyonu** | **Süre** | | **Valf -1 (6 PT/2 PS Valf)** | **Valf -2 (6 PT/2 PS Valf)** | **Valf -3 (10 PT/2 PS Valf)** |
| | | **0 - 1.5 dk arası** | | P2 | P1 | P2 |
| | | **1.5 -6.1 dk arası** | | P1 | P1 | P2 |
| | | **6.1 - 56.1 dk arası** | | P1 | P2 | P1 |
| | | **56.1 -83.7 dk arası** | | P1 | P2 | P1 |
| | | **83.7 – 113.7 dk arası** | | P2 | P1 | P2 |
| | **Buharlaştırma sıcaklığı** 40°C **Nebülizasyon sıcaklığı** 80°C **Gaz akısı**1.5 SLM | | | | | |

**Çizelge 4. 36.** SPE,NP-HPLC, FIA ve $Ag^{+}$-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı I.,II. ve III. boyut ayrım analizleri için kullanılan parametreler

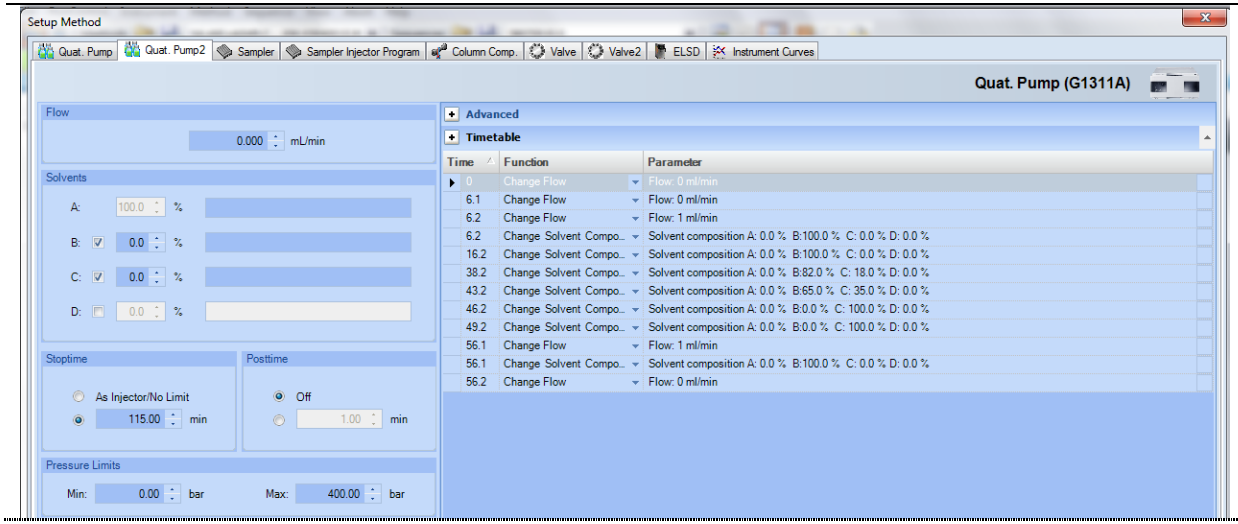
**SPE, NP-HPLC, FIA ve $Ag^{+}$-HPLC tekniğinin birleştirilerek uygulandığı I., II. ve III. boyut ayrım analizleri için tespit edilen optimum metot programlaması**






**I. gradient pompaya ait programlama**

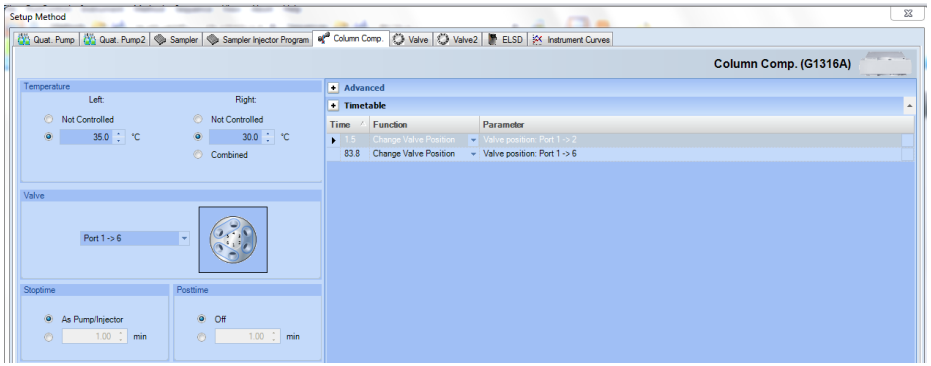
- 0. dk- 1,5. dk →→→ SPE tekniğinin uygulandığı I. boyut ayrım aşaması
- 1,5. dk- 6,1. dk →→→ NP-HPLC tekniğinin uygulandığı II. boyut ayrım aşaması
- 6,1. dk- 56,1. dk →→→ Aktif değil
- 56,1. dk- 83,7. dk →→→ NP-HPLC tekniğinin uygulandığı II. boyut ayrım aşamasında kalan türlerin tayin basamağı
- 83,7. dk- 113,7. dk →→→ SPE tekniğinin uygulandığı I. boyut ayrım aşamasında kalan türlerin tayin basamağı






**II. gradient pompaya ait programlama**

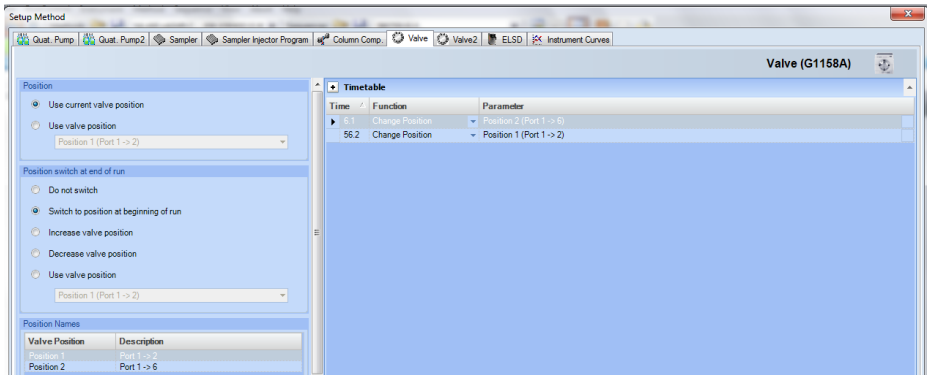
- 0. dk- 6,1. dk →→→ Aktif değil
- 6,1. dk- 56,1. dk →→→ $Ag^{+}$-HPLC tekniğinin uygulandığı III. boyut ayrım basamağı
- 56,1. dk- 113,7. dk →→→ Aktif değil






**Valf sistemi- I (6PT/2PS) e ait programlama**

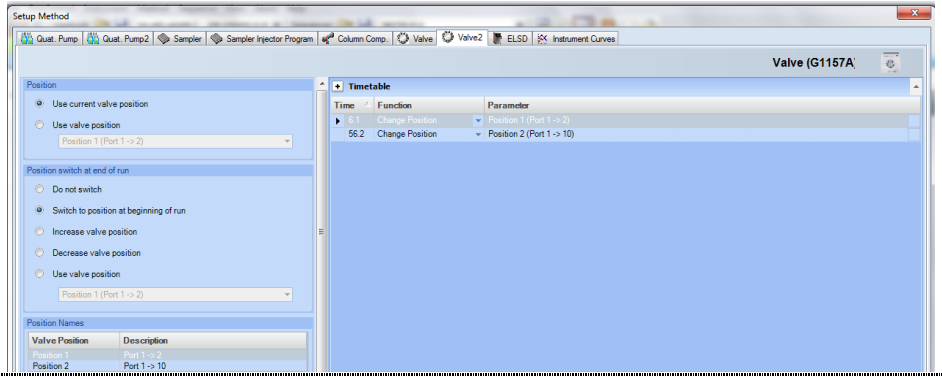
- 1,5. dk →→→ SPE tekniğinin uygulandığı I. boyut ayrım aşamasından NP-HPLC tekniğinin uygulandığı II. boyut ayrım aşamasına geçiş
- 83,7. dk →→→ SPE tekniğinin uygulandığı I. boyut ayrım aşamasında kalan türlerin tayin basamağına geçiş






**Valf sistemi- II (6PT/2PS) e ait programlama**

- 6. dk →→→ NP-HPLC tekniğinin uygulandığı II. boyut ayrım aşamasından $Ag^{+}$-HPLC tekniğinin uygulandığı III. boyut ayrım basamağına geçiş
- 56,1. dk →→→ NP-HPLC tekniğinin uygulandığı II. boyut ayrım aşamasında kalan türlerin tayin basamağına geçiş






**Valf sistemi- III (10PT/2PS) e ait programlama**

- 6. dk →→→ NP-HPLC tekniğinin uygulandığı II. boyut ayrım aşamasından $Ag^{+}$-HPLC tekniğinin uygulandığı III. boyut ayrım basamağına geçiş
- 56,1. dk →→→ NP-HPLC tekniğinin uygulandığı II. boyut ayrım aşamasında kalan türlerin tayin basamağına geçiş

**KAYNAKLAR**

Abidi, S. L. 2000. "Chromatographic analysis of tocol-derived lipid ntioxidants", *Journal of Chromatography A* , 881 (1-2), 197–216.

Agilent tech. 2011. "Agilent 380-ELSD Evaporative Light Scattering Detector Data Sheet", http://www.hicorpo.com/s_menu/pdf/Agilent%20380-ELSD.pdf. Son erişim tarihi 08 Ağustos 2015.

Aluyor, E. O.; Ozigagu, C. E.; Oboh, O. I.; Aluyor, P. 2009. "Chromatographic analysis of vegetable oils: A review". *Scientific Research and Essay* , 4 (4), 191-197.

American Oil Chemists' Society Official method, AOCS Ce 8-89. "Determination of tocopherols and tocotrienols in vegetable oils and fats by HPLC".

Arslan, F. N. 2007. "Bitkisel Yağların Kızartma Özelliklerinin İncelenmesi", Yüksek Lisans Seminer Kitabı. *Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Konya.

Arslan, F. N. 2009. "Ülkemizde Üretilen Pamuk Yağlarının Rafinasyonunun İyileştirilmesiyle Kullanım Verimliliklerinin Artırılması", Yüksek Lisans Tezi. *Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Konya.

Bateman, H. G.; Jenkins, T. C. 1997. "Method for Extraction and Separation by Solid Phase Extraction of Neutral Lipid, Free Fatty Acids, and Polar Lipid from Mixed Microbial Cultures". *J. Agric. Food Chem.* , 45 (1), 132−134.

Bayir, H.; Vladimir A. T.; Yulia Y. T.; Rosa, V.; et. 2007. "Selective early cardiolipin peroxidation after traumatic brain injury: an oxidative lipidomics analysis" *Annals of Neurology* 62 (2), 154–169.

Brereton, R. G. 1997. Multilevel Multifactor Designs for Multivariate Calibration. *Analyst*, 122, 1521–1529.

Cert A.; Moreda, W.; Perez-Camino, M.C. 2000. "Chromatographic analysis of minor constituents in vegetable oils". *Journal of Chromatography A* , 881 (1-2), 131-148.

Christie W.W.; Han, X. 2010. "Lipid analysis, Isolation, Separation, Identification and

Lipidomic Analysis". Fourth Edition, *Woodhead Publishing in Food Science, Technology and Nutrition*. The Oily Press.

Cohen, S. A.; Schure, M.R. 2008. "Multidimensional Liquid Chromatography: Theory and Applications in Industrial Chemistry and the Life Sciences". Online ISBN: 9780470276266. *John Wiley & Sons, Inc.*

Çallı Altun, N. 2007. "Katı Faz Ekstraksiyon ve Gaz Kromatografik Metotlarla Gıda Örneklerinde Pestisit Analizleri", Doktora Tezi. *Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Bursa.

Çiftçi, Y. "Bitkisel ve Hayvansal Katı ve Sıvı Yağlar (Lipitler)". http://www.istgumlab.com/yciftci/wpcontent/uploads/2013/12/Bitkisel%20ve%20Hayvansal%20Kati%20ve%20Sivi%20Yaglar.pdf.Son erişim tarihi 08 Ağustos 2015.

Demirci, M. 2001. "Gıda Kimyası". *Onur Grafik*. ISBN 975-97146-2-0.Tekirdağ.

Demirkan, İ. 2007. "Kromatografik Gıda Analizlerinde, Örnek Hazırlama Aşamasına Yönelik Ters Faz Polimerik Katı Faz Ekstraksiyon Malzemelerinin Geliştirilmesi ve Karakterizasyonu", Yüksek Lisans Tezi. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kayseri.

Dugo, P.; Kumm, T.; Crupi, M. L.; Cotroneo, A.; Mondello, L. 2006. "Comprehensive two-dimensional liquid chromatography combined with mass spectrometric detection in the analyses of triacylglycerols in natural lipidic matrixes". *Journal of Chromatography A* , 1112 (1-2), 269–275.

Dybvika, A. I.; Falch, E.; Rustada, T. 2008. "Solid Phase Extraction as a Tool to Separate Lipid Classes and Study Deterioration of Marine Lipids". *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 17 (1), 39-59.

Eichenberger, W.; Araki, S.; Müller, D. G. 1993. "Betaine Lipids and Phospholipids in Brown Algae". *Phytochemistry*, 34 (5), 1223-1233.

Fagan, P.; Wijesundera C. (2004). "Liquid chromatographic analysis of milk phospholipids with on-line pre-concentration". *Journal of Chromatography A*,

1054 (1-2), 241–249.

Foglia, T. A.; Jones, K. C. 1997. "Quantitation of Neutral Lipid Mixtures Using High Performance Liquid Chromatography with Light Scattering Detection". *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 20 (12), 1829-1838.

Genge, B. R.; Wue, L. N.; Wuthier, R. E. 2003. "Separation and quantification of chicken and bovine growth plate cartilage matrix vesicle lipids by high-performance liquid chromatography using evaporative light scattering detection". *Analytical Biochemistry* , 322 (1), 104-115.

Gezici, O. 2010. "Akış Enjeksiyon-Kromatografik Yöntemlerle İmmobilize Hümik Asidin Sabit Faz Özelliklerinin İncelenmesi" Doktora Tezi. *Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Konya.

Gunstone, F. 2008. "Oils and Fats in the Food Industry". ISBN: 978-1-4051-7121-2, A *John Wiley & Sons, Ltd*. Publication.

Güler, G. 2009. "Soğuk Presyon ve Kimyasal Rafinasyon Yöntemleri ile Üretilen Kanola (Kolza) Yağlarının Bazı Fiziksel ve Kimyasal Özelliklerinin Karşılaştırılması", Yüksek Lisans Tezi. *Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Tekirdağ.

Hopia, A. P.; Piironen, V.I.; Koivistoinen, P. E.; Hyvönen, L. E. T. 1992. "Analysis of lipid classes by solid-phase extraction and high-performance size exclusion chromatography". *J. Am. Oil Chem. Soc.* , 69 (8), 772-776.

Juaneda, P.; Rocquelin, G. 1985. "Rapid and convenient separation of phospholipids and non phosphorus lipids from rat heart using silica cartridges". *Lipids* , 20 (1), 40-41.

Kaluzny, M. A.; Duncan, L. A.; Merritt, M. V.; Epps, D. E. 1985. "Rapid separation of lipid classes in high yield and purity using bonded phase columns". *Journal of Lipid Research* , 26, 135-140.

Kara, H. 2013. Yağ Rafinasyonu Teknikleri Ders Notları. *Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi, Kimya Bölümü*, Konya.

Karahasan, S. 2012. "Ham Pamuk Yağından Enzimatik Yöntemle Fosfolipidlerin Giderilmesi", Yüksek Lisans Tezi. *İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, İstanbul.

Karatapanis, A.E., Fiamegos, Y.C., Sakkas, VA.., Stalikas, C.D. 2011. "Effect of chromatographic parameters and detector settings on the response of HILIC–evaporative light-scattering detection system using experimental design approach and multicriteria optimization methodology". *Talanta* 83, 1126–1133.

Kayahan, M. 2003, "Yağ Kimyası", *ODTÜ Yayıncılık*, Ankara.

Klifta, E. J.C. van der, Gabriel Vivó-Truyolsb, Frank W. Claassena, Frederique L. van Holthoona, Teris A. van Beek. 2008. "Comprehensive two-dimensional liquid chromatography with ultraviolet, evaporative light scattering and mass spectrometric detection of triacylglycerols in corn oil", *Journal of Chromatography A*, 1178, 1–2, 43–55.

Konuşkan, D. B. 2008. "Hatay'da Yetiştirilen Halhalı, Sarı Haşebi ve Gemlik Zeytin Çeşitlerinden Çözücü Ekstraksiyonuyla Elde Edilen Yağların Bazı Niteliklerinin Belirlenmesi ve Mekanik Yöntemle Elde Edilen Zeytinyağları ile Karşılaştırılması", Doktora Tezi. *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Adana.

Kuşcu, M. 2008. "Akış-Enjeksiyon Analizi ile Su Numunelerinden Kurşun Giderilmesi ve Önderiştirilmesi", Yüksek Lisans Tezi. *Trakya Üniveristesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Edirne.

Manzi, P.; Panfili G.; Esti, M.; Pizzoferrato, L. 1998. "Natural Antioxidants in the Unsaponifiable Fraction of Virgin Olive Oils From Different Cultivars". *J Sci Food Agric* , 77, 115-120.

Marquez-Ruiz, G. D. 1997. "New Techniques and Applications in Lipid Analysis". *AOCS Press*.

McDonald, P.D.; Bouvier, E.S.P. 1995. "Solid Phase Extraction, Applications Guide and Bibliography". ISBN 1879732068, 9781879732063, *Waters Corporation*.

McDonald, R.E..; Mossoba, M.M. 1997. "New Techniques and Applications in Lipid Analysis". *AOCS Press*.

McLaren D.G.; Miller, P.L.; Lassman, M.E.; Castro-Perez, J.M.; Hubbard, B.K.; Roddy, T.P. 2011. "An ultraperformance liquid chromatography method for the normal-phase separation of lipids". *Analytical Biochemistry* , 414 (2), 266–272.

Megoulas, N.C., Koupparis, M.A. 2005. "Twenty Years of Evaporative Light Scattering Detection". *Cr Rev Anal Chem*., 35, 301–316.

Milli Eğitim Bakanlığı. 2011. "Lipitler", *Gıda Teknolojisi Mesleki Eğitim ve Öğretim Sisteminin Güçlendirilmesi Projesi*.

Moreda,W.; Pérez-Camino, M.C.; Cert, A. 2001. "Gas and liquid chromatography of hydrocarbons in edible vegetable oils". *Journal of Chromatography A,* 936 (1–2), 159–171.

Nas, S.; Gökalp, H.Y.; Ünsal, M. 2001. "Bitkisel Yağ Teknolojisi". *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Matbaası*, Denizli.

O'Brien, R.D. 2004. "Fats and Oils, Formulating and Processing for Applications". ISBN 9781420061666, *CRC Press LLC*.

Okur, A. 2008. "Derin Yağda Kızartma İşleminin Bazı Bitkisel Sıvı Yağların Yağ Asiti Bileşimleri İle Oksidatif Stabiliteleri Üzerine Etkileri", Yüksek Lisans Tezi. *Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Edirne.

Olsen, R. E.; Henderson, R. J. 1989. "The rapid analysis of neutral and polar marine lipids using double-development HPTLC and scanning densitometry". *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* , 129 (2), 189-197.

Olsson, P.; Holmbäck, J.; Herslöf, B. 2012. "Separation of Lipid Classes by HPLC on a Cyanopropyl Column". *Lipids* , 47 (1), 93–99.

Panagiotopoulou, P.M.; Tisimidou, M. 2002. "Solid Phase Extraction: Applications to the Chromatographic Analysis of Vegetable Oils and Fats". *Grasas y Aceites* , 53 (1), 84-95.

Pehlivan, B. 2009. "Farklı Üretim Teknikleriyle Elde Edilen Zeytinyağlarını Karşılaştırılması", Yüksek Lisans Tezi. *Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Çanakkale.

Persson, E.; Löfgren, L.; Hansson, G.; Abrahamsson, B.; Lennernäs, H.; Nilsson, R. 2007. "Simultaneous assessment of lipid classes and bile acids in human intestinal fluid by solid-phase extraction and HPLC methods". *J. Lipid Res.*, 48, 242–251.

Pucsok, J.; Kovács, L.; Zalka, A.; Dobó, R. 1988. "Separation of Lipids by New Thin-Layer Chromatography and Overpressured Thin-Layer Chromatography Methods". *Clinical Biyochemistry* , 21 (2), 81-85.

Rodríguez-Alcalá, L. M.; Fontecha, J. 2010. "Major lipid classes separation of buttermilk, and cows, goats and ewes milk by high performance liquid chromatography with an evaporative light scattering detector focused on the phospholipid fraction". *Journal of Chromatography A* , 1217 (18), 3063-3066.

Ruiz-Gutierrez, V.; Perezcamino, M. C. 2000. "Update on solid-phase extraction for the analysis of lipid classes and related compounds". *Journal of Chromatography A*, 885 (1-2), 321–341.

Shalliker, R.A. 2012. "Hyphenated and Alternative Methods of Detection in Chromatography". ISBN 9780849390777, *CRC Press*.

Sikorski, Z. E.; Kolakowska, A. 2003. "Chemical and Functional Properties of Food Lipids". eBook ISBN: 978-1-4200-3199-7, *CRC Press LLC*.

Silversand, C.; Haux, C. 1997. "Improved high-performance liquid chromatographic method for the separation and quantification of lipid classes: application to fish lipids". *Journal of Chromatography B* , 703 (1-2), 7-14.

Skoog, D.A.; West, D.M.; Holler, F.J. 1999."Fundamentals of Analytical Chemistry" 7. Ed., *Sounders College Publishing*.

Stoll, D.R.; Xiaoping, L.; Wang, X.; Carr, P.W.; Porter, S.E.G.; Rutan, S.C. 2007. "Fast, comprehensive two-dimensional liquid chromatography". *J Chromatogr A.*,

1168 (1-2), 3-43.

Taş, T. 2008. "Katışıklı Zeytinyağlarında Katıştırılan Yağ Cinsi ve Oranının FTIR Spektroskopisi ve Kemometrik Yöntemlerle Belirlenmesi", Yüksek Lisans Tezi. *Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Aydın.

Thomaidis, N. S.; Georgiou, C. A. 1999. "Edible oil analysis by flow injection". *Laboratory Automation & Information Management* , 34 (2), 101–114.

Torres, C.F.; Vázquez, L.; Señoráns F. J.; Reglero, G. 2005. "Study of the analysis of alkoxyglycerols and other non-polar lipids by liquid chromatography coupled with evaporative light scattering detector" *Journal of Chromatography A*, 1078(1–2), 28–34.

Türk Gıda Kodeksi. 2011. "Bitki Adı ile Anılan Yağlar Tebliği". TEBLİĞ NO: 2012/29.

UKEssays.2015."Multidimensional-separation-techniques" http://www.ukessays.com/essays/biology/separation-techniques-multidimensional- separation-techniques-biology-essay.php. Son erişim tarihi 08 Ağustos 2015.

Ünsal, E. 2006. " Yüksek performanslı sıvı kromatografisi için farklı polaritelere sahip, fonksiyonel gruplu kolon dolgu materyallerinin sentezi ve kromatografik karakterizasyonu" Doktora Tezi, *Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara.

Velasco, J.; Dobarganes C. 2002. "Oxidative stability of virgin olive oil" *European Journal of Lipid Science and Technology* 104 (9-10), 661–676.

Yu, R.K..; Ariga, T. 2000."Ganglioside analysis by high-performance thin-layer chromatography". *Methods Enzymol*., 312:115-34.

# EKLER

## EK-I. Türk gıda kodeksi bitki adı ile anılan yağlar tebliği

2 Nisan 2012 PERŞEMBE **Resmî Gazete** Sayı : 28262

**TEBLİĞ**

Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığından

**TÜRK GIDA KODEKSİ BİTKİ ADI İLE**

**ANILAN YAĞLAR TEBLİĞİ**

**(TEBLİĞ NO: 2012/29)**

**Amaç**

**MADDE 1 –** (1) Bu Tebliğin amacı, bu Tebliğ kapsamında yer alan bitki adı ile anılan yağların; tekniğine uygun ve hijyenik şekilde üretim, hazırlama, işleme, muhafaza, depolama, taşıma ve pazarlanmasını sağlamak üzere özelliklerini belirlemektir.

**Kapsam**

**MADDE 2 –** (1) Bu Tebliğ, 4 üncü maddenin ikinci fıkrasında tanımları yapılan bitki adı ile anılan yağları kapsar.

(2) Yağ asitlerinin bünyesini veya yağ kıvamını değiştirmek amacıyla esterleştirilmiş veya hidrojene edilmiş yağları ve karışım yağları kapsamaz.

**Dayanak**

**MADDE 3 –** (1) Bu Tebliğ, 29/12/2011 tarihli ve 28157 3 üncü mükerrer sayılı Resmî Gazete'de yayımlanan Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliğine dayanılarak hazırlanmıştır.

**Tanımlar**

**MADDE 4 –** (1) Bu Tebliğ kapsamında yer alan;

a) Bitkisel yağ: Sadece bitkisel kaynaklardan elde edilen, temel olarak yağ asitleri gliseridlerinden oluşan, doğal yapısı gereği az miktarda fosfatidler gibi diğer lipidleri, sabunlaşmayan bileşenleri ve serbest yağ asitlerini içerebilen yağı,

b) Ham yağ: Çözücü ekstraksiyonu ve/veya mekanik yöntemle elde edilen, duyusal ve karakteristik özellikleri bakımından doğrudan tüketime uygun olmayan, rafinasyon veya teknik amaçlı kullanıma uygun olan yağı,

c) Natürel yağ: Doğrudan tüketime uygun olan, yağın yapısını değiştirmeksizin, mekanik yöntemle ve ısı uygulaması ile elde edilen, saflaştırmak amacı ile sadece su ile yıkama, çöktürme, filtrasyon ve santrifüj işlemleri yapılan yağı,

ç) Rafine yağ: Doğal trigliserid yapısında değişikliğe yol açmadan rafine edilen yağı,

d) Soğuk preslenmiş natürel yağ: Doğrudan tüketime uygun olan, ısıl işlem olmaksızın sadece mekanik

yöntemle elde edilen yağı,

ifade eder.

(2) Bu Tebliğ kapsamında yer alan;

a) Aspir yağı: Aspir bitkisinin (Carthamus tinctorious L.) tohumlarından elde edilen yağı,

b) Ayçiçek yağı: Ayçiçek bitkisinin (Helianthus annuus L.) tohumlarından elde edilen yağı,

c) Babassu yağı: Çeşitli palm orbignya türlerinin meyve çekirdeklerinden elde edilen yağı,

ç) Fındık yağı: Fındık ağacının (Corylus avellana L., Corylus maksima ve Corylus colbina) meyvelerinden elde edilen yağı,

d) Hindistancevizi yağı: Hindistancevizi (Cocos nucifera L.) meyvesinden elde edilen yağı,

e) Kanola/Düşük erusik asitli kolza yağı: Düşük erusik asitli yağ içeren Brassica napus L., Brassica campestris L. ve Brassica juncea L.'nin tohumlarından elde edilen yağı,

f) Mısır yağı: Mısır bitkisi (Zea mays L.) tanelerinin embriyolarından elde edilen yağı,

g) Palm çekirdeği yağı: Palm (Elaeis guineensis) meyvesinin çekirdeğinden elde edilen yağı,

ğ) Palm çekirdeği olein: Fraksiyonlarına ayrılan palm çekirdeği yağının sıvı kısmını,

h) Palm çekirdeği stearin: Fraksiyonlarına ayrılan palm çekirdeği yağının katı kısmını,

ı) Palm olein: Fraksiyonlarına ayrılan palm yağının sıvı kısmını,

i) Palm stearin: Fraksiyonlarına ayrılan palm yağının erime noktası yüksek olan kısmını,

j) Palm süperolein: Kontrollü kristalizasyon işlemi ile iyot sayısı en az 60 olacak şekilde üretilmiş ve fraksiyonlarına ayrılmış palm yağının sıvı kısmını,

k) Palm yağı: Palm (Elaeis guineensis) meyvesinin etli mezokarbından elde edilen yağı,

l) Pamuk yağı: Çeşitli Pamuk (Gossypium spp.) kültürlerinin tohumlarından elde edilen yağı,

m) Soya yağı: Soya fasulyesinden (Glycine max (L.) Merr.) elde edilen yağı,

n) Susam yağı: Susam bitkisinin (Sesamum indicum L.) tohumlarından elde edilen yağı,

o) Üzüm çekirdeği yağı: Üzüm bitkisinin (Vitis vinifera L.) çekirdeklerinden elde edilen yağı,

ö) Yer fıstığı yağı: Yer fıstığından (Arachis hypogaea L.) elde edilen yağı,

ifade eder.

**Ürün özellikleri**

**MADDE 5 –** (1) Bu Tebliğ kapsamındaki ürünlerin özellikleri aşağıda verilmiştir:

a) Yabancı ve/veya ransit tat ve koku içermemesi, ham ve natürel yağların kendine has renk, tat ve kokuda olması gerekir.

b) Yağ asitleri kompozisyonunun EK-1'de verilen tablodaki değerlere uygun olması gerekir.

c) Diğer kalite kriterlerinin EK-2'de verilen tablodaki değerlere uygun olması gerekir.

ç) Fiziksel ve kimyasal özelliklerin EK-3'te verilen tablodaki değerlere uygun olması gerekir.

d) Sterol kompozisyonlarının EK-4'te verilen tablodaki değerlere uygun olması gerekir.

e) Palm oleinin kayma noktası 24 $^{o}$C'den fazla olamaz.

f) Palm stearinin kayma noktası 44 $^{o}$C'den az olamaz.

g) Palm çekirdeği oleinin kayma noktasının 21 $^{o}$C-26 $^{o}$C aralığında olması gerekir.

ğ) Palm çekirdeği stearinin kayma noktasının 31 $^{o}$C-34 $^{o}$C aralığında olması gerekir.

h) Yer fıstığı yağı için, araşidik ve daha yüksek karbonlu yağ asitleri miktarı 48 g/kg'ı geçemez.

ı) Üzüm çekirdeği yağının eritrodiyol içeriği toplam sterolün % 2'sinden az olamaz.

i) Ağartılmamış palm yağı, ağartılmamış palm olein ve ağartılmamış palm stearinde; beta-karoten cinsinden toplam karotenoid miktarlarının sırasıyla; 500-2000, 550-2500 ve 300-1500 mg/kg olması gerekir.

(2) Bu Tebliğ kapsamında yer alan yağlara, mineral yağlar, sentetik yağlar, esterleştirilmiş yağlar veya diğer yağlar karıştırılamaz.

**Katkı maddeleri**

**MADDE 6 –** (1) Bu Tebliğ kapsamında yer alan ürünlerde kullanılacak katkı maddeleri, 29/12/2011 tarihli ve 28157 3 üncü mükerrer sayılı Resmî Gazete'de yayımlanan Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliğinde yer alan hükümlere uygun olur.

(2) Bu Tebliğ kapsamında yer alan natürel ve soğuk preslenmiş bitkisel yağlara hiç bir katkı maddesi ilave edilemez.

**Aroma vericiler ve aroma verme özelliği taşıyan gıda bileşenleri**

**MADDE 7 –** (1) Bu Tebliğ kapsamındaki ürünlerde kullanılacak, aroma vericiler ve aroma verme özelliği taşıyan gıda bileşenleri, 29/12/2011 tarihli ve 28157 3 üncü mükerrer sayılı Resmî Gazete'de yayımlanan Türk Gıda Kodeksi Aroma Vericiler ve Aroma Verme Özelliği Taşıyan Gıda Bileşenleri Yönetmeliğinde yer alan hükümlere uygun olur.

**Bulaşanlar**

**MADDE 8 –** (1) Bu Tebliğ kapsamında yer alan ürünlerdeki bulaşanların miktarları, 29/12/2011 tarihli ve

28157 3 üncü mükerrer sayılı Resmî Gazete'de yayımlanan Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliğinde yer alan hükümlere uygun olur.

**Pestisit kalıntıları**

**MADDE 9 –** (1) Bu Tebliğ kapsamında yer alan ürünlerdeki pestisit kalıntı miktarları, 29/12/2011 tarihli ve 28157 3 üncü mükerrer sayılı Resmî Gazete'de yayımlanan Türk Gıda Kodeksi Pestisitlerin Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliği'nde yer alan hükümlere uygun olur.

**Hijyen**

**MADDE 10 –** (1) Bu Tebliğ kapsamında yer alan ürünler, 29/12/2011 tarihli ve 28157 3 üncü mükerrer sayılı Resmî Gazete'de yayımlanan Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliğinde yer alan hükümlere uygun olur.

**Ambalajlama**

**MADDE 11 –** (1) Bu Tebliğ kapsamında yer alan ürünlerin ambalajları, 29/12/2011 tarihli ve 28157 3 üncü mükerrer sayılı Resmî Gazete'de yayımlanan Türk Gıda Kodeksi Gıda ile Temas Eden Madde ve Malzemeler Yönetmeliğinde yer alan hükümlere uygun olur.

**Etiketleme**

**MADDE 12 –** (1) Bu Tebliğ kapsamında yer alan ürünler, 29/12/2011 tarihli ve 28157 3 üncü mükerrer sayılı Resmî Gazete'de yayımlanan Türk Gıda Kodeksi Etiketleme Yönetmeliğinde yer alan hükümler ile birlikte aşağıdaki hükümlere de uygun olur:

a) 4 üncü maddenin ikinci fıkrasında yer alan tanımlar ürün adı olarak kullanılır. Ancak, ürünlerin adlandırılmasında, üretim teknolojisine uygun olarak, 4 üncü maddenin birinci fıkrasında yer alan ifadeler; "natürel … yağı" veya "rafine … yağı" olarak kullanılabilir. Uygun teknoloji ile üretilmesi koşulu ile "soğuk preslenmiş" ifadesi de kullanılabilir.

b) Bu Tebliğ kapsamında yer alan ve EK-1'de belirtilen yağ asidi kompozisyonuna göre adlandırılan yağlar için; "yüksek oleik asitli" ifadesi de etikette ürün adı ile aynı görüş alanında kullanılır.

**Numune alma ve analiz yöntemleri**

**MADDE 13 –** (1) Bu Tebliğ kapsamında yer alan ürünlerden numune alınması ve analizleri, Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliğine uygun olur.

**İdari yaptırım**

**MADDE 14 –** (1) Bu Tebliğe aykırı davrananlar hakkında 11/6/2010 tarihli ve 5996 sayılı Veteriner Hizmetleri, Bitki Sağlığı, Gıda ve Yem Kanunun ilgili maddelerine göre idari yaptırım uygulanır.

**Yürürlükten kaldırılan tebliğ**

**MADDE 15 –** (1) 13/10/2001 tarihli ve 24552 sayılı Resmî Gazete'de yayımlanan Türk Gıda Kodeksi Bitki Adı ile Anılan Yemeklik Yağlar Tebliği (Tebliğ No: 2001/29) yürürlükten kaldırılmıştır.

**GEÇİCİ MADDE 1 –** (1) Bu Tebliğ kapsamında faaliyet gösteren gıda işletmecileri, 1/3/2013 tarihine

kadar bu Tebliğ hükümlerine uymak zorundadır.

(2) Bu Tebliğin yayımından önce faaliyet gösteren gıda işletmecileri, bu Tebliğ hükümlerine uyum sağlayıncaya kadar, yürürlükten kaldırılan Türk Gıda Kodeksi Bitki Adı ile Anılan Yemeklik Yağlar Tebliği hükümlerine uymak zorundadır.

**Yürürlük**

**MADDE 16 –** (1) Bu Tebliğ yayımı tarihinde yürürlüğe girer.

**Yürütme**

**MADDE 17 –** (1) Bu Tebliğ hükümlerini Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanı yürütür.

## EK-II. Bitkisel yağların gaz-sıvı kromatografi tekniği ile tespit edilen yağ asit kompozisyon verileri (% toplam yağ asidi)

| Yağ asitleri | Aspir Yağı | Aspir Yağı (yüksek oleik asitli) | Ayçiçek Yağı | Ayçiçek Yağı (yüksek oleik asitli) | Babassu Yağı | Fındık Yağı | Hindistan cevizi Yağı | Kanola/ Düşük Erusik Asitli Kolza Yağı | Mısır Yağı | Palm Yağı |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Kaproik** C6:0 | TED | TED | TED | TED | TED | TED | TED-0,7 | TED | TED | TED |
| **Kaprilik** C8:0 | TED | TED | TED | TED | 2,6-7,3 | TED | 4,6-10,0 | TED | TED | TED |
| **Kaprik** C10:0 | TED | TED | TED | TED | 1,2-7,6 | TED | 5,0-8,0 | TED | TED | TED |
| **Laurik** C12:0 | TED | TED-0,2 | TED-0,1 | TED | 40,0-55,0 | TED | 45,1-53,2 | TED | TED-0,3 | TED-0,5 |
| **Miristik** C14:0 | TED-0,2 | TED-0,2 | TED-1,0 | TED-0,1 | 11,0-27,0 | TED-0,1 | 16,8-21,0 | TED-0,2 | TED-0,3 | 0,5-2,0 |
| **Palmitik** C16:0 | 5,3-8,0 | 3,6-6,0 | 4,0-7,6 | 2,6-5,0 | 5,2-11,0 | 4,2-8,9 | 7,5-10,2 | 2,5-7,0 | 8,6-16,5 | 39,3-47,5 |
| **Palmitoleik** C16:1 | TED-0,2 | TED-0,2 | TED-0,3 | TED-0,1 | TED | TED-0,5 | TED | TED-0,6 | TED-0,5 | TED-0,6 |
| **Margarik** C17:0 | TED-0,1 | TED-0,1 | TED-0,2 | TED-0,1 | TED | TED-0,1 | TED | TED-0,3 | TED-0,1 | TED-0,2 |
| **Heptadesenoik** C17:1 | TED-0,1 | TED-0,1 | TED-0,1 | TED-0,1 | TED | TED-0,1 | TED | TED-0,3 | TED-0,1 | TED |
| **Stearik** C18:0 | 1,9-2,9 | 1,5-2,4 | 2,1-6,5 | 2,9-6,2 | 1,8-7,4 | TED-3,2 | 2,0-4,0 | 0,8-3,0 | TED-3,3 | 3,5-6,0 |
| **Oleik** C18:1 | 8,4-21,3 | 70,0-83,7 | 14,0-71,8 | 75-90,7 | 9,0-20,0 | 71,0-91,0 | 5,0-10,0 | 51,0-70,0 | 20,0-42,2 | 36,0-44,0 |
| **Linoleik** C18:2 | 67,8-83,2 | 9,0-19,9 | 18,7-74,0 | 2,1-17 | 1,4-6,6 | 5,2-22,3 | 1,0-2,5 | 15,0-30,0 | 34,0-65,6 | 9,0-12,0 |
| **Linolenik** C18:3 | TED-0,1 | TED-1,2 | TED-0,5 | TED-0,3 | TED | TED-0,3 | TED-0,2 | 5,0-14,0 | TED-2,0 | TED-0,5 |
| **Araşidik** C20:0 | 0,2-0,4 | 0,3-0,6 | 0,1-0,5 | 0,2-0,5 | TED | TED-0,2 | TED-0,2 | 0,2-1,2 | 0,3-1,0 | TED-1,0 |
| **Eikosenoik (Gadoleik)** C20:1 | 0,1-0,3 | 0,1-0,5 | TED-0,3 | 0,1-0,5 | TED | TED-0,2 | TED-0,2 | 0,1-4,3 | 0,2-0,6 | TED-0,4 |
| **Eikosadienoik** C20:2 | TED | TED | TED | TED | TED | TED | TED | TED-0,1 | TED-0,1 | TED |
| **Behenik** C22:0 | TED-1,0 | TED-0,4 | 0,3-1,5 | 0,5-1,6 | TED | TED-0,1 | TED | TED-0,6 | TED-0,5 | TED-0,2 |
| **Dokosenoik (Erusik)** C22:1 | TED-1,8 | TED-0,3 | TED-0,3 | TED-0,3 | TED | TED-0,1 | TED | TED-2,0 | TED-0,3 | TED |
| **Dokosadienoik** C22:2 | TED | TED | TED-0,3 | TED | TED | TED | TED | TED-0,1 | TED | TED |
| **Lignoserik** C24:0 | TED-0,2 | TED-0,3 | TED-0,5 | TED-0,5 | TED | TED | TED | TED-0,3 | TED-0,5 | TED |
| **Nervonik** C24:1 | TED-0,2 | TED-0,3 | TED | TED | TED | TED-0,3 | TED | TED-0,4 | TED | TED |

TED: Tespit edilemeyen düzey (≤ % 0,05)

## EK-II. devamı

| Yağ asitleri | Palm Çekirdeği Yağı | Palm Çekirdeği Olein | Palm Çekirdeği Stearin | Palm Olein | Palm Stearin | Palm süperolein | Pamuk Yağı | Soya Yağı | Susam Yağı | Üzüm Çekirdeği Yağı | Yer Fıstığı Yağı |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Kaproik** C6:0 | TED-0,8 | TED-0,7 | TED-0,2 | TED | TED | TED | TED | TED | TED | TED | TED |
| **Kaprilik** C8:0 | 2,4-6,2 | 2,9-6,3 | 1,3-3,0 | TED | TED | TED | TED | TED | TED | TED | TED |
| **Kaprik** C10:0 | 2,6-5,0 | 2,7-4,5 | 2,4-3,3 | TED | TED | TED | TED | TED | TED | TED | TED |
| **Laurik** C12:0 | 45,0-55,0 | 39,7-47,0 | 52,0-59,7 | 0,1-0,5 | 0,1-0,5 | 0,1-0,5 | TED-0,2 | TED-0,1 | TED | TED | TED-0,1 |
| **Miristik** C14:0 | 14,0-18,0 | 11,5-15,5 | 20,0-25,0 | 0,5-1,5 | 1,0-2,0 | 0,5-1,5 | 0,6-1,0 | TED-0,2 | TED-0,1 | TED-0,3 | TED-0,1 |
| **Palmitik** C16:0 | 6,5-10,0 | 6,2-10,6 | 6,7-10,0 | 38,0-43,5 | 48,0-74,0 | 30,0-39,0 | 21,4-26,4 | 8,0-13,5 | 7,9-12,0 | 5,5-11,0 | 8,0-14,0 |
| **Palmitoleik** C16:1 | TED-0,2 | TED-0,1 | TED | TED-0,6 | TED-0,2 | TED-0,5 | TED-1,2 | TED-0,2 | TED-0,2 | TED-1,2 | TED-0,2 |
| **Margarik** C17:0 | TED | TED | TED | TED-0,2 | TED-0,2 | TED-0,1 | TED-0,1 | TED-0,1 | TED-0,2 | TED-0,2 | TED-0,1 |
| **Heptadesenoik** C17:1 | TED | TED | TED | TED-0,1 | TED-0,1 | TED | TED-0,1 | TED-0,1 | TED-0,1 | TED-0,1 | TED-0,1 |
| **Stearik** C18:0 | 1,0-3,0 | 1,7-3,0 | 1,0-3,0 | 3,5-5,0 | 3,9-6,0 | 2,8-4,5 | 2,1-3,3 | 2,0-5,4 | 4,5-6,7 | 3,0-6,5 | 1,0-4,5 |
| **Oleik** C18:1 | 12,0-19,0 | 14,4-24,6 | 4,1-8,0 | 39.8-46,0 | 15,5-36,0 | 43,0-49,5 | 14,7-21,7 | 17-30 | 34,4-45,5 | 12,0-28,0 | 35,0-69 |
| **Linoleik** C18:2 | 1,0-3,5 | 2,4-4,3 | 0,5-1,5 | 10,0-13,5 | 3,0-10,0 | 10,5-15,0 | 46,7-58,2 | 48,0-59,0 | 36,9-47,9 | 58,0-78,0 | 12,0-43,0 |
| **Linolenik** C18:3 | TED-0,2 | TED-0,3 | TED-0,1 | TED-0,6 | TED-0,5 | 0,2-1,0 | TED-0,4 | 4,5-11,0 | 0,2-1,0 | TED-1,0 | TED-0,3 |
| **Araşidik** C20:0 | TED-0,2 | TED-0,5 | TED-0,5 | TED-0,6 | TED-1,0 | TED-0,4 | 0,2-0,5 | 0,1-0,6 | 0,3-0,7 | TED-1,0 | 1,0-2,0 |
| **Eikosenoik (Gadoleik)** C20:1 | TED-0,2 | TED-0,2 | TED-0,1 | TED-0,4 | TED-0,4 | TED-0,2 | TED-0,1 | TED-0,5 | TED-0,3 | TED-0,3 | 0,7-1,7 |
| **Eikosadienoik** C20:2 | TED | TED | TED | TED | TED | TED | TED-0,1 | TED-0,1 | TED | TED | TED |
| **Behenik** C22:0 | TED-0,2 | TED | TED | TED-0,2 | TED-0,2 | TED-0,2 | TED-0,6 | TED-0,7 | TED-1,1 | TED-0,5 | 1,5-4,5 |
| **Dokosenoik (Erusik)** C22:1 | TED | TED | TED | TED | TED | TED | TED-0,3 | TED-0,3 | TED | TED-0,3 | TED-0,3 |
| **Dokosadienoik** C22:2 | TED | TED | TED | TED | TED | TED | TED-0,1 | TED | TED | TED | TED |
| **Lignoserik** C24:0 | TED | TED | TED | TED | TED | TED | TED-0,1 | TED-0,5 | TED-0,3 | TED-0,4 | 0,5-2,5 |
| **Nervonik** C24:1 | TED | TED | TED | TED | TED | TED | TED | TED | TED | TED | TED-0,3 |

TED: Tespit edilemeyen düzey (≤ % 0,05)

**EK-III. Diğer kalite kriterleri**

| | |
|---|---|
| **Uçucu Madde (105° C)** | En çok % 0,2 (m/m) |
| **Çözünmeyen Safsızlıklar** | En çok % 0,05 (m/m) |
| **Sabun Miktarı** | Rafine yağlarda en çok % 0,005 (m/m)<br>Soğuk preslenmiş ve natürel yağlarda bulunmamalı |
| **Asit Sayısı** | Rafine yağlarda en çok 0,6 mg KOH /g yağ<br>Soğuk preslenmiş ve natürel yağlarda en çok 4,0 mg KOH/g yağ<br>Natürel palm yağında en çok 10,0 mg KOH/g yağ |
| **Peroksit Sayısı** | Rafine yağlarda en çok 10 miliekivalen aktif oksijen / kg yağ<br>Soğuk preslenmiş ve natürel yağlarda en çok 15 miliekivalen aktif oksijen / kg yağ |

# EK-IV. Bitkisel yağların fiziksel ve kimyasal özellikleri

| Bitkisel Yağlar | Bağıl Yoğunluk (X° C/su 20° C) | Yoğunluk (g/mL) | Kırılma İndisi | Sabunlaşma Sayısı (mg KOH/g yağ) | İyot Değeri (Wijs) | Sabunlaşmayan Madde (g/kg) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Aspir Yağı | 0,922-0,927<br>X=20° C | | | 186-198 | 136-148 | ≤ 15 |
| Aspir Yağı<br>(yüksek oleik asitli) | 0,913-0,919<br>X=20° C<br>0,910-0,916<br>X=25° C | 0,912-0,914<br>20° C'de | 1,460-1,464<br>40° C'de<br>1,466-1,470<br>25° C'de | 186-194 | 80-100 | ≤ 10 |
| Ayçiçek Yağı | 0,914-0,923<br>X=20° C | | 1,461-1,471<br>40° C'de | 188-194 | 94-141 | ≤ 15 |
| Ayçiçek Yağı<br>(yüksek oleik asitli) | 0,909-0,915<br>X=25° C | | 1,467-1,471<br>25° C'de | 182-194 | 78-90 | ≤ 15 |
| Babassu Yağı | 0,914-0,917<br>X=25° C | | 1,448-1,451<br>40° C'de | 245-256 | 10-18 | ≤ 12 |
| Fındık Yağı | 0.898-0.915<br>X=20° C | | 1,468-1,473<br>20° C'de | 188-198 | 81-92 | ≤ 15 |
| Hindistancevizi Yağı | 0,908-0,921<br>X=40° C | | 1,448-1,450<br>40° C'de | 248-265 | 6,3-10,6 | ≤ 15 |
| Kanola/Düşük Erusik Asitli Kolza Yağı | 0,914-0,920<br>X=20° C | | 1,465-1,467<br>40° C'de | 182-193 | 105-126 | ≤ 20 |
| Mısır Yağı | 0,917-0,925<br>X=20° C | | 1,465-1,468<br>40° C'de | 187-195 | 103-135 | ≤ 28 |
| Palm Yağı | 0,891-0,899<br>X=50° C | 0,889-0,895<br>50° C'de | 1,454-1,456<br>50° C'de | 190-209 | 50,0-55,0 | ≤ 12 |
| Palm Çekirdeği Yağı | 0,899-0,914<br>X=40° C | | 1,448-1,452<br>40° C'de | 230-254 | 14,1-21,0 | ≤ 10 |
| Palm Çekirdeği Olein | 0,906-0,909<br>X=40° C | 0,904-0,907<br>40° C'de | 1,451-1,453<br>40° C'de | 231-244 | 20-28 | < 15 |
| Palm Çekirdeği Stearin | 0,902-0,908<br>X=40° C | 0,904-0,906<br>40° C'de | 1,449-1,451<br>40° C'de | 244-255 | 4-8,5 | <15 |
| Palm Olein | 0,899-0,920<br>X=40° C | 0,896-0,898<br>40° C'de | 1,458-1,460<br>40° C'de | 194-202 | ≥ 56 | ≤ 13 |
| Palm Stearin | 0,881-0,891<br>X=60° C | 0,881-0,885<br>60° C'de | 1,447-1,452<br>60° C'de | 193-205 | ≤ 48 | ≤ 9 |
| Palm Süperolein | 0,900-0,925<br>X=40° C | 0,897-0,920<br>40° C'de | 1,463-1,465 | 180-205 | ≥ 60 | <13 |
| Pamuk Yağı | 0,918-0,926<br>X=20° C | | 1,458-1,466<br>40° C'de | 189-198 | 100-123 | ≤ 15 |
| Soya Yağı | 0,919-0,925<br>X=20° C | | 1,466-1,470<br>40° C'de | 189-195 | 124-139 | ≤ 15 |
| Susam Yağı | 0,915-0,924<br>X=20° C | | 1,465-1,469<br>40° C'de | 186-195 | 104-120 | ≤ 20 |
| Üzüm Çekirdeği Yağı | 0,920-0,926<br>X=20° C | | 1,467-1,477<br>40° C'de | 188-194 | 128-150 | ≤ 20 |
| Yer Fıstığı Yağı | 0,912-0,920<br>X=20° C | | 1,460-1,465<br>40° C'de | 187-196 | 86-107 | ≤ 10 |

## EK-V. Bitkisel yağların toplam sterol yüzdesi (% toplam sterol)

| | Sterol Kompozisyonu | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Bitkisel Yağlar** | **Kolesterol** | **Brassikasterol** | **Kampesterol** | **Stigmasterol** | **Beta-sitosterol** | **Delta-5-Avenasterol** | **Delta-7-Stigmastenol** | **Delta-7-Avenasterol** | **Toplam Sterol (mg/kg)** |
| **Aspir Yağı** | TED-0,7 | TED-0,4 | 9,2-13,3 | 4,5-9,6 | 40,2-50,6 | 0,8-4,8 | 13,7-24,6 | 2,2-6,3 | 2100-4600 |
| **Aspir Yağı (yüksek oleik asitli)** | TED-0,5 | TED-2,2 | 8,9-19,9 | 2,9-8,9 | 40,1-66,9 | 0,2-8,9 | 3,4-16,4 | TED-8,3 | 2000-4100 |
| **Ayçiçek Yağı** | TED-0,7 | TED-0,2 | 6,5-13,0 | 6,0-13,0 | 50-70 | TED-6,9 | 6,5-24,0 | 3,0-7,5 | 2400-5000 |
| **Ayçiçek Yağı (yüksek oleik asitli)** | TED-0,5 | TED-0,3 | 5,0-13,0 | 4,5-13,0 | 42,0-70 | 1,5-6,9 | 6,5-24,0 | TED-9,0 | 1700-5200 |
| **Babassu Yağı** | 1,2-1,7 | TED-0,3 | 17,7-18,7 | 8,7-9,2 | 48,2-53,9 | 16,9-20,4 | TED | 0,4-1,0 | 500-800 |
| **Fındık Yağı** | TED-0,6 | TED | 4,0-5,8 | 0,7-1,5 | 82,8-86,8 | 2,0-4,5 | 0,3-2,3 | 0,2-1,1 | 1147-2319 |
| **Hindistancevizi Yağı** | TED-3,0 | TED-0,3 | 6,0-11,2 | 11,4-15,6 | 32,6-50,7 | 20,0-40,7 | TED-3,0 | TED-3,0 | 400-1200 |
| **Kanola/Düşük Erusik Asitli Kolza Yağı** | TED-1,3 | 5,0-13,0 | 24,7-38,6 | 0,2-1,0 | 45,1-57,9 | 2,5-6,6 | TED-1,3 | TED-0,8 | 4500-11300 |
| **Mısır Yağı** | TED-0,6 | TED-0,2 | 16,0-24,1 | 4,3-8,0 | 54,8-66,6 | 1,5-8,2 | 0,2-4,2 | 0,3-2,7 | 7000-22100 |
| **Palm Yağı** | 2,6-6,7 | TED | 18,7-27,5 | 8,5-13,9 | 50,2-62,1 | TED-2,8 | 0,2-2,4 | TED-5,1 | 300-700 |
| **Palm Çekirdeği Yağı** | 0,6-3,7 | TED-0,8 | 8,4-12,7 | 12,0-16,6 | 62,6-73,1 | 1,4-9,0 | TED-2,1 | TED-1,4 | 700-1400 |
| **Palm Çekirdeği Olein** | 1,5-1,9 | TED-0,2 | 7,9-9,1 | 13,4-14,7 | 67,1-69,2 | 3,3-4,6 | TED-0,6 | TED-0,5 | 816-1339 |
| **Palm Çekirdeği Stearin** | 1,4-1,7 | TED-2,2 | 8,2-9,7 | 14,1-15,0 | 67,0-70,0 | 3,3-4,1 | TED-0,3 | TED-0,3 | 755-1086 |
| **Palm Olein** | 2,6-7,0 | TED | 12,5-39,0 | 7,0-18,9 | 45,0-71,0 | TED-3,0 | TED-3,0 | TED-6,0 | 270-800 |
| **Palm Stearin** | 2,5-5,0 | TED | 15,0-26,0 | 9,0-15,0 | 50,0-60,0 | TED-3,0 | TED-3,0 | TED-3,0 | 250-500 |
| **Palm Süperolein** | 2,0-3,5 | TED | 22,0-26,0 | 18,2-20,0 | 55,0-70,0 | 0-1,0 | 0-0,3 | 0-0,3 | 100 |
| **Pamuk Yağı** | TED-2,3 | 0,1-0,3 | 6,4-14,5 | 2,1-6,8 | 76,0-87,1 | 1,8-7,3 | TED-1,4 | 0,8-3,3 | 2700-6400 |
| **Soya Yağı** | TED-1,4 | TED-0,3 | 15,8-24,2 | 14,9-19,1 | 47,0-60 | 1,5-3,7 | 1,4-5,2 | 1,0-4,6 | 1800-4500 |
| **Susam Yağı** | TED-0,5 | 0,1-0,2 | 10,1-20,0 | 3,4-12,0 | 57,7-61,9 | 6,2-7,8 | 0,5-7,6 | 1,2-5,6 | 4500-19000 |
| **Üzüm Çekirdeği Yağı** | TED-0,5 | TED-0,2 | 7,5-14,0 | 7,5-12,0 | 64,0-70,0 | 1,0-3,5 | 0,5-3,5 | 0,5-1,5 | 2000-7000 |
| **Yer Fıstığı Yağı** | TED-3,8 | TED-0,2 | 12,0-19,8 | 5,4-13,2 | 47,4-69,0 | 5,0-18,8 | TED-5,1 | TED-5,5 | 900-2900 |

TED: Tespit edilemeyen düzey (≤ % 0,05)

# EK-VI. Çözücülerin bazı fizikokimyasal özellikleri ve çözünebilme kabiliyetleri

| | Polarity Index[1] | Viscosity (cP) | UV (nm) Cutoff[2] | Solubility in Water (%) |
|---|---|---|---|---|
| Acetic Acid | 6.2 | 1.26 | 230 | 100 |
| Acetone | 5.1 | 0.32 | 330 | 100 |
| Acetonitrile | 5.8 | 0.37 | 190 | 100 |
| Benzene | 2.7 | 0.65 | 280 | 0.18 |
| Butanol | 4.0 | 0.73 | 254 | 0.43 |
| Carbon tetrachloride | 1.6 | 0.97 | 263 | 0.08 |
| Chloroform | 4.1 | 0.57 | 245 | 0.815 |
| Cyclohexane | 0.2 | 1.00 | 200 | 0.01 |
| 1,2- Dichloroethane | 3.5 | 0.79 | 225 | 0.81 |
| Dichloromethane | 3.1 | 0.44 | 235 | 1.6 |
| Dimethyl formamide | 6.4 | 0.92 | 268 | 100 |
| Dimethylsulfoxide | 7.2 | 2.00 | 268 | 100 |
| Dioxane | 4.8 | 1.54 | 215 | 100 |
| Ethanol | 5.2 | 1.20 | 210 | 100 |
| Ethyl acetate | 4.4 | 0.45 | 260 | 8.7 |
| Ethyl ether | 2.8 | 0.32 | 220 | 6.89 |
| Heptane | 0.0 | 0.39 | 200 | 0.0003 |
| Hexane | 0.0 | 0.33 | 200 | 0.001 |
| Isopropyl alcohol | 3.9 | 2.30 | 210 | 100 |
| Methanol | 5.1 | 0.60 | 205 | 100 |
| Methyl-t-butyl ether | 2.5 | 0.27 | 210 | 4.8 |
| Methyl ethyl ketone | 4.7 | 0.45 | 329 | 24 |
| Pentane | 0.0 | 0.23 | 200 | 0.0004 |
| Tetrahydrafuran | 4.0 | 0.55 | 215 | 100 |
| Toluene | 2.4 | 0.59 | 285 | 0.051 |
| Water | 9.0 | 1.00 | 200 | 100 |
| Xylene | 2.5 | 0.61 | 290 | 0.018 |




Solvent Miscibility and Viscosity Chart adapted from Paul Sadek The HPLC Solvent Guide Wiley-Interscience, 2002.

Mobile phases, stationary phase, analyte and samples must be compatible

[1] The polarity index is a measure of the relative polarity of a solvent and is useful for identifying suitable mobile phase solvents. The polarity index increases with polarity. For reverse phase chromatography eluent strength decreases as its polarity increases

[2] UV cutoff, the wavelength at which the solvent absorbance in a 1 cm path length cell is equal to 1 AU (absorbance unit) using water in the reference cell.

Solvent Polarity Chart

| Relative Polarity | Formula | Group | Solvents |
|---|---|---|---|
| Non-polar | R-H | Alkanes | Petroleum ethers, hexanes, ligroin |
| | Ar-H | Aromatics | Toluene |
| | R-O-R | Ethers | Diethyl ether |
| | R-X | Alkyl halides | Tricholoromethane, chloroform |
| | R-COOR | Esters | Ethyl acetate |
| | R-CO-R | Aldehydes and ketones | Acetone, MEK |
| | R-NH2 | Amines | Pyridine, triethylamine |
| | R-OH | Alcohols | MeOH, EtOH, IPA, Butanol |
| | R-COHN2 | Amides | Dimethyformamide |
| | R-COOH | Carboxylic Acid | Ethanoic Acid |
| Polar | H-O-H | Water | |

# ÖZGEÇMİŞ

## KİŞİSEL BİLGİLER


**Adı Soyadı** : Fatma Nur ARSLAN

**Uyruğu** : T.C.

**Doğum Yeri ve Tarihi** : Meram, Konya / 1984

**Telefon** : -

**Faks** : -

**e-mail** : arslanfatmanur@gmail.com; nurarslan@kmu.edu.tr


## EĞİTİM

| Derece | Adı, İlçe, İl | Bitirme Yılı |
|---|---|---|
| Lise | Selçuklu M.S.R. Anadolu İmam Hatip Lisesi | 2002 |
| Lisans | Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü | 2006 |
| Y. Lisans | Selçuk Üniversitesi, Fen Bil. Enst. Kimya ABD | 2009 |
| Doktora | Selçuk Üniversitesi, Fen Bil. Enst. Kimya ABD | 2015 |

## İŞ DENEYİMLERİ

| Yıl | Kurum | Görevi/ Ünvanı |
|---|---|---|
| 2009- ... | Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi | Öğr. E./ Arş. Gör. |

## UZMANLIK ALANI

- Analitik Kimya
- Kromatografik teknikler
- Ayırma teknikleri
- On-line birleştirilmiş analiz sistemlerinin tasarımı & uygulamaları
- Çok boyutlu kromatografi tekniği uygulamaları
- Bitkisel yağ teknolojisi & rafinasyonu & analizleri
- Kızartma prosesi & teknolojisi
- Çevre teknolojisi

## YABANCI DİLLER

İngilizce (İyi seviyede)

Arapça (Orta seviyede)

## SEÇİLMİŞ YAYINLAR

**Arslan, F.N.**, Kara, H., **2015**, "Novel, fully automated three-dimensional column-switching SPE-FIA-HPLC system for the characterization of lipids by a single injection: Part I. Instrumental design and chemometric approach to assess the effect of experimental settings on the response of ELSD", R1- Minor revision, Manuscript ID: JAOCS-15-0457, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, (Doktora tezinden yapılmıştır).

**Arslan, F.N.**, Kara, H., Talpur, M. Y., Sherazi, S. T. H., **2015**, "A chemometric approach to evaluate the frying stability of cottonseed oil blends during deep frying process: II. Fatty acid composition and tocopherol analyses", *Int. J. Food Prop.*, 18 (12), 2776-2790 (Yüksek Lisans tezinden yapılmıştır).

Kara, H., **Arslan, F.N.**, **2014**, "A novel on-line SPE-FIA-HPLC hyphenated system for three-dimensional chromatographic analysis of vegetable oils with a single injection" *SKAM27 Congress Book of Abstract*, 9-10 December, Johor Bahru-Malaysia, (Doktora tezinden yapılmıştır).

**Arslan, F.N.**, Kara, H., Ayyildiz, H. F., Topkafa, M., Tarhan, I., Kenar, A., **2013**, "A chemometric approach to evaluate the frying stability of cottonseed oil blends during deep frying process: I. Polar and polymeric compound analyses", *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 90,1179–1193, (Yüksek Lisans tezinden yapılmıştır).