

ZEYTİNYAĞI VE PİRİNA YAĞI NUMUNE ALMA VE ANALİZ METODLARI TEBLİĞİ

Yetki Kanunu: Türk Gıda Kodeksi

Yayımlandığı R.Gazete: 07.08.2010-27665

Tebliğ No: 2010/36

Amaç

MADDE 1 – (1) Bu Tebliğin amacı, zeytinyağı ve pirina yağının resmi kontrolleri için numune alma ve analiz metodu kriterlerini belirlemektir.

Kapsam

MADDE 2 – (1) Bu Tebliğ, zeytinyağı ve pirina yağının numune alma ve analiz metodu kriterlerini kapsar.

Dayanak

MADDE 3 – (1) Bu Tebliğ, 27/5/2004 tarihli ve 5179 sayılı Gıdaların Üretimi, Tüketimi ve Denetlenmesine Dair Kanun Hükmünde Kararnamenin Değiştirilerek Kabulü Hakkında Kanunun 7 nci ve 8 inci maddelerine göre hazırlanmıştır.

Tanımlar

MADDE 4 – (1) Bu Tebliğ'de geçen;

- a) Alt parti: Büyük bir partiyi istatistiksel olarak temsil edecek şekilde fiziksel olarak ayrılmış ve tanımlanmış kısmı,
- b) Bakanlık: Tarım ve Köyşleri Bakanlığını,
- c) Birincil numune: Parti veya alt partinin tek bir yerinden alınan homojen numuneyi,
- ç) Karar ağacı: Bu Tebliğ kapsamında yer alan ürünlerin özelliklerini tespit etmek için kullanılan sistematik işlemler dizinini,
- d) Laboratuvar numunesi: Laboratuvar incelemesi için paçal numuneden, uygun homojenleştirme ve miktar azaltılmasından sonra elde edilen ve partiyi temsil eden yağı,
- e) Paçal numune: Birincil numunelerden oluşan ve birincil numunelerin miktarı esas alınarak yapılan karışımdan hazırlanan numuneyi,

- f) Parti: Numuneyi alan resmi kişi tarafından orijin, çeşit, ambalajlayıcı, ambalaj tipi, işaretleme, sevkiyatı yapan gibi özelliklerinin aynı olduğu belirlenen ve bir seferde teslim edilen, analitik özellikleri bakımından homojen olduğu kabul edilen tanımlanabilir miktardaki yağı,
- g) Sevkiyat: Bir seferde teslim edilen ve belirli bir sözleşme veya taşıma belgesi kapsamında olan yağ miktarını,
- ğ) Şahit numune: Paçal numuneden itirazlı durumlar için ayrılan numuneyi,
- h) UZK: Uluslararası Zeytin Konseyi'ni (IOC), ifade eder.

Numune alma

MADDE 5 – (1) Bu Tebliğ kapsamında yer alan ürünlerin resmi kontrolü için numune alma usul ve esasları Ek - 1A'da yer almaktadır.

Karar ağaçları

MADDE 6 – (1) Bu Tebliğ kapsamındaki ürünlerin değerlendirilmesinde Ek - 1B'de yer alan karar ağaçları kullanılabilir.

(2) Karar ağacının uygulanamadığı durumlarda analizler "TGK-Zeytinyağı ve Pirina Yağı Tebliği"nde yer alan kriterler dikkate alınarak uygun bir sıralamada gerçekleştirilebilir.

Analiz metodu kriterleri

MADDE 7 – (1) Bu Tebliğ kapsamında yer alan ürünlerin resmi kontrolü için analiz metodu kriterleri aşağıdaki eklerde yer almaktadır.

- a) Ek - 2 - Serbest Yağ Asitliği Tayini
- b) Ek - 3 - Peroksit Değeri Tayini
- c) Ek - 4 - Kapiler Kolonlu Gaz Kromatografisi ile Mumsu Maddelerin, Yağ Asitleri Metil Esterleri ve Yağ Asitleri Etil Esterlerinin Tayini
- ç) Ek - 5 - Kapiler Kolonlu Gaz Kromatografisi İle Sterol Kompozisyonunun ve Miktarının Tayini ve Toplam Steroller İçinde Eritrodiol ve Uvaol Yüzdesinin Belirlenmesi
- d) Ek - 6 - 2- Gliseril Monopalmitat Yüzde Miktarının Tayini
- e) Ek - 7 - Ultraviyole Işığında Özgül Soğurma Tayini

- f) Ek - 8A - Yağ Asitlerinin Metil Esterlerinin Gaz Kromatografisi ile Tayini
- g) Ek - 8B - Yağ Asitlerinin Metil Esterlerinin Hazırlanması
- ğ) Ek - 9 - Uçucu Halojene Çözücülerin Tayini
- h) Ek - 10 - Natürel Zeytinyağlarına Ait Duyusal Özelliklerin Tespiti
- ı) Ek - 11 - Pirinada Yağ Miktarı Tayini
- i) Ek - 12 - Stigmastadienlerin Tayini
- j) Ek - 13 - Gerçek ve Teorik ECN 42 Trigliserid İçeriği Arasındaki Maksimum Farkın Tayini
- k) Ek - 14 - Kapiler Kolonlu Gaz Kromatografisi ile Alifatik Alkol Miktarının Tayini

Avrupa Birliğine uyum

MADDE 8 – (1) Bu Tebliğ, 2568/91/EEC sayılı Zeytinyağı ve Pirina Yağının Karakteristiklerini ve İlgili Analiz Metotlarını Belirleyen Komisyon Tüzüğü dikkate alınarak Avrupa Birliği'ne uyum çerçevesinde hazırlanmıştır.

Denetim

MADDE 9 – (1) Bu Tebliğe ait hükümlerin uygulanması; 27/5/2004 tarihli ve 5179 sayılı Gıdaların Üretimi, Tüketimi ve Denetlenmesine Dair Kanun Hükmünde Kararnamenin Değiştirilerek Kabulü Hakkında Kanuna göre, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı tarafından denetlenir.

Uyum zorunluluğu

GEÇİCİ MADDE 1 – (1) Bu Tebliğ kapsamında yer alan ürünlerden resmi kontroller için numune alan ve analizi yapan kurum ve kuruluşlar bu Tebliğin yayımı tarihinden itibaren 6 ay içinde bu Tebliğ hükümlerine uymak zorundadır.

Yürürlük

MADDE 10 – (1) Bu Tebliğ yayımı tarihinde yürürlüğe girer.

Yürütme

MADDE 11 – (1) Bu Tebliğ hükümlerini Tarım ve Köyişleri Bakanı yürütür.

Numune Alma Metotları

(1) - Genel hükümler

a) Numune, gıda denetçisi tarafından alınmalıdır.

b) İncelenecek olan her partiden ayrı ayrı numune alınmalıdır.

c) Numune hazırlama ve numune alma aşamalarında aşağıdaki kriterlere uyulmalıdır.

1) Numune alınacak partinin gıda güvenliğini ya da bütünlüğünü etkileyecek herhangi bir değişiklikten sakınılmalıdır.

2) Numunenin hazırlanması ve saklanması sırasında analiz sonuçlarını olumsuz etkileyebilecek dış etkenlerden (ısı ve ışığa maruz kalmamalı, numune kabı tam olarak doldurulmalı ve hava almayacak şekilde kapatılmalıdır vb.) korumak için gereken tedbirler alınmalıdır.

3) Numuneyi alan kişinin güvenliğini sağlamak için tüm tedbirler alınmalıdır.

4) Paçal numunenin partiyi temsil ettiğinden emin olunmalıdır.

d) Numune, taşıma ve depolama esnasında serin ve kuru yerde ışık görmeyecek şekilde (koyu renk torba veya kutuda) muhafaza edilmelidir. Numunelerin taşınması ve depolanması sırasında numunenin içeriğini değişimden koruyacak önlemler alınmalıdır. Numune alındıktan sonra en kısa süre içinde laboratuvara gönderilmeli ve bu süre Ekim'den Mayıs'a kadar olan dönemde alındıkları günden sonraki onuncu iş gününü ve Haziran'dan Eylül'e kadar olan dönemde alındıkları günden sonraki beşinci iş gününü geçmemelidir.

e) Alınan her numune, alındığı yerde mühürlenmeli ve tanımlanmalıdır. Her numune için, temsil ettiği partiyi açıkça tanımlayacak şekilde kayıt tutulmalıdır. Bu kayıta numune alma tarihi, saati ve yeri; numunenin türü ve analizi yapacak kişiye yardımcı olacak diğer bilgiler yer almalıdır.

f) Numune alma cihazları, yardımcı cihazlar ve numune alma kapları, numune alınan yağ ile kimyasal olarak etkileşmeyen ve kimyasal tepkimeleri hızlandırmayan uygun malzemelerden yapılmış olmalıdır.

(2) - Numune alma metodu

a) Bu numune alma yöntemi 125000 litreden daha fazla olmayan sevkiyatlarda en fazla 100 litrelik kap veya ambalajlardaki zeytinyağı ve pirina yağı partilerinden numune alınmasında uygulanır.

b) Sevkiyatın 125000 litreyi geçtiği durumlarda partinin 125000 litrelik veya bu miktarın altındaki kısımlara bölünmesi gerekmektedir. Sevkiyat 125000 litreden daha az ise bir parti teşkil etmelidir. Metot her partiye ayrı ayrı uygulanmalıdır.

c) Alınacak en az birincil numune sayısı partinin büyüklüğü dikkate alınarak aşağıda yer alan "Tablo 1"e göre saptanmalıdır.

Tablo 1 - Parti büyüklüğüne bağlı olarak alınması gereken en az birincil numune sayısı:

Parti büyüklüğü (L)	Birincil numune sayısı:
< 7 500	2
< 25 000	3
< 75 000	4
< 125 000	5

ç) Birincil numune için seçilecek ambalajlar, aynı parti içinde birbirine bitişik ambalajlardan oluşmalıdır. Şüpheli durumunda birincil numune sayısı artırılabilir.

d) Alınacak birincil numunenin içereceği ambalaj sayısı "Tablo 2"ye göre saptanmalıdır.

Tablo 2 - Ambalaj büyüklüğüne bağlı olarak birincil numunenin içereceği ambalaj sayısı:

Ambalaj hacmi	Birincil numunenin içereceği ambalaj sayısı
---------------	---

5 litre veya daha fazla	3 ambalaj
3 litre veya daha fazla, ancak 5 litreden daha az	3 ambalaj
2 litre veya daha fazla, ancak 3 litreden daha az	3 ambalaj
1 litre veya daha fazla, ancak 2 litreden daha az	6 ambalaj
0,75 litre veya daha fazla, ancak 1 litreden daha az	6 ambalaj
0,75 litreden daha az	Toplam kapasitesi 1,5 litreden fazla olan asgari sayıdaki ambalajdan elde edilen yağın üç katı

e) Birincil numuneler analiz anına kadar numune kabında ya da orijinal ambalajlarında tutulmalıdır. Birincil numune aşağıda belirtilen amaçlar için üç kısma bölünmelidir.

- i) Ek 2, Ek 3, Ek 8 ve Ek 9'da yer alan analizler için
- ii) Ek 11'de yer alan analiz için
- iii) Diğer analizler için

(3) Analizler ve sonuçlar

a) Tablo 1'de verilen her bir birincil numune, laboratuvar numunelerine bölünür ve aşağıdaki analizler yapılır:

- serbest yağ asitliğinin belirlenmesi
- peroksit değerinin belirlenmesi
- spektrofotometrik analiz
- yağ asidi kompozisyonunun belirlenmesi

b) Aynı partiden alınan en az bir adet birincil numunede bu maddenin (a) bendinde belirtilen analiz sonuçlarının bir tanesi beyan edilen yağ kategorisi niteliklerine uygun değil ise, ilgili partinin tamamının beyan edilen kategoriye uygun olmadığına karar verilir.

Aynı partiden alınan her bir birincil numune için, bu maddenin (a) bendinde değinilen analizlerin sonuçlarının tamamen homojen olmadığı durumda, ilgili yöntemlerin tekrar edilebilir nitelikleri dikkate alınarak, partinin tamamının homojen olmadığı beyan edilmeli ve her birincil numunede gerekli olan diğer analiz yapılmalıdır. Aksi takdirde, aynı partiden başka bir birincil numune alınıp analize tabi tutulmalıdır.

c) Bu maddenin (b) bendinin ikinci paragrafında değinilen analiz sonuçlarının bir tanesinin beyan edilen yağ kategorisinin nitelikleriyle uyumlu olmadığı durumda, partinin tamamının uygun olmadığına beyan edilmesi gerekmektedir.

Bu maddenin (b) bendinin ikinci paragrafında değinilen analiz sonuçlarının tamamının beyan edilen yağ kategorisinin nitelikleriyle uyumlu olduğu durumda, partinin tamamının uygun olduğu beyan edilmelidir.

EK - 1B

Karar Ağacı

a) Türk Gıda Kodeksi-Zeytinyağı ve Pirina Yağı Tebliği'nin Ek-1'inde belirtilen kriterlere uyum gösterildiğinin teyit edilmesi amacıyla tüm zeytinyağı ve pirina yağlarına uygulanır.

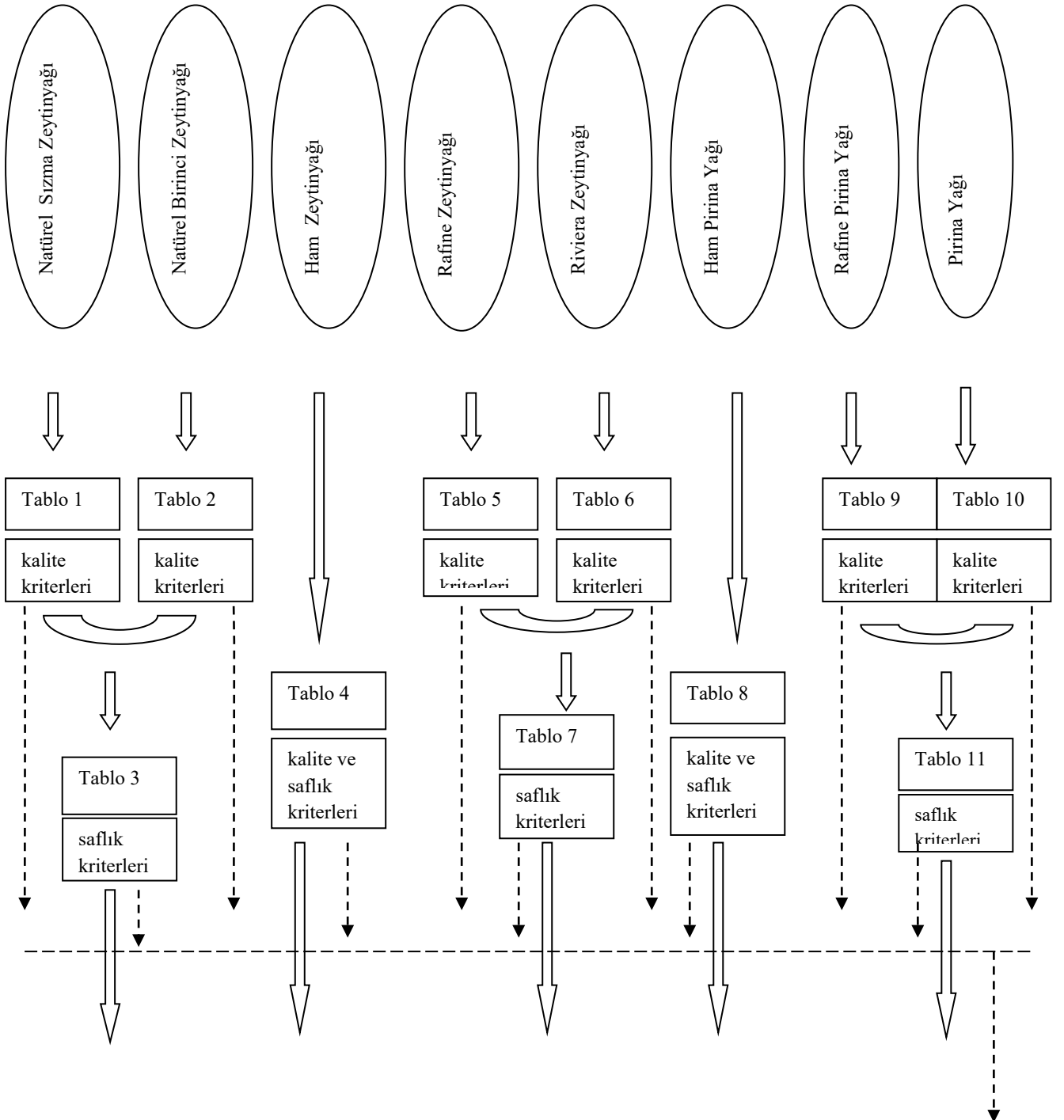
b) Karar ağacında belirtilen analizler, karar ağacında yer alan kararlardan birine varılana kadar uygulanmak suretiyle gösterilen sırayla gerçekleştirilmelidir.

c) Türk Gıda Kodeksi-Zeytinyağı ve Pirina Yağı Tebliği'nde değişiklik olması durumunda karar ağacında söz konusu Tebliğdeki değerler kullanılmalıdır.

ç) Karar ağaçları aşağıdaki tablolarda yer almaktadır.

Genel Tablo

Zeytinyağına ve pirina yağına dair beyanat

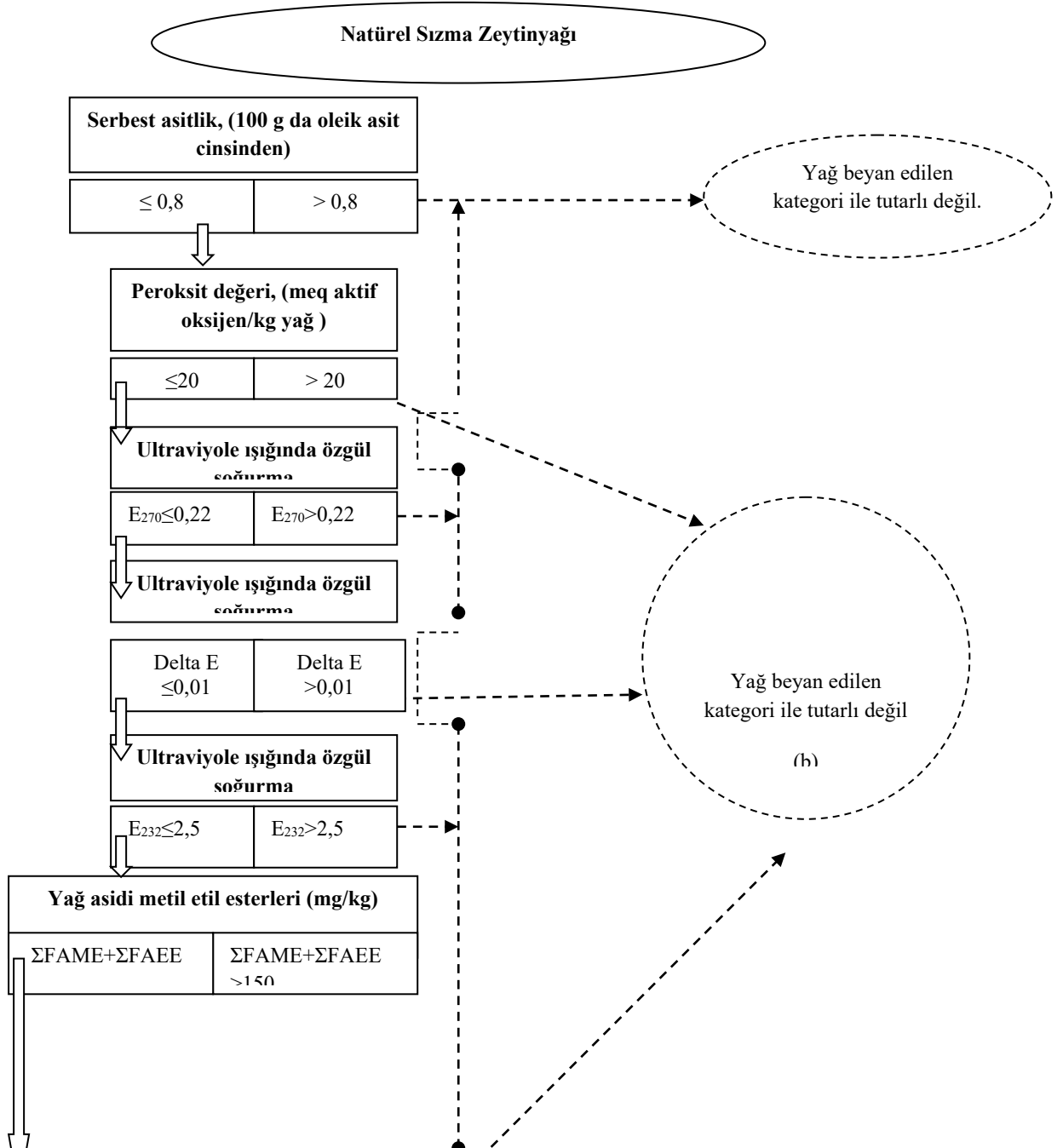


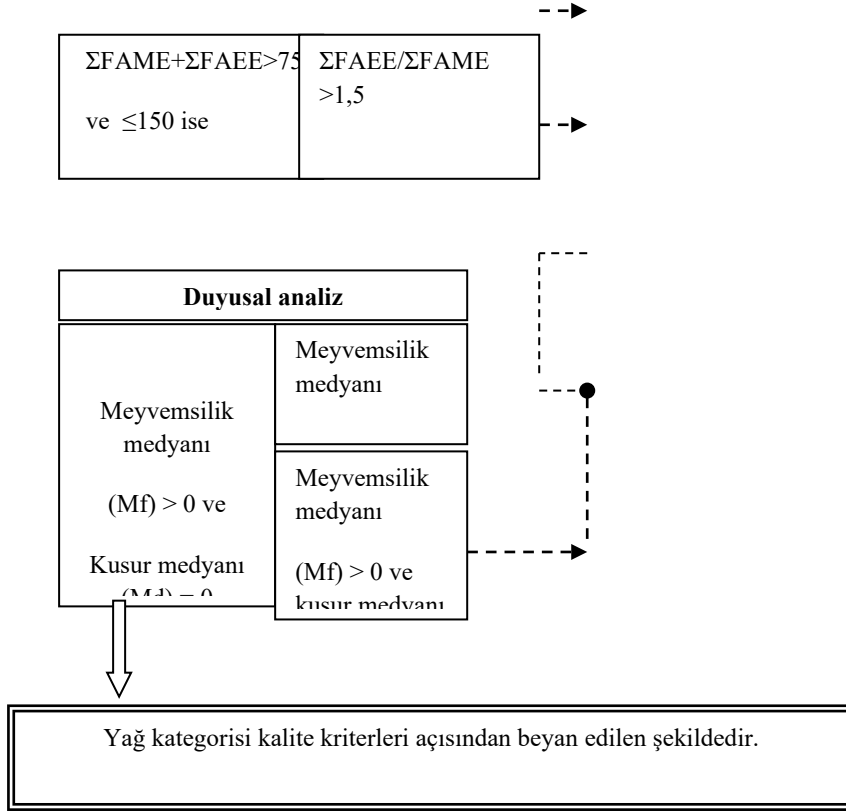


↓ : bir önceki kutuda belirtilen kriterlere uyum durumunda (olumlu yanıt) izlenecek olan yolu göstermektedir.

--- : Kesik çizgi (----) uygunsuzluk durumunda izlenecek olan alternatif yolu göstermektedir,

Tablo 1

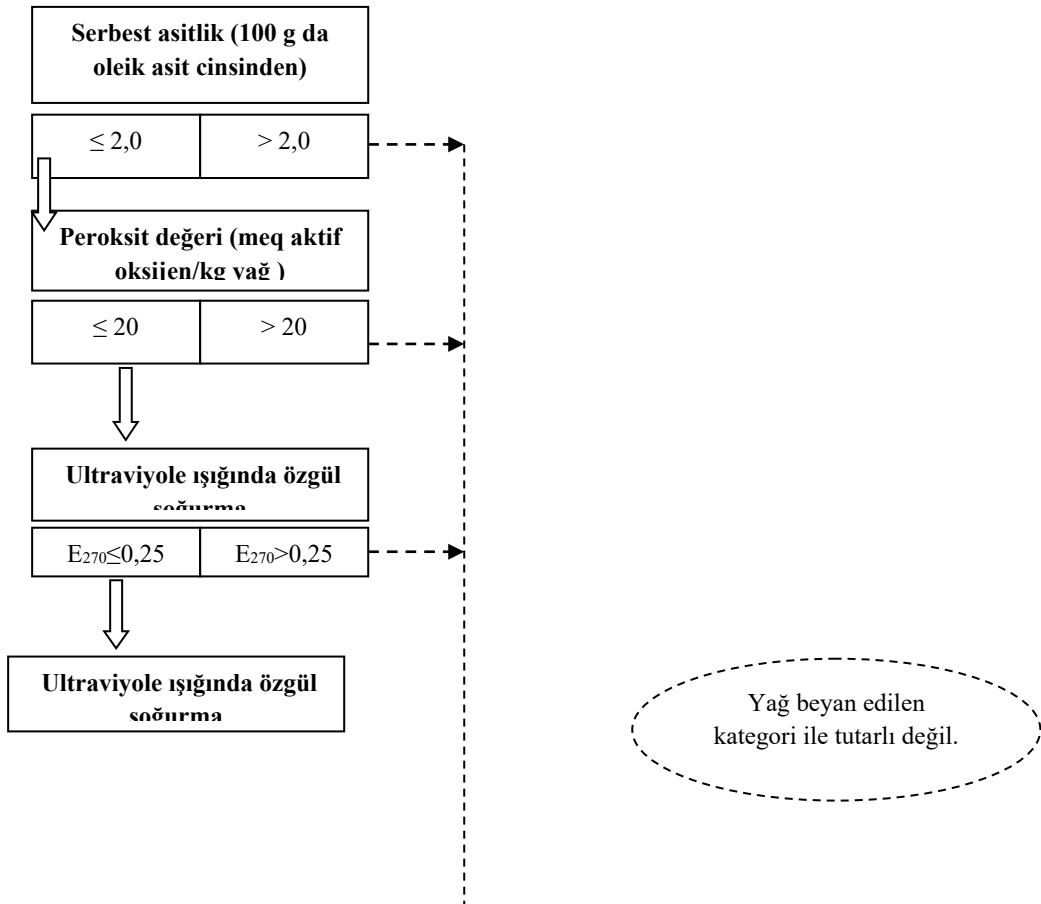


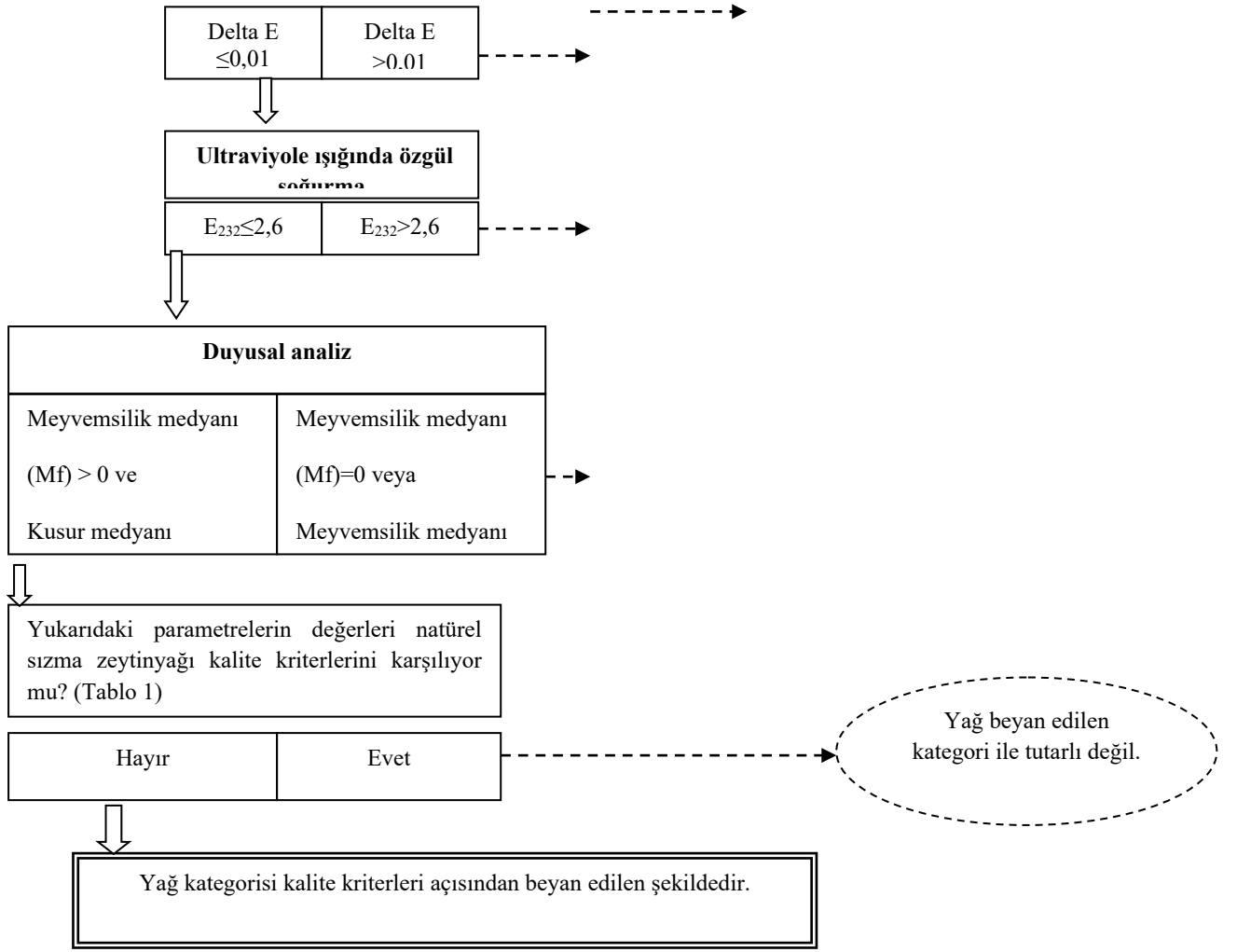


- (a) Natürel birinci veya ham zeytinyağına bakınız (Kalite kriteri-Tablo 2 veya Sağlık kriteri-Tablo 3)
- (b) Ham zeytinyağına bakınız (Kalite ve sağlık kriterleri-Tablo 4)

Tablo 2

Natürel Birinci Zeytinyağı

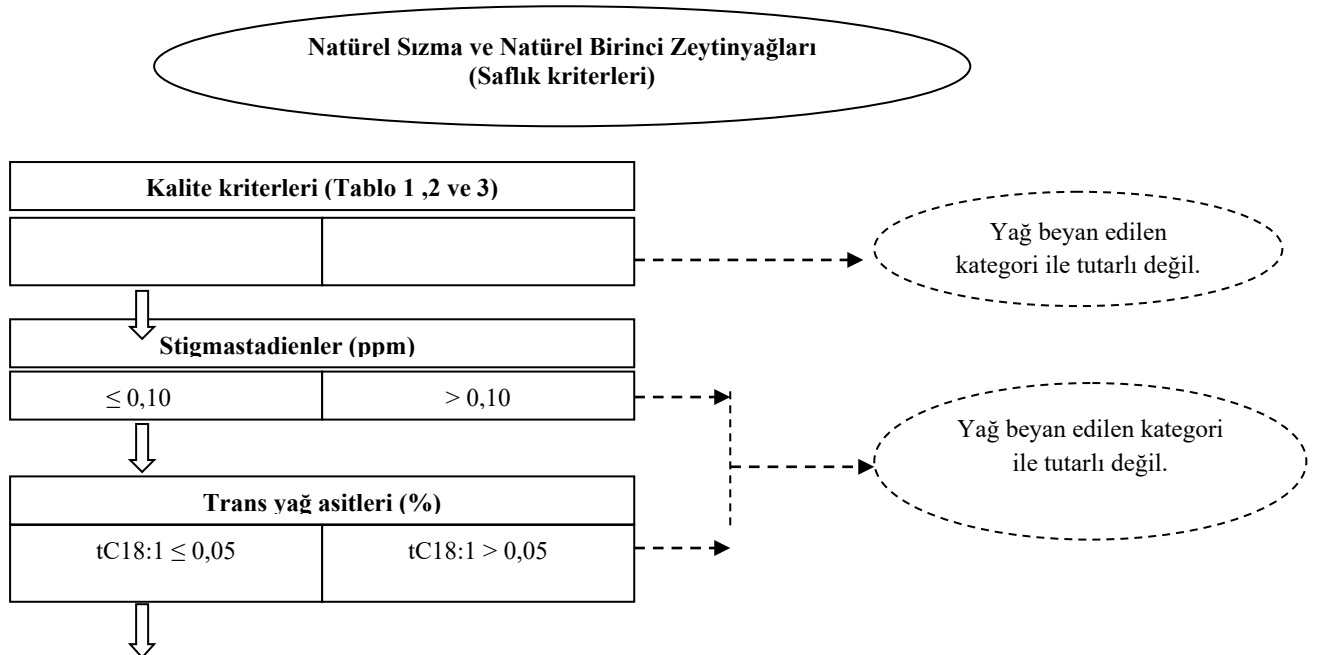


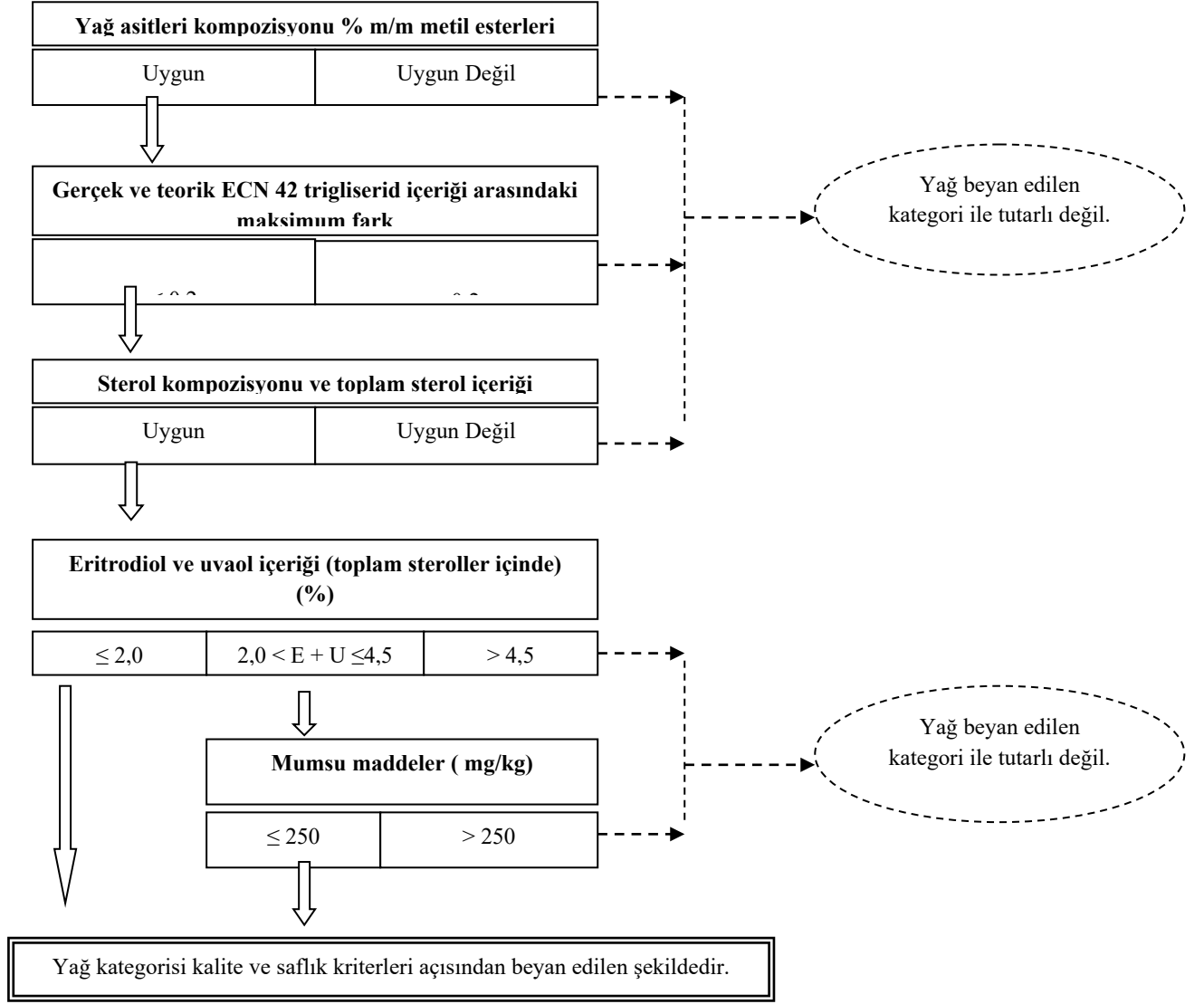


(a) Ham zeytinyağına bakınız (Kalite ve saflık kriteri Tablo 4)

(b) Natürel sızma zeytinyağına bakınız (Kalite kriteri Tablo 1)

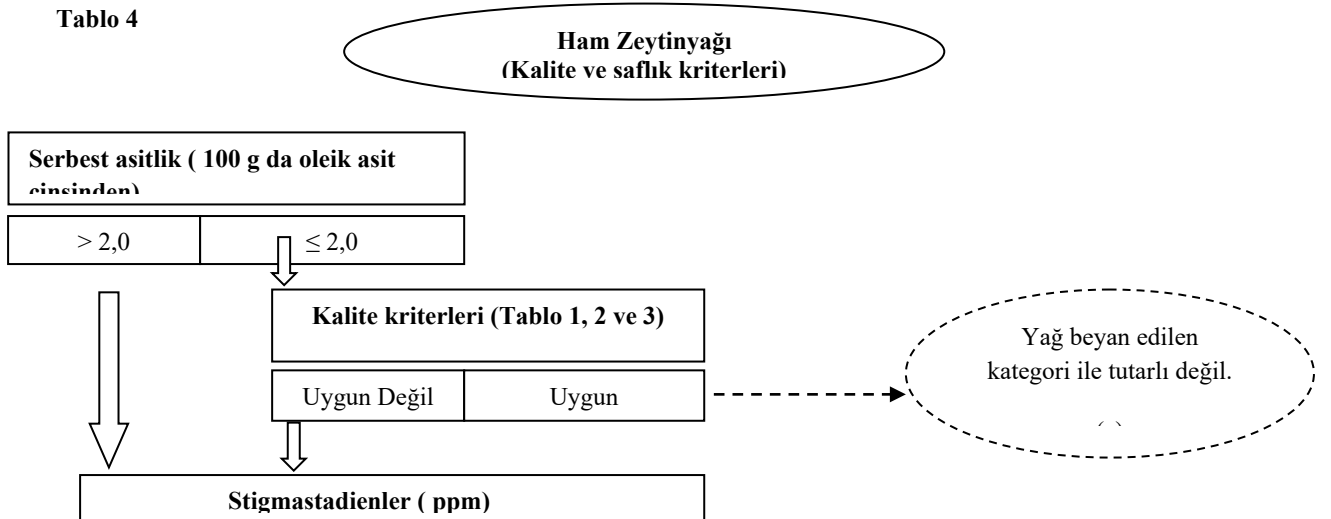
Tablo 3

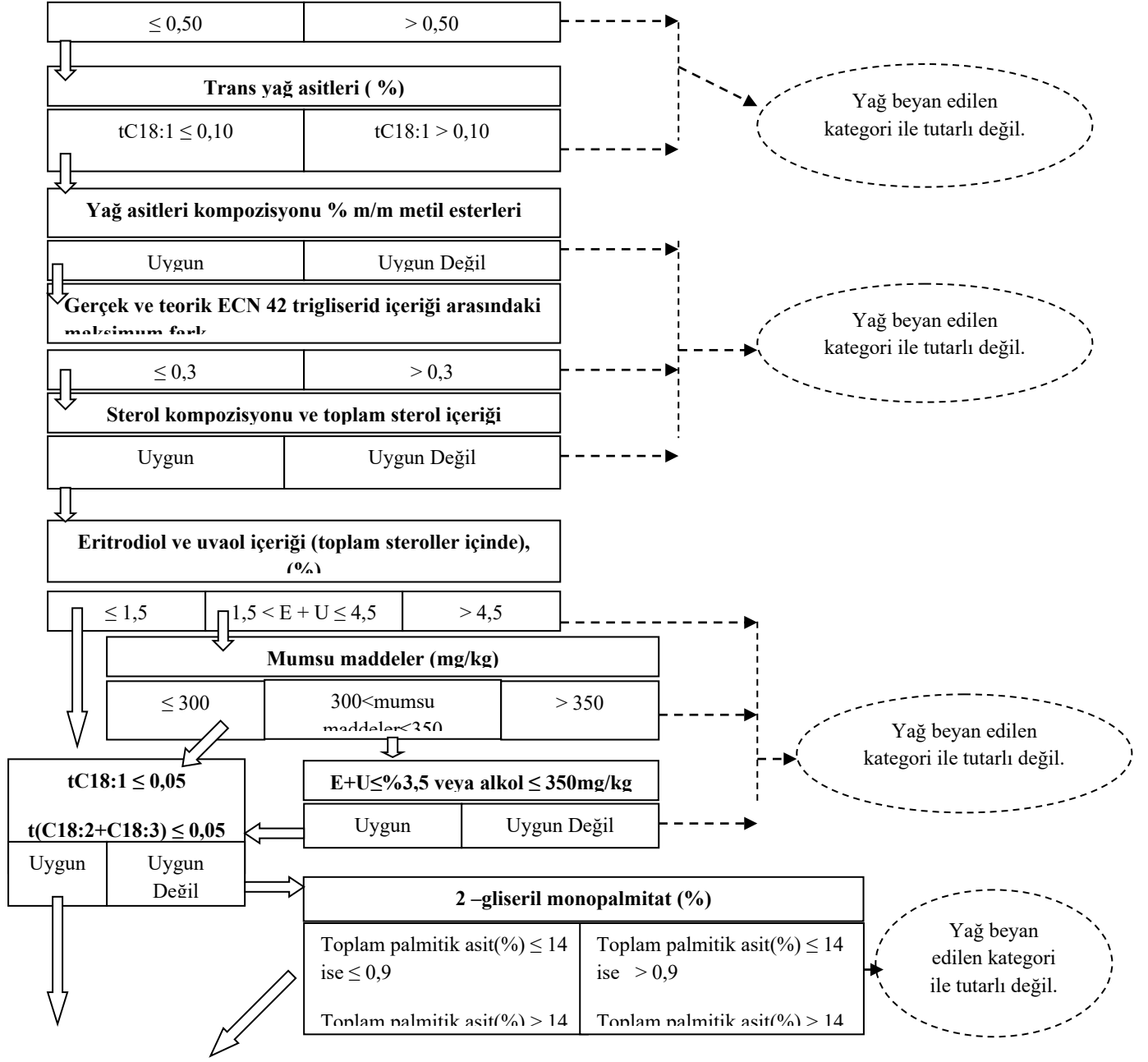




- (a) Rafine yağın mevcudiyeti (zeytin veya diğerleri)
(b) Pirina yağının mevcudiyeti

Tablo 4





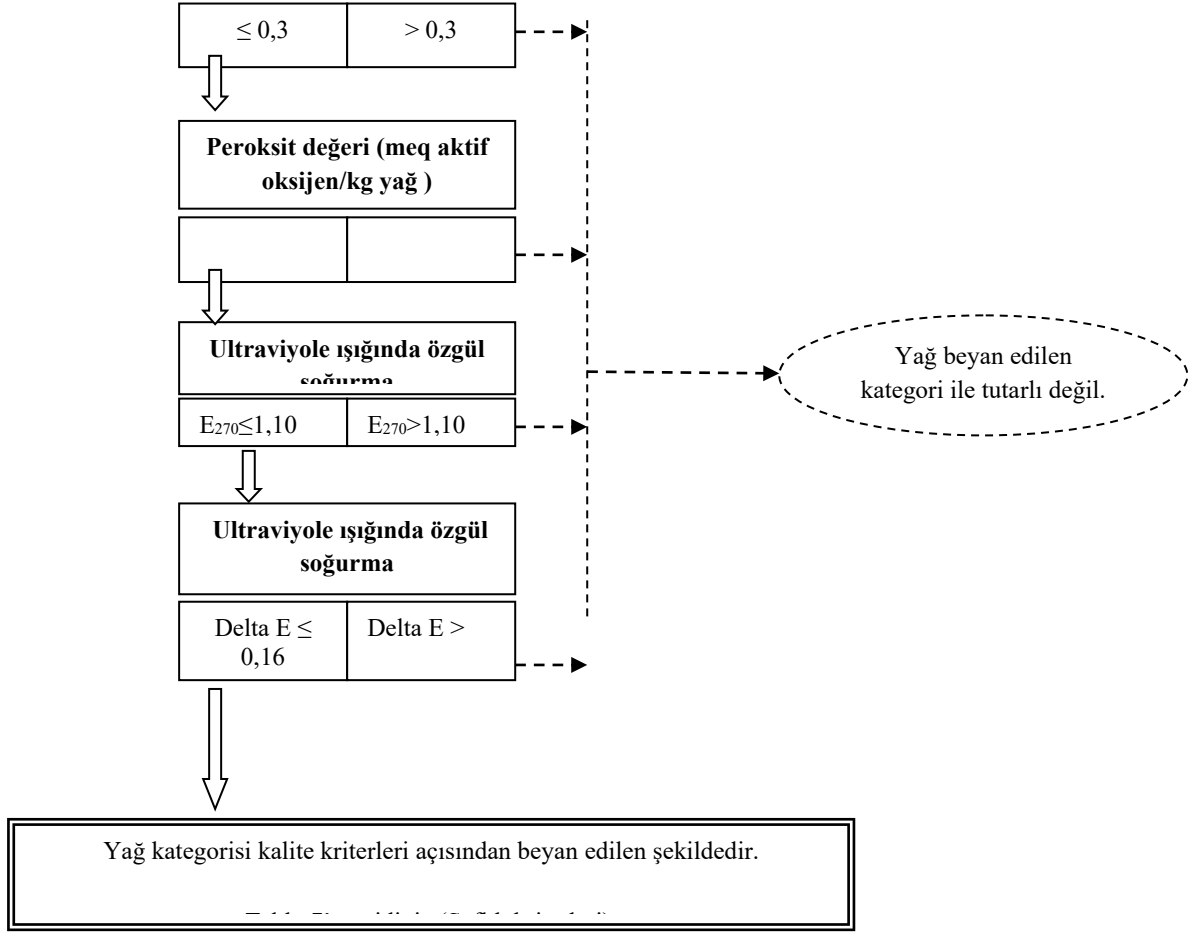
Yağ kategorisi kalite kriterleri açısından beyan edilen şekildedir.

- (a) Natürel sızma zeytinyağı, natürel birinci ve natürel ikinci zeytinyağına bakınız (Kalite kriteri Tablo 1 ve 2)
- (b) Rafine yağın mevcudiyeti (zeytin veya diğerleri)
- (c) Pirina yağının mevcudiyeti
- (d) Esterifiye yağların mevcudiyeti

Tablo 5

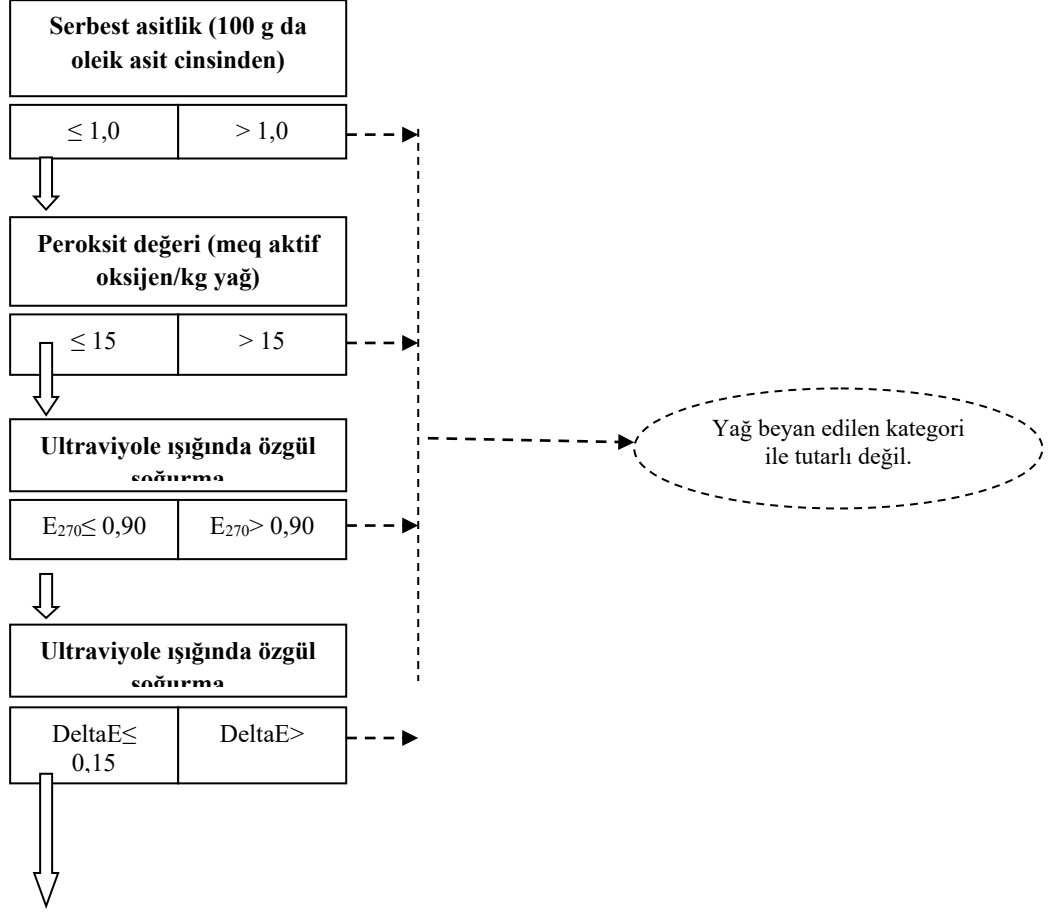
**Rafine Zeytinyağı
(Kalite kriterleri)**

**Serbest asitlik (100 g da
oleik asit cinsinden)**



Tablo 6

**Riviera Zeytinyağı
(Kalite kriterleri)**

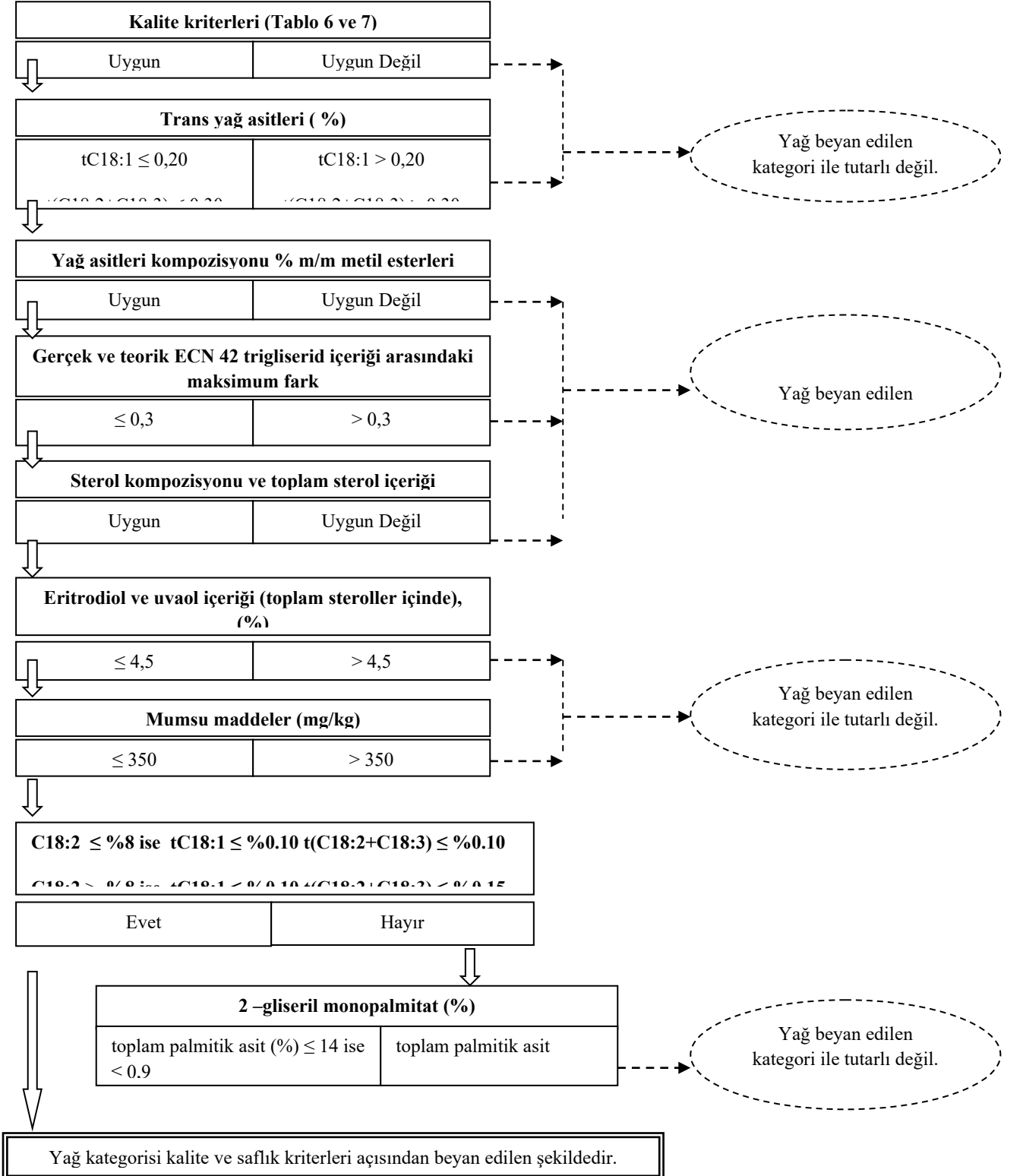


Yağ kategorisi kalite kriterleri açısından beyan edilen şekildedir.

Tablo 7' ve ödiniz (Saflık kriterleri).

Tablo 7

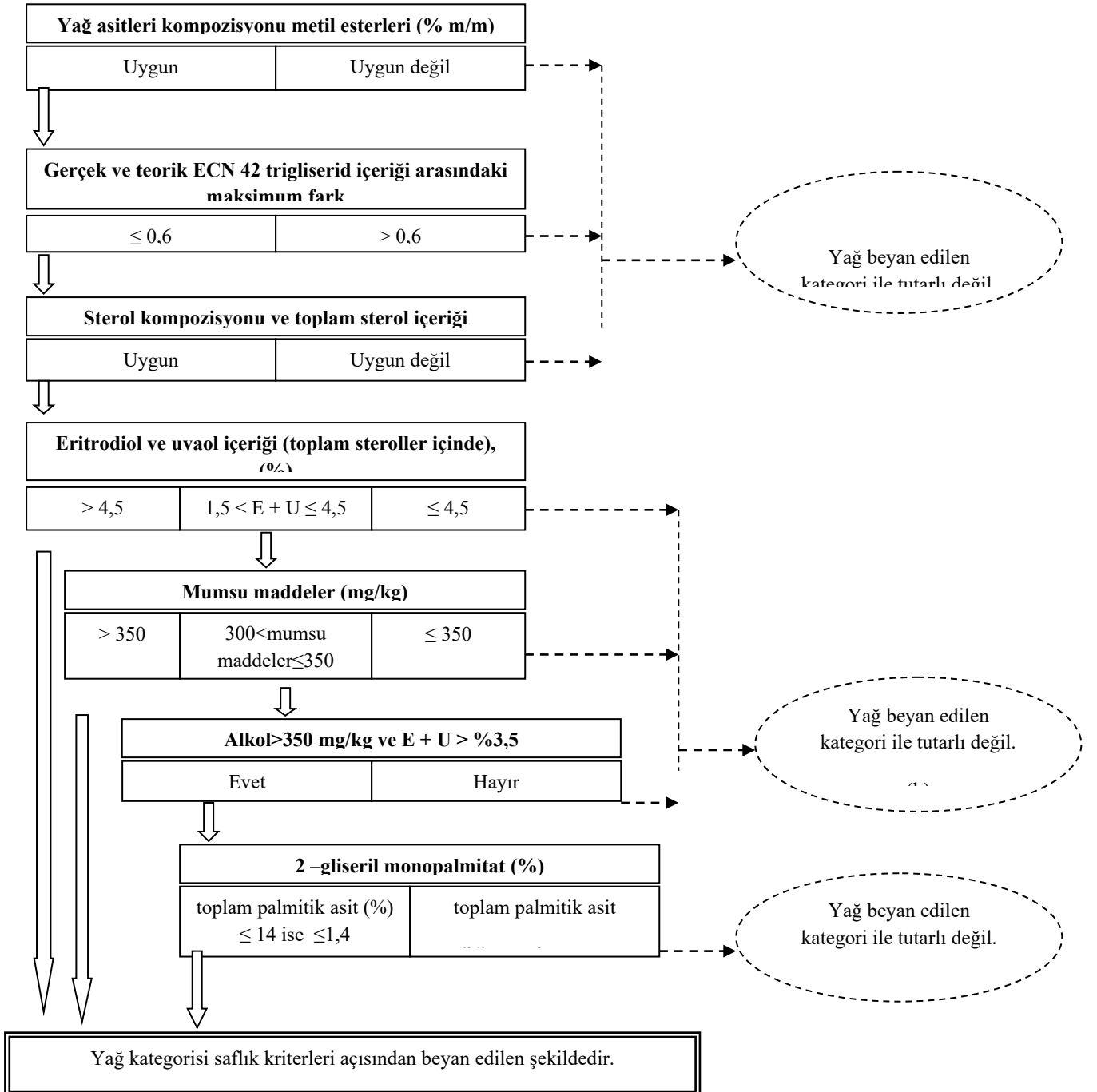
Rafine ve Riviera Zeytinyağı
(Saflık kriterleri)



- (a) Pirina yağının mevcudiyeti
(b) Esterifiye yağların mevcudiyeti

Tablo 8

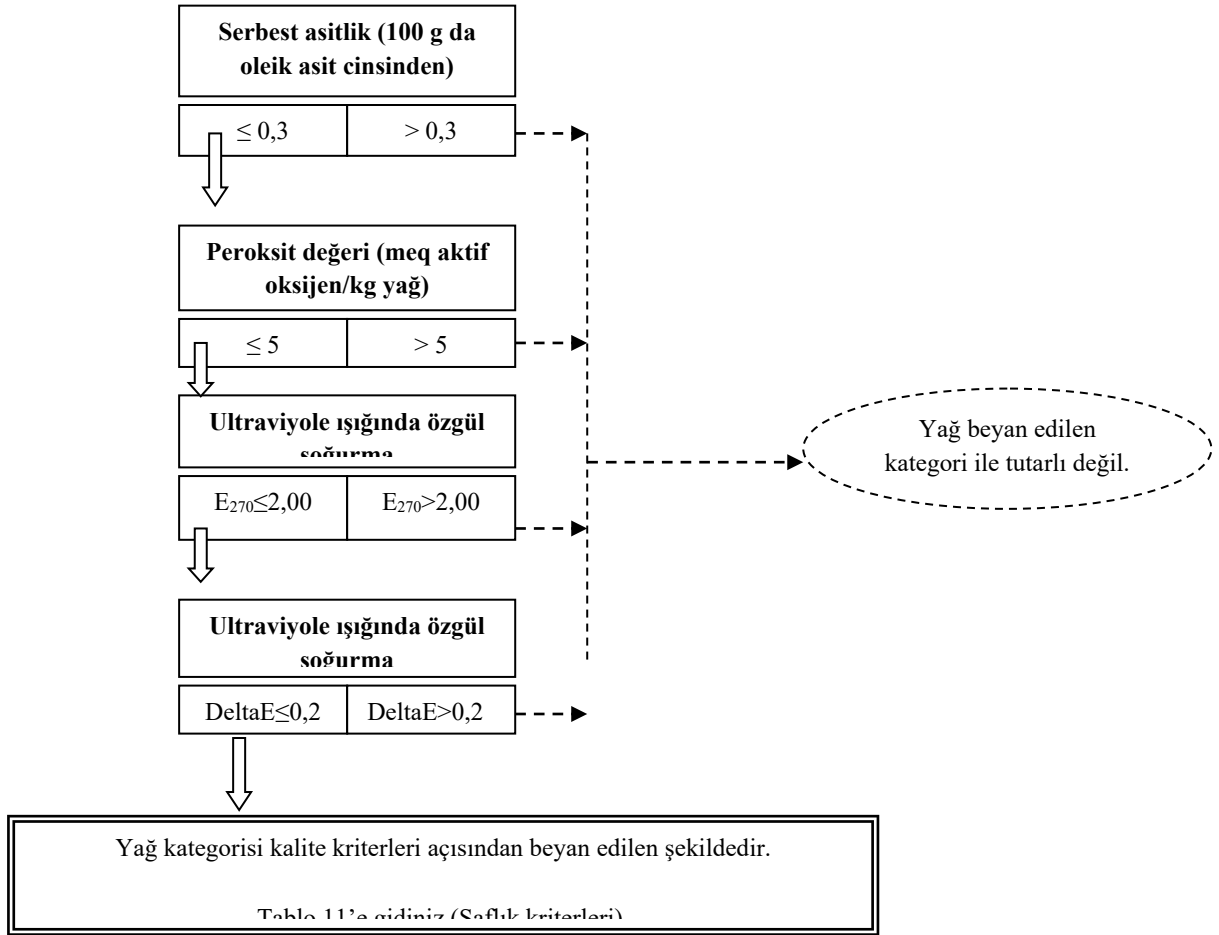
Ham Pirina Yağı
(Saflik kriterleri)



- (a) Rafine yağ mevcudiyeti (zeytinyağı veya diğerleri)
(b) Ham zeytinyağı kriterlerine bakınız (Kalite ve saflık kriterleri Tablo 4)
(c) Esterifiye yağ mevcudiyeti

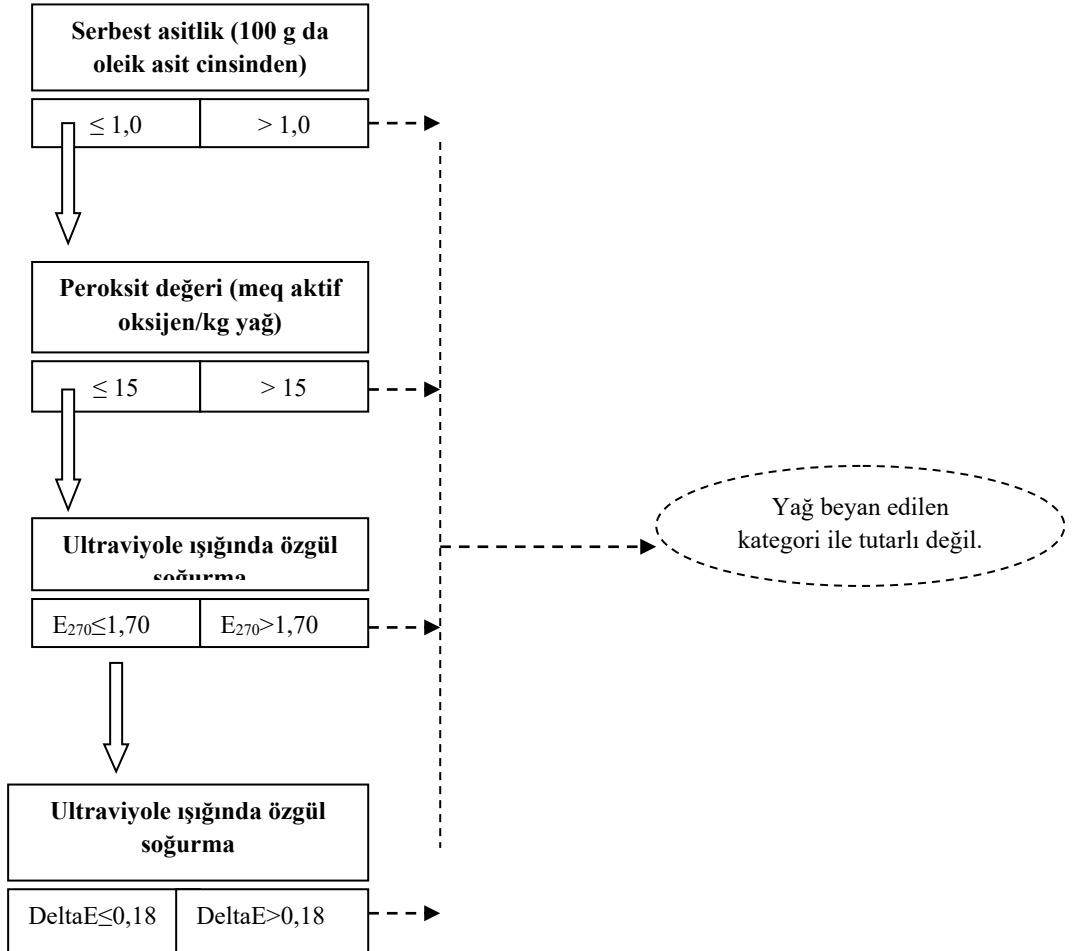
Tablo 9

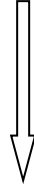
**Rafine Pirina Yağı
(Kalite kriterleri)**



Tablo 10

Pirina yağı
(Kalite kriterleri)



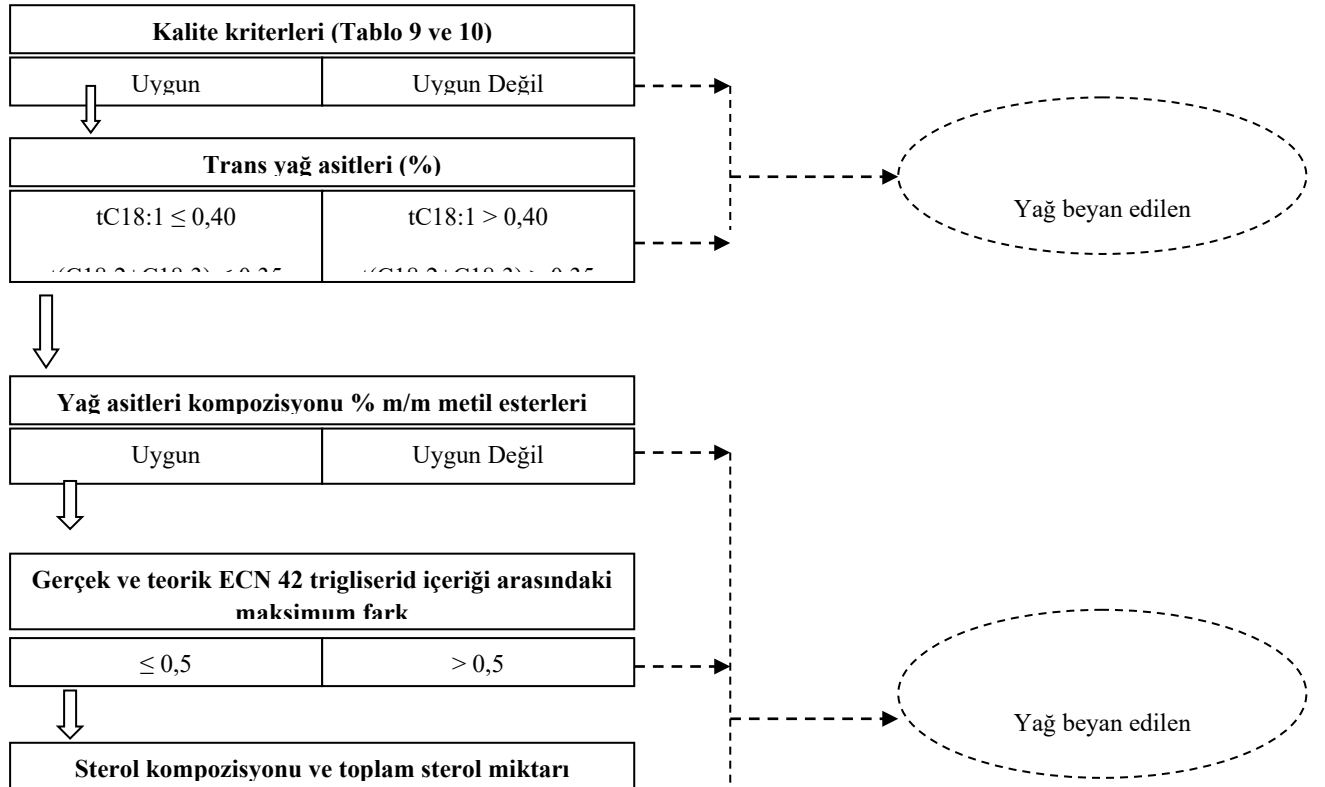


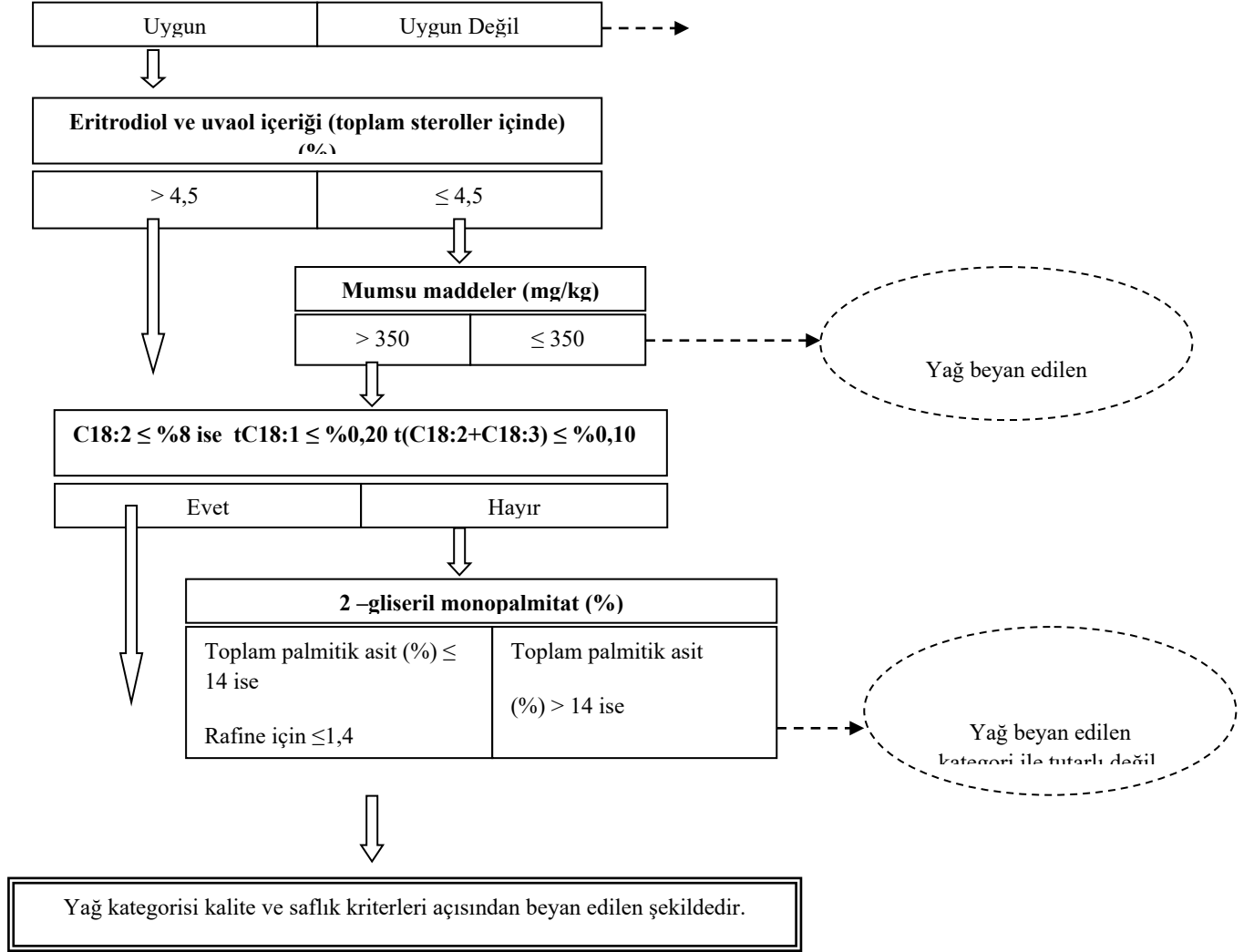
Yağ kategorisi kalite kriterleri açısından beyan edilen şekildedir.

Tablo 11'e gidiniz (Safılık kriterleri)

Tablo11

**Rafine Pirina Yağı ve Pirina Yağı
(Safılık kriterleri)**





(a) Esterifiye yağ mevcudiyeti

Tablo 12

Karar Ağacında Yer Alan Analizler İle Eklerde Yer Alan Analizler Arasındaki Eşleştirme Tablosu

Asitlik	Ek – 2	Serbest Yağ Asitliği Tayini
Peroksit değeri	Ek – 3	Peroksit Değeri Tayini
UV spektrofotometrisi	Ek – 7	Ultraviyole Işığında Özgül Soğurma Tayini
Duyusal değerlendirme	Ek – 10	Natürel Zeytinyağlarına Ait Duyusal Özelliklerin Tespiti
Stigmastadienler	Ek – 12	Stigmastadienlerin Tayini
Yağ asitlerinin trans izomerleri	Ek – 8A	Yağ Asitlerinin Metil Esterlerinin Gaz Kromatografisi ile Tayini
Yağ asidi kompozisyonu	Ek – 8A Ek – 8B	Yağ Asitlerinin Metil Esterlerinin Gaz Kromatografisi ile Tayini Yağ Asitlerinin Metil Esterlerinin Hazırlanması
ΔECN42	Ek – 13	Gerçek ve Teorik ECN 42 Trigliserid İçeriği Arasındaki Maksimum Farkın Tayini
Sterol kompozisyonu ve toplam steroller ile Eritrodiol ve Uvaol	Ek – 5	Kapiler Kolonlu Gaz Kromatografisi İle Sterol Kompozisyonunun ve Miktarının Tayini ve Toplam Steroller İçinde Eritrodiol ve Uvaol Yüzdesinin Belirlenmesi
2-gliserol monopalmitat	Ek – 6	2-Glisiril Monopalmitat Yüzde Miktarının Tayini

Alifatik alkoller	Ek – 14	Kapiler Kolonlu Gaz Kromatografisi ile Alifatik Alkol Miktarının Tayini
-------------------	---------	---

EK - 2

Serbest Yağ Asitliği Tayini

1. Kapsam

Bu metot zeytinyağındaki serbest yağ asitleri miktarının belirlenmesi prosedürünü tanımlar. Serbest yağ asitlerinin miktarı, genel olarak hesaplanan serbest asitlik (% , oleik asit cinsinden) şeklinde ifade edilir.

1.1. Prensipte

Numune çözücü karışımları içinde çözünür ve mevcut serbest yağ asitleri etanollü potasyum hidroksit çözeltisi ile titre edilir.

1.2. Reaktifler

Tüm kimyasallar analitik saflıkta olmalı ve saf su kullanılmalıdır.

1.2.1. Dietil eter

% 95 lik etanol

Her 100 mL'lik etanol-dietil eter çözeltisi (1:1 oranında, v/v), kullanımdan hemen önce 0,3 mL fenolftalein indikatörlüğünde etanollü potasyum hidroksit çözeltisi ile nötralize edilir.

Not 1: Dietil eter yüksek derecede yanıcıdır ve patlayıcı peroksitler oluşturabilir. Dikkatli kullanılmalıdır.

Not 2: Dietil eter kullanımı mümkün değilse bunun yerine toluen, etanolün yerine ise propan-2-ol kullanılabilir.

1.2.2. 0,1 N etanollü potasyum hidroksit çözeltisi (gerekirse c(KOH) yaklaşık 0,5 N kullanılabilir.) Etanollü potasyum hidroksit çözeltisinin derişimi, mutlaka kesin olarak bilinmeli ve kullanımdan hemen önce kontrol edilmelidir. Kullanımdan en az beş gün önce hazırlanmış ve lastik tıpalı kahverengi cam bir şişeye konulmuş çözelti kullanılmalıdır. Çözelti, renksiz veya saman rengi olmalıdır.

Not 3: Potasyum hidroksitin stabil renksiz çözeltisi şu şekilde hazırlanır: 1000 mL etanol, 8 g potasyum hidroksit ve 0,5 g alüminyum talaşı ile birlikte kaynamaya bırakılır. Geri soğutucu altında bir saat kaynatmaya devam edilir ve hemen damıtılır. Gerekli miktarda potasyum hidroksit elde edilen distilat içinde çözülür. Potasyum karbonat çökeltisinin üzerindeki berrak sıvının ayrılması için çözelti birkaç gün dinlendirildikten sonra filtre edilir.

Çözelti damıtılmaksızın da aşağıdaki gibi hazırlanabilir: 1000 mL etanole 4 mL alüminyum butilat eklenir ve karışım birkaç gün bekleme bırakılır. Üstteki faz filtre edilir ve Gerekli miktarda potasyum hidroksit elde edilen distilat içinde çözülür.

1.2.3. Fenolftalein (etanol içinde %1'lik (m/v) çözeltisi) veya çok koyu renkli yağlarda alkalın mavisi (etanol içinde %2'lik (m/v) çözeltisi)

1.3. Cihaz ve malzemeler

Aşağıdakiler dâhil olmak üzere genel laboratuvar malzemeleri:

1.3.1. Analitik terazi,

1.3.2. 250 mL'lik erlen mayer,

1.3.3. 10 mL'lik büret (0,05 mL taksimatlı)

1.4. Prosedür

Analiz için numunenin hazırlanması

Nem ve safsızlıklar toplamı % 1'den az ise numunede herhangi bir işlem yapılmaz. Fazla ise numune filtre edilmelidir.

1.4.2. Numunenin alınması

Beklenen asit sayısına bağlı olarak tartılacak numune miktarı aşağıdaki tabloya göre belirlenir:

Beklenen asit sayısı*	Numunenin kütlesi (g)	Tartım hassasiyeti (g)
< 1	20	0,005
1-4	10	0,02
4-15	2,5	0,01
15-75	0,5	0,001
>75	0,1	0,0002

* Asit sayısı = (serbest yağ asitliği) x 2

Numune erlen mayer içinde tartılmalıdır.

1.4.3. Analiz

Numune titrasyondan önce nötrale edilmiş 50 – 150 mL etanol-dietil eter çözeltisi içinde çözülür.

0,1 N etanollü potasyum hidroksit çözeltisi ile renk değişene kadar karıştırılarak titre edilir. (Fenolfetaleinin hafif pembe rengi en az 10 saniye kalıcı olmalıdır.) (Not 5).

Not 4: Titrasyonda kullanılan etanollü potasyum hidroksit çözeltisinin yerine ilave edilen su miktarının faz ayırmasına sebep olmaması şartıyla potasyum veya sodyum hidroksitin sulu çözeltisi kullanılabilir.

Not 5: 0,1 N etanollü potasyum hidroksit çözeltisinin sarfiyatı 10 mL'yi geçerse, 0,5 N etanollü potasyum hidroksit çözeltisi kullanılır.

Not 6: Titrasyon sırasında bulanıklık oluşursa nötrale edilmiş etanol-dietil eter çözeltisinden bulanıklık kayboluncaya kadar ilave edilir.

1.5 Serbest yağ asitliği: % oleik asit cinsinden ifade edilir

Serbest yağ asitliği ağırlığın yüzdesi olarak aşağıdaki formülle hesaplanır:

$$V \times c \times \frac{M}{1000} \times \frac{100}{m} = \frac{V \times c \times M}{10 \times m}$$

Burada:

V = Etanollü potasyum hidroksit sarfiyatı (mL)

c = Ayarlı etanollü potasyum hidroksit çözeltisinin derişimi (N),

M = Oleik asitin moleköl ağırlığı (= 282);

m = Numune miktarı (g)

Analiz iki paralel olarak yapılır. Sonuç iki hesaplamanın aritmetik ortalamasıdır.

EK - 3

Peroksit Değeri Tayini

1. Kapsam

Bu Tebliğ zeytinyağı ve pirina yağının peroksit değerinin saptanmasında kullanılan yöntemi tanımlamaktadır.

2. Tanım

Peroksit değeri: Tanımlanan analiz şartlarında potasyum iyodürü okside eden bir kilogram yağdaki aktif oksijenin milieşdeğer ağırlığıdır.

3. Prensiş

Asetik asit-izooktan çözeltisi içinde çözünen numunenin potasyum iyodür çözeltisi ile muameleye tabi tutulması ve açığa çıkan serbest iyotun, ayarlı sodyum tiyosülfat çözeltisi ile titre edilmesidir.

4. Malzemeler

Kullanılacak tüm ekipman indirgen veya yükseltgen maddelerden arınmış olmalıdır.

Not 1: Tüm malzemeler kuru ve temiz olmalıdır.

- 4.1. 250 mL'lik şilifli cam balon
- 4.2. 25 ya da 50 mL'lik büret (0,1 mL taksimatlı)

5. Reaktifler

- 5.1. Analitik saflıkta izooktan
- 5.2. Analitik saflıkta buzlu (glasiyel) asetik asit
- 5.3. İyot ve iyodat içermeyen doymuş potasyum iyodürün sulu çözeltisi

Not 2: Çözelti koyu renkli şişede ve soğukta muhafaza edilmelidir. Çözeltinin rengi sarıya döndüğünde kullanılmamalıdır.

- 5.4. 0,1 N'lik sodyum tiyosülfatın sulu çözeltisi (kullanımdan hemen önce ayarlanmış) 24,9 g sodyum tiyosülfat pentahidrat saf suda çözülüp litreye tamamlanır. Bu çözeltiden 1/10 oranında seyreltilerek 0,01 N hazırlanabilir.
- 5.5. 5 g/L'lik çözünür doğal nişasta çözeltisi

Not 3: Çözeltiyi hazırlamak için nişasta bir miktar su ile karıştırılıp kaynatılır. Soğutulduktan sonra gerekli hacme tamamlanır.

6. Prosedür

Numune, beklenen peroksit değerine göre aşağıdaki Tablo kullanılarak şilifli balon içerisine 0,001g hassasiyetle tartılır.

Beklenen peroksit değeri (meq aktif oksijen/kg yağ)	Numune ağırlığı (g)
0 – 12	5,0 – 2,0
12 – 20	2,0 – 1,2
20 – 30	1,2 – 0,8
30 – 50	0,8 – 0,5
50 – 90	0,5 – 0,3

Asetik asit:izooktan (60:40) çözeltisi hazırlanır. Hazırlanan bu çözeltiden 50 mL örnek üzerine ilave edilir, kapak kapatılır. Örnek çözünene kadar çalkalanır. Üzerine tam 0,5 mL doymuş potasyum iyodür ilave edilir. 1 dakika çalkalanır ve hemen 30 mL saf su ilave edilir. Sarı renk nerdeyse kaybolana kadar sodyum tiyosülfat ile titre edilir. Yaklaşık 0,5 mL nişasta çözeltisi eklenir. Mavi renk kaybolana kadar damla damla sodyum tiyosülfatla titre edilir.

(Beklenen peroksit değeri 12'nin altında ise titrasyonda 0,002 N ve 12'nin üstünde ise 0,01 N sodyum tiyosülfat çözeltisi kullanılmalıdır).

Eş zamanlı olarak bir kör deneme yapılır. Eğer kör denemede 0,01 N sodyum tiyosülfat çözeltisinin sarfiyatı 0,1 mL'sini aşarsa kimyasallar değiştirilir.

7. Sonuçların ifade edilmesi

Peroksit değeri (PV) kilogram başına aktif oksijenin milieşdeğer ağırlık cinsinden aşağıdaki formül ile hesaplanır;

$$PV = \frac{1000 \times (V - V_0) \times c}{m}$$

Burada;

$V =$ Analiz için harcanan ayarlı sodyum tiyosülfat çözeltisinin mililitre cinsinden hacmi, mililitre

$V_0 =$ Kör deneme için harcanan ayarlı sodyum tiyosülfat çözeltisinin hacmi, mililitre

$c =$ Harcanan sodyum tiyosülfat çözeltisinin kesin molaritesi;

$m =$ Numunenin g cinsinden ağırlığı

Analiz iki paralel olarak yapılır. Sonuç iki hesaplamanın aritmetik ortalamasıdır.

EK - 4

Kapiler Kolonlu Gaz Kromatografisi ile Mumsu Maddelerin, Yağ Asitleri Metil Esterleri ve Yağ Asitleri Etil Esterlerinin Tayini

1. Kapsam

Bu metot, zeytinyağlarında mumsu maddelerin, yağ asitleri metil esterleri ve etil esterlerinin tayini için prosedürü tarif eder. Mumsu maddeler ve alkil esterler karbon atomların numaralarına göre ayrılır. Bu metot, pirina yağı ile zeytinyağını birbirinden ayırmak ve natürel sızma zeytinyağına hile amacı ile karıştırılan deodorize yağ (kolon yağı), rafine zeytinyağı ve natürel birinci zeytinyağı gibi yağların tespiti için kullanılır.

2. Prensipte

Numuneye belirli bir iç standart ilave edilir, sonra aktif-sulandırılmış silikajelli kolondan geçirilerek fraksiyonlarına ayrılır. Test koşulları altında trigliseritlerden daha az polaritede olan uygun fraksiyon toplanır, sonra doğrudan, kapiler kolonlu gaz kromatografisi cihazıyla analiz edilir.

3. Cihaz ve malzemeler

- 3.1. 25 mL'lik erlenmayer
- 3.2. İç çapı 15 mm ve uzunluğu 30-40 cm olan uygun musluklu cam kolon
- 3.3. Kapiler kolonla çalışmaya uygun gaz kromatografi cihazı, (kolona doğrudan (on column) enjeksiyon sistemi ile donanımlı ve aşağıdaki şartlara haiz olmalıdır.)
 - 3.3.1. Kolonlar için termostat kontrollü, ± 1 ° C hassasiyetle çalışabilen fırın
 - 3.3.2. Kolonun içine doğrudan giriş için soğuk enjektör (on column)
 - 3.3.3. Alev-iyonizasyon detektörü
 - 3.3.4. PC ile bağlantılı gaz kromatografi verilerini saklayabilecek bilgisayar sistemi ve yazıcı
 - 3.3.5. Uzunluğu 8 -12 m, iç çapı 0,25-0,32 mm, film kalınlığı 0,10-0,30 μ m olan cam ya da eritilmiş silisten (Fused silica) kapiler kolon. (SE-52, SE-54 veya eşdeğeri kolon)
- 3.4. Kolona doğrudan (on-column) enjeksiyon için 10 μ L' lik mikroenjektör
- 3.5. Elektrovibratör
- 3.6. Vakumlu döner buharlaştırıcı (rotary evaporator)
- 3.7. Kül fırını
- 3.8. $\pm 0,1$ mg hassasiyette analitik terazi
- 3.9. Genel laboratuvar cam malzemeleri

4. Reaktifler

- 4.1. Tane büyüklüğü 60-200 μ m arasında silikajel

Silikajel kül fırınında 500 °C'de en az dört saat bekletilir. Soğuduktan sonra, silikajel miktarına bağlı olarak % 2 oranında su ilave edilir. Sulandırılmış silikajel homojenize etmek için iyice çalkalanır. Kullanmadan önce karanlık bir yerde en az 12 saat tutulur.

- 4.2. Kromatografik saflıkta n-hekzan
- 4.3. Kromatografik saflıkta etil eter
- 4.4. Kromatografik saflıkta n-heptan veya isooktan
- 4.5. n-heptan ile % 0,05 (m/v) olarak hazırlanan lauril araşidat standart (mumsu maddeler için iç standart) çözelti
n-heptan ile % 0,02 (m/v) olarak hazırlanan metil heptadekonat standart (metil ve etil esterler için iç standart) çözelti
- 4.5.1. Sudan I (1-fenil-azo-2-naftol): % 1 oranında hekzanla hazırlanmış
- 4.6. Taşıyıcı gazlar: Kromatografik saflıkta hidrojen veya helyum
- 4.7. Yardımcı gazlar: Kromatografik saflıkta hidrojen
Kromatografik saflıkta kuru hava
- 4.8. Kromatografik saflıkta azot gazı

5. Prosedür

5.1. Kromatografi kolonunun hazırlanması:

15 g silikajel n-hekzanla bulamaç hale getirilerek kolona boşaltılır. Hafifçe vurarak iyice oturması sağlanır. Çökelmeyi tamamlamak için elektrovibratör kullanılır. Yaklaşık 0,5 cm'lik bir yüksekliğe kadar susuz sodyum sülfat ilave edilir ve son olarak fazla hekzan süzülür.

Safsızlıkları uzaklaştırmak için 30 mL n-hekzan ile yıkama yapılır. 25 mL'lik erlenmayer içine tam olarak 500 mg numune tartılır, tahmin edilen mumsu madde miktarı doğrultusunda uygun miktarda iç standart ilave edilir. Örneğin, zeytinyağı için 0,1 mg lauril araşidat ve pirina yağı için 0,25-0,50 mg arasında lauril araşidat ve zeytinyağı için 0,05 mg metil heptadekanoat eklenir. Hazırlanan numune çözeltisi, 2 mL n-hekzan ile kromatografik kolona verildikten sonra, erlendeki kalıntı tekrar 2 mL n-hekzan ile yıkanarak, çözelti kromatografik kolona verilir.

Çözücü (n-hekzan) silikajel seviyesinin 1 mm üstüne kadar boşaltılır. Daha sonra her 10 saniyede yaklaşık 15 damla akış hızı ile 220 mL n-hekzan:dietil etileter (99:1 oranında) karışımı ile toplanarak kromatografik ayırma başlanır. (Bu fraksiyon mumsu maddeleri, metil ve etil esterleri içerir.) Toplanan süzüntü numune oda sıcaklığında 22 ± 4 °C'de tutulmalıdır.

Toplanan süzüntü numunedeki çözücüler 2 mL kalana kadar vakumlu döner buharlaştırıcıda uçurulur. Kalan çözücü zayıf azot akımı yardımı ile uçurulur, sonra 2-4 mL n-heptan veya izooktan eklenir.

Not 1: n-hekzan:dietil etileter karışımı (99:1) günlük hazırlanmalıdır.

Süzüntüyü görsel kontrol etmek için analize başlamadan 100 µL sudan I boyası, numune çözeltisi içine eklenebilir. Renklendirici olarak kullanılan sudan I boyası, trigliseritleri boyadığından altta kalan renksiz kısım mumsu maddeleri temsil etmektedir. Renklenen kısım kolonun alt noktasına yaklaşık 2 cm kala süzme işlemine son verilir. Toplanan renksiz kısım mumsu maddelerdir.

5.2. Gaz kromatografisi ile analiz

5.2.1. Hazırlık

Kolon giriş kısmı doğrudan (on-column) enjeksiyon sistemine, çıkış kısmı dedektöre bağlantı yapılarak gaz kromatografisine takılır.

Eğer kolon ilk kez kullanılacak ise şartlandırılmalıdır. Kolonun içinden düşük akış hızı ile taşıyıcı gaz geçirilir ve cihaz açılır. Derece derece ısıtılır, yaklaşık 4 saat sonra 350 °C'ye ulaşır.

Bu sıcaklıkta en az 2 saat kalır, cihaz çalışma şartları ayarlanır (gaz akışı düzenlenir, ateşleme yapılır, fırın, detektör ve enjektör sıcaklığı ayarlanır vb.). Baseline, herhangi bir pik olmaksızın doğrusal olmalı ve herhangi bir sapma göstermemelidir.

Negatif doğrusal sapma : Kolon bağlantılarının doğru yapılmadığını gösterir.

Pozitif sapma : Kolonun yeterince şartlanmadığını gösterir.

5.2.2. Çalışma şartlarının seçimi

Çalışma şartları genellikle aşağıdaki şekildedir:

- fırın sıcaklığı: 80 °C başlangıç sıcaklığında 1 dk bekletildikten sonra 20 °C/dk sıcaklık artışı ile 140 °C ye çıkarılır. Daha sonra 5 °C/dk sıcaklık artışı ile 335 °C ye çıkarılır ve 20 dakika bekletilir.

	20 °C/dk		5 °C/dk	
Başlangıç 80 °C (1dk)	→	140 °C	→	335 °C (20dk)

- Detektör sıcaklığı: 350 °C,

- Enjeksiyon miktarı: 1 µL n-heptane çözeltisi (2-4 mL)

- Taşıyıcı gaz: seçilen gaz için doğrusal hızda helyum ya da hidrojen olabilir.

- Cihaz hassasiyeti: aşağıdaki şartlara uygun olmalıdır:

Bu koşullar, mumsu maddelerin, yağ asitleri metil ve etil esterleri ile alikonulma zamanı 18±3 dakika olan lauril araşidat iç standardının çok iyi bir şekilde ayrıldığı yeterli pikler (Şekil 2, 3 ve 4) elde edilebilmesi için kolon ve gaz kromatografisinin özelliklerine bağlı olarak değiştirilebilir. Genelde, metil ve etil esterleri iç standardı metil heptadekonat piki tam olarak elde edildiğinde mumsu maddelere ait piklerin de % 60 oranında görülebilmesi gerekmektedir. Pik entegrasyon parametreleri, pik alanlarından istenilen doğru değerlendirilmenin yapılabilmesi amacıyla, değişik biçimlerde hesaplanabilir.

Pik entegrasyon parametreleri, ilgili pik alanlarının doğru olarak değerlendirilmesini sağlayacak bir şekilde belirlenmelidir.

Not 3: En yüksek sıcaklıkta, pozitif sapma tüm skalanın % 10'undan fazla olmamalıdır.

5.2.3. Analiz performansı

Numuneden 10 µL çözelti 10 µL'lik bir mikro enjektör yardımıyla alınarak iğne boşalana kadar piston geri çekilir. İğne enjeksiyon sisteminin içine sokularak bir-iki saniye sonra hızlıca enjekte edilir. Yaklaşık beş saniye sonra iğne yavaşça çıkarılır.

Mumsu maddeler ve stigmadienlerin tamamen ayrılana kadar analize devam edilir

Baseline her zaman gereken koşulları karşılamalıdır.

5.4.1. Piklerin tanımlanması

Pik tanımlaması, alikonma zamanı bilinen mumsu maddeler karışımının aynı şartlarda analiz edilmesiyle elde edilen tanımlanmış piklerle yapılır. Zeytinyağının ana yağ asitleri (palmitik ve oleik) metil ve etil esterleri karışımından alkil esterleri belirlenir.

5.6. Mumsu madde miktarın hesaplanması

Bilgisayar programı yardımı ile iç standart olan lauril araşidat ve C40 – C46 arasındaki alifatik esterlerin pik alanları saptanır.

Esterlerin her birinin mumsu madde içeriği (mg/kg yağ) aşağıdaki formüle uygun olarak hesaplanır.

$$\text{Mumsu maddeler (mg/kg)} = \frac{(\sum A_x) \times m_s \times 1000}{A_s \times m}$$

Burada:

A_x = Milimetre kare her ester pikinin alanı;

A_s = Milimetre kare olarak iç standardın pikinin alanı;

m_s = Eklenen lauril araşidin miligram cinsinden miktarı;

m = Analiz numunesinin gram cinsinden miktarı

5.7. Metil ve etil esterleri miktarının hesaplanması

İç standart olarak kullanılan metil heptadekanoat ile C16 – C18 arasındaki yağ asitleri metil ve etil esterlerinin pik alanları saptanır.

Esterlerin her birinin alkil ester içeriği (mg/kg yağ) aşağıdaki formüle uygun olarak hesaplanır.

$$\text{Ester (mg/kg)} = \frac{A_x \times m_s \times 1000}{A_s \times m}$$

Burada:

A_x = C16 ve C18 esterlerinin ayrı ayrı pik alanları;

A_s = iç standart olarak ilave edilen metil heptadekanoat'ın pik alanı;

m_s = Eklenen metil heptadekanoat miligram cinsinden miktarı;

m = Analiz numunesinin gram cinsinden miktarı

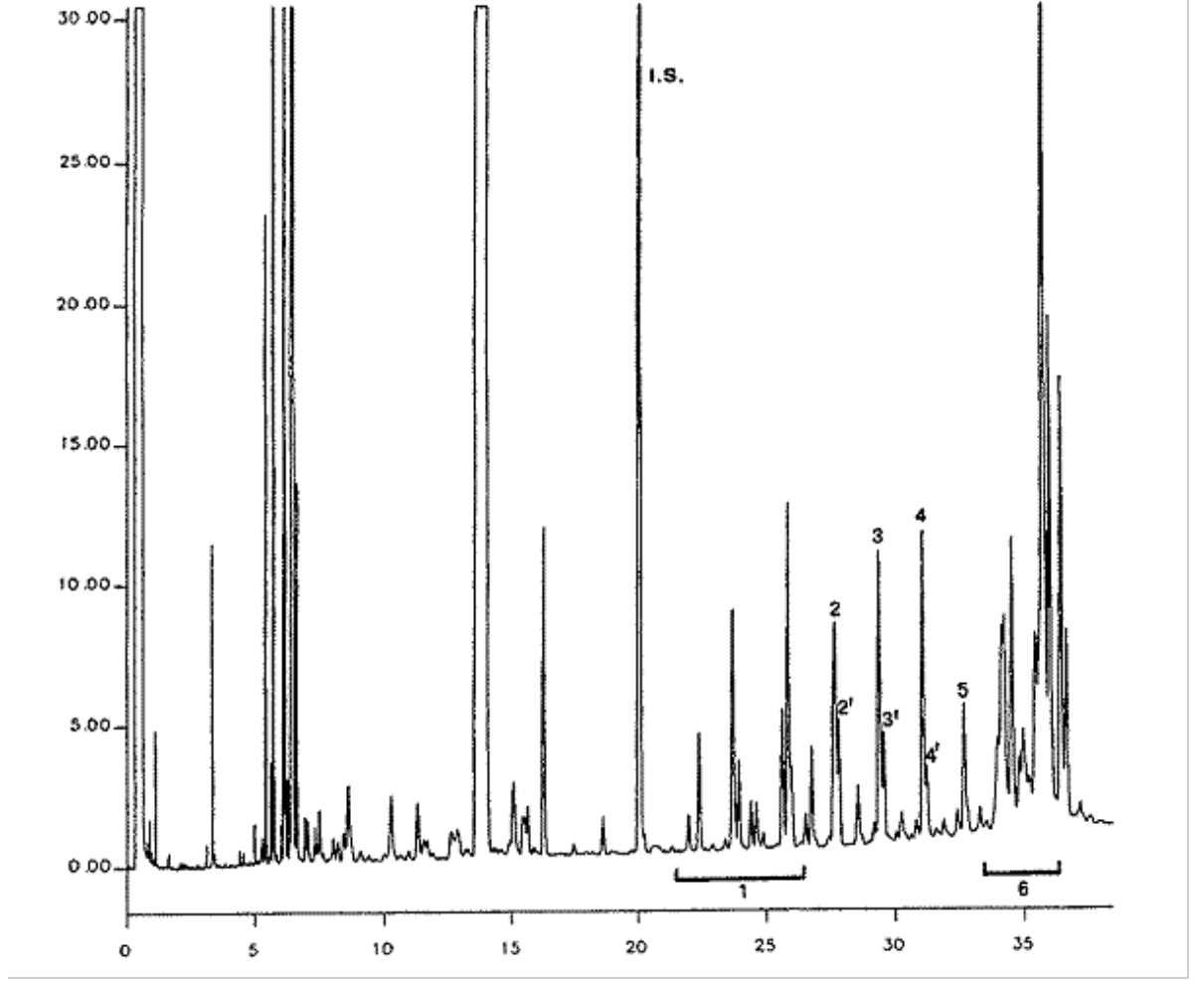
6. Sonuçların ifade edilmesi

C40 – C46 arasındaki farklı mumsu maddelerin içerikleri ve bu içeriklerin toplamı mg/kg (ppm) cinsinden verilir.

C16 – C18 arasındaki metil etil esterleri içerikleri ve bu içeriklerin toplamı mg/kg (ppm) cinsinden verilir.

Not 4: C40-C46 esterleri arasında karbon sayılarına göre pik bileşenlerini gösteren zeytinyağına ait örnek bir kromatogram ekteki şekilde verilmiştir. Tanımlama amacıyla, eğer C46 esteri bölünmüşse, C46

pikinin ağır başlığı pirina yağı mumsu madde analizi kuvvetle tavsiye edilir.



Şekil 1

*Zeytinyağının mumsu maddeler kromatogramı**

Alıkonulma zamanı 5'ten 8 dakikaya kadar olan kesim yağ asitleri metil ve etil esterleridir.

I.S. = Lauril araşidat

1 = Diterpenik esterleri

2 + 2' = C40 esterleri

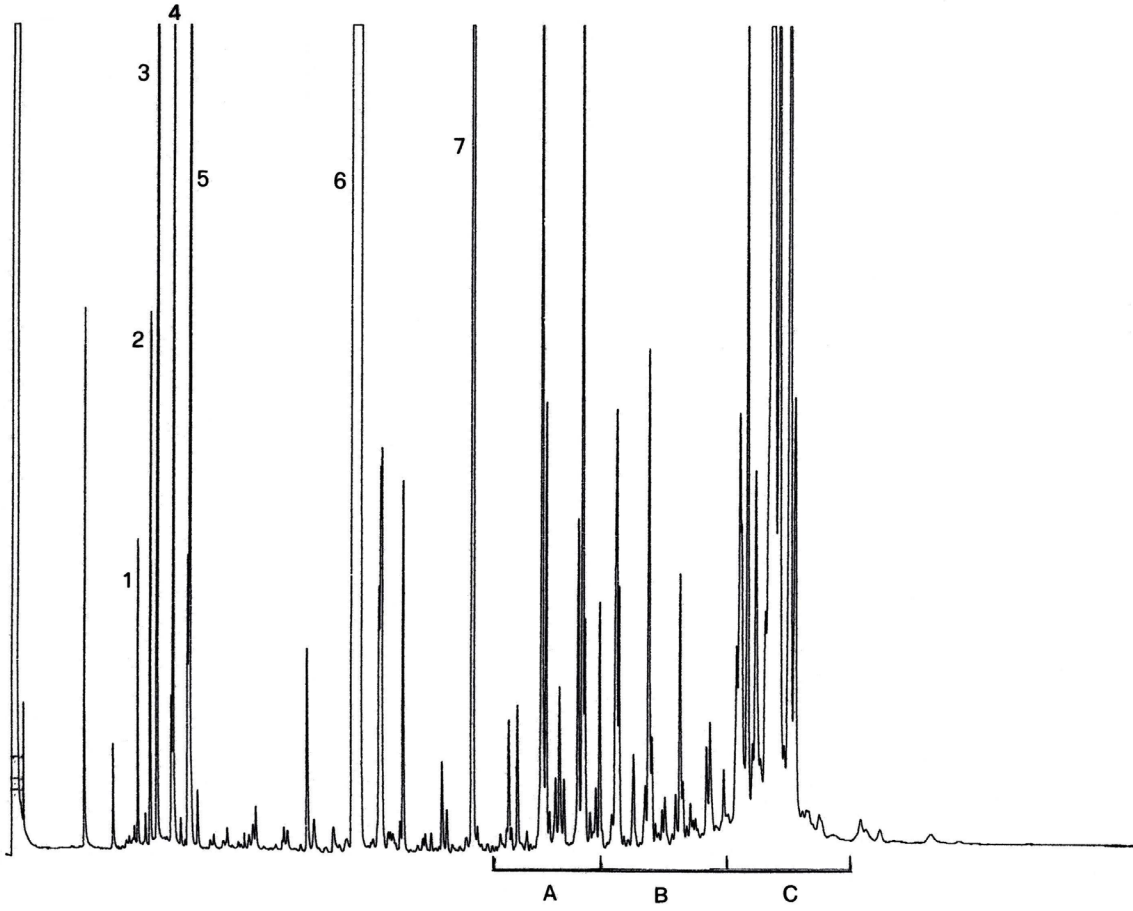
3 + 3' = C42 esterleri

4 + 4' = C44 esterleri

5 = C46 esterleri

6 = Sterol esterleri ve triterpenik alkol

* Sterol esterlerin ayrımından sonra kromatogramda belirgin hiçbir pik (trigliseridler) görülmemesi gereklidir.

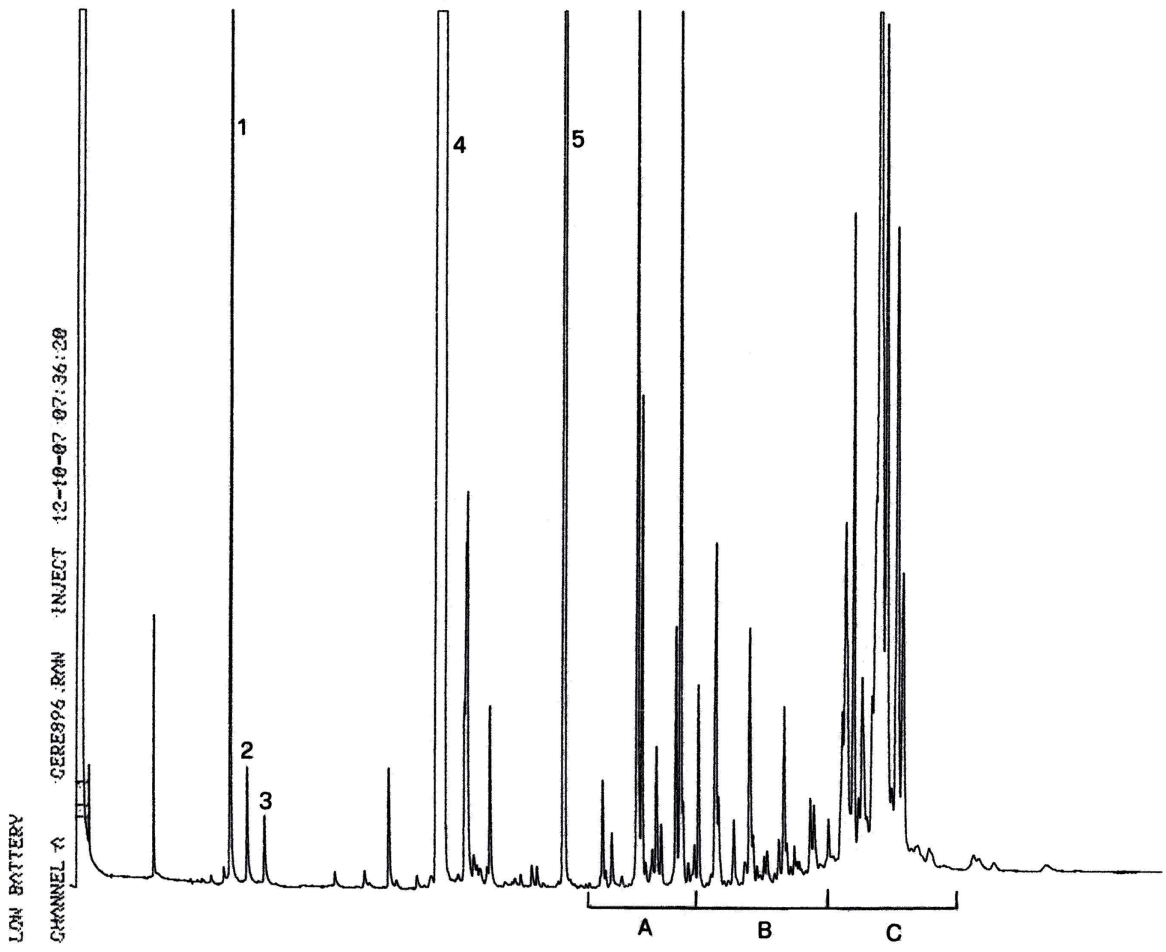


Şekil 2

Natürel Zeytinyağının Metil Esterleri, Etil Esterleri ve Mumsu Maddeler

Burada:

- | | |
|-----------------------------|----------------------------------|
| 1- Metil C16 | 6- Squalen |
| 2- Etil C16 | 7- Lauril araşıdat I.S. |
| 3- Metil heptadekanoat I.S. | A-Diterpenik esterler |
| 4- Metil C18 | B-Mumsu maddeler |
| 5- Etil C18 | C-Sterol ve triterpenik esterler |



Şekil 3

Natürel Sızma Zeytinyağı Metil Esterleri, Etil Esterleri ve Mumsu Maddeler

Burada:

1- Metil heptadekanoat I.S.

2- Metil C18

3- Etil C16

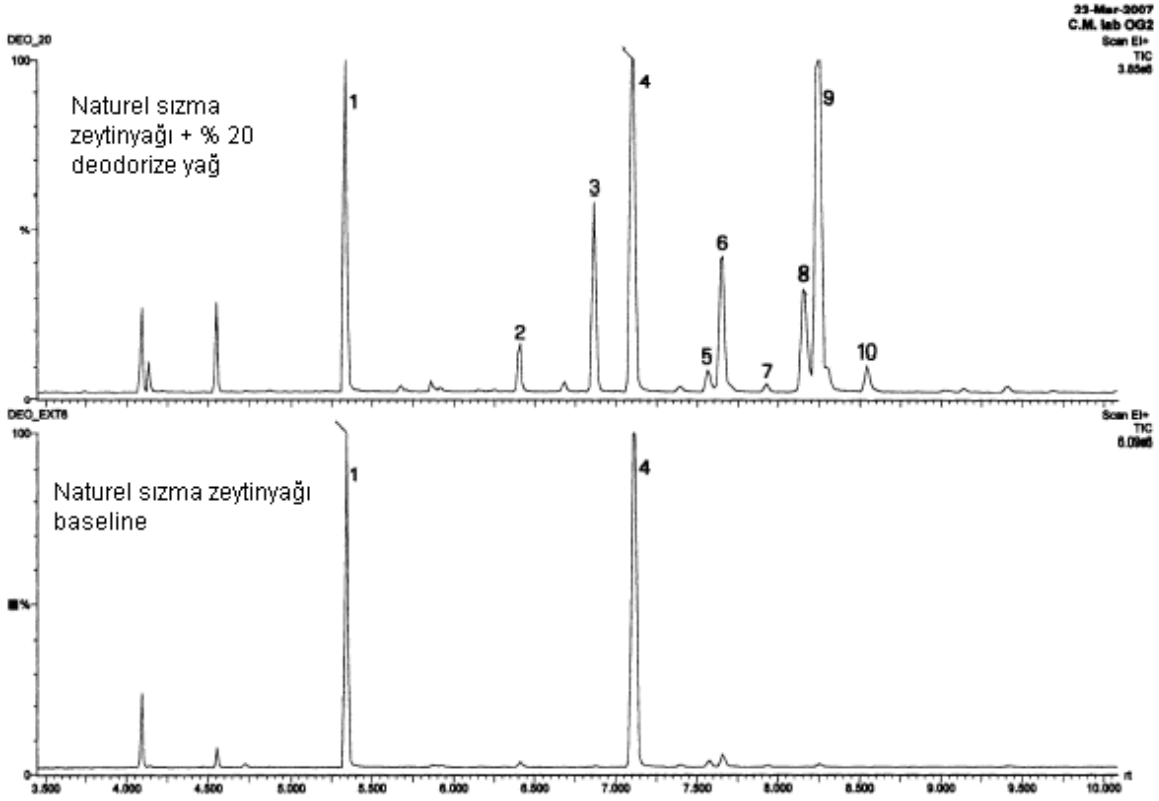
4- Squalen

5- Lauril araşidat I.S.

A- Diterpenik esterler

B- Mumsu maddeler

C- Sterol ve triterpenik esterler



Ş

ekil 4

Natürel Sızma Zeytinyağı ve aynı yağa %20 deodorize yağ karışımına ait kromatogram

Burada:

- | | |
|------------------------|------------------|
| 1- Metil miristat I.S. | 6- Metil oleat |
| 2- Metil palmitat | 7- Metil stearat |
| 3- Etil palmitat | 8- Etil linoleat |
| 4- Metil heptadekanoat | 9- Etil oleat |
| 5- Metil linoleat | 10- Etil stearat |

BİLGİ/AÇIKLAMA

Doğrusal gaz hızının saptanması

Normal çalışma şartları ayarlandıktan sonra gaz kromatografî cihazına 1-3 μ L metan veya propan enjekte edilir. Enjekte edildiği andan pikin oluştuğu ana kadar gazın bütün kolonu geçmesi için gereken zaman ölçülür. (t_M)

Doğrusal hız, cm/s cinsinden L/t_M formülü ile hesaplanır. Burada L kolonun cm cinsinden uzunluğu, t_M ise saniye cinsinden ölçülmüş zamandır.

EK - 5

Kapiler Kolonlu Gaz Kromatografisi İle Sterol Kompozisyonunun ve Miktarının Tayini ve Toplam Steroller İçinde Eritrodiol ve Uvaol Yüzdesinin Belirlenmesi

1. Kapsam

Bu yöntem yağların ayrı ayrı ve toplam sterol içeriklerinin ve eritrodiol ve uvaol (triterpen dialkol) miktarının belirlenmesi prosedürünü tanımlar.

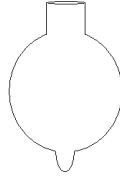
2. Prensiip

İç standart olarak α -kolestanol ilave edilmiş yağ numunesi etanollü potasyum hidroksit ile sabunlaştırılır ve bunu takiben sabunlaşmayan maddeler dietil eterle ekstrakte edilir.

Sterol ve eritrodiol ve uvaol fraksiyonu diğer sabunlaşmayan maddelerden bazik silikajel plaka üzerinde ince tabaka kromatografisi kullanılarak ayrılır. Silikajel üzerinden sterol bandı alınır ve trimetil-silil esterlerine dönüştürülerek GC ile analiz edilir.

3. Cihaz ve malzemeler

- 3.1. Geri soğutucu
- 3.2. 500 mL' lik ayırma hunileri
- 3.3. 250 mL'lik şilifli balon
- 3.4. 20 x 20 cm cam plakaya uygun ince-tabaka kromatografisi için gerekli olan malzemeler
- 3.5. 366 veya 254 nm dalga boyu olan UV lamba.
- 3.6. 100 μ L ve 500 μ L'lik enjektörler.
- 3.7. Huni ve siyah bant süzgeç kâğıdı
- 3.8. 50 mL'lik ağzı şilifli armudi balon



- 3.9. İncelen bir dip kısmı ve contalı kapağı olan 10 mL'lik deney tüpü.
- 3.10. Kapiler Kolonlu Split–Splitless enjeksiyon sistemi olan GC
 - 3.10.1. Kolonlar için termostat kontrollü, $\pm 1^\circ$ C hassasiyetle çalışabilen fırın.
 - 3.10.2. Split sisteme uygun liner içeren ve sıcaklığı ayarlanabilen enjeksiyon bloğu
 - 3.10.3. Alev-iyonizasyon detektörü
 - 3.10.4. Gerekli bilgisayar sistemi ve bilgisayar sistemine bağlı yazıcı
- 3.11. Uzunluğu 20 - 30 m, iç çapı 0,25 – 0,32 mm, % 5 difenil - % 95 dimetilpolisilikon içeren ve film kalınlığı 0,10 – 0,30 μ m olan, camdan ya da eritilmiş silisten kapiler kolon (SE-52 , SE-54 veya eşdeğeri kolon)
- 3.12. Sertleştirilmiş iğneli 10 μ L'lik gaz kromatografi enjektörü.

3.13. Analitik terazi (0,1 mg hassasiyetli)

3.14. Desikatör

4. Reaktifler

4.1. Minimum % 85 saflıkta potasyum hidroksit

4.2. 2 N etanollü potasyum hidroksit çözeltisi, 130 g potasyum hidroksit (en az % 85 saflıkta) 200 mL saf su içinde soğutularak çözünür ve etanolle bir litreye tamamlanır. Çözelti ağzı iyi kapatılmış koyu renkli cam şişelerde maksimum 2 gün saklanır.

4.3. Analitik saflıkta dietil eter

4.4. 0,2 N etanollü potasyum hidroksit çözeltisi, 13 g potasyum hidroksit 20 mL saf su içinde çözünür ve etanolle 1 litreye tamamlanır.

4.5. Analitik saflıkta susuz sodyum sülfat

4.6. Silikajel ile kaplanmış, floresan özelliği olmayan, 0,25 mm kalınlıkta cam plakalar. (Kullanıma hazır olarak bulunmaktadır.)

4.7. Kromatografik saflıkta toluene

4.8. Kromatografik saflıkta aseton

4.9. Kromatografik saflıkta n-hekzan

4.10. Kromatografik saflıkta dietil eter

4.11. Analitik saflıkta etanol

4.12. Analitik saflıkta etil asetat

4.13. İnce-tabaka kromatografisi için referans çözelti: kolesterol veya fitosterollerin, ve eritridiolün etil asetat içindeki % 5'lik çözeltisi.

4.14. % 0,2 lik etanollü 2.7-dikloroflorosein çözeltisi. (Birkaç damla 2 N etanollü potasyum hidroksit çözeltisi ilave edilerek hafifçe bazik hale getirilir.)

4.15. Kromatografik saflıkta susuz piridin

4.16. Heksametil disilazan

4.17. Trimetilklorosilan

4.18. Sterol ve eritridiol trimetilsilil eterin referans çözeltileri (bunları içeren yağlardan elde edilen saf sterol ya da sterol karışımlarından günlük hazırlanır.)

4.19. Saflığı % 99'dan fazla olan α -kolestanol (Saflığı mutlaka GC analiz yapılarak kontrol edilmelidir.)

4.20. Etil asetatla hazırlanmış % 0,2'lik (m/v) α - kolestanol çözeltisi, (iç standart).

4.21. Fenol ftalein (% 1'lik etanollü çözeltisi)

4.22. Taşıyıcı gazlar: Kromatografik saflıkta hidrojen veya helyum

4.23. Yardımcı gazlar: Kromatografik saflıkta hidrojen

Kromatografik saflıkta kuru hava

4.24. n-hekzan/etileter karışımı (65:35)

4.25. 9:3:1 (v/v/v) oranında piridin/heksametil disilazan/trimetil klorosilan içeren silillendirme reaktifi

5. Prosedür

5.1. Sabunlaşmayan maddelerin hazırlanması

5.1.1. 500 μ L'lik enjektör kullanarak 250 mL'lik balona, numunenin sterol içeriğinin yaklaşık % 10'u kadar % 0,2'lik α -kolestanol ilave edilir. Örneğin, 5 g numune için zeytinyağında 500 μ L, pirina yağında ise 1500 μ L

% 0,2 α -kolestanol çözeltisi ilave edilir. Azot gazı altında uçurulur ve nemi alınmış, filtre edilmiş numuneden balona tam 5 g tartılır.

Not 1: Önemli miktarda kolesterol içeren hayvansal ve ya bitkisel yağlar ve katı yağlar kolestanol ile aynı çıkış zamanında pik verebilir. Eğer bu olursa, sterol fraksiyonu hem iç standartlı hem de iç standart ilave edilmeden analiz edilir.

5.1.2. 50 mL 2 N etanolik potasyum hidroksit çözeltisi ilave edilir, geri soğutucuya takılır. Sabunlaşma gerçekleşene kadar (çözelti berrak hale gelene kadar) mantolu ısıtıcıda karıştırılarak ısıtılır. Isıtmaya 20 dk daha devam edilir ve sonra geri soğutucunun üzerinden 50 mL saf su ilave edilir, geri soğutucu çıkarılır ve balon yaklaşık 30 °C'ye soğutulur.

5.1.3. Balonun içindekiler birkaç defa saf suyla çalkalanarak 500 mL'lik ayırma hunisine dikkatlice aktarılır. Kullanılan saf su toplam 50 mL olmalıdır. Yaklaşık 80 mL dietil eter ilave edildikten sonra 60 saniye kadar güçlü bir şekilde çalkalanıp faz ayırımı için bekletilir.

Alt fazı ayırmak için ikinci bir ayırma hunisi kullanılır. Üst fazdan her sefer 60-70 mL dietil eter kullanılarak aynı şekilde iki ekstraksiyon daha yapılır.

Not 2: Herhangi bir emülsiyon oluşursa az miktarda etil veya metil alkol ilavesiyle yok edilebilir.

5.1.4. Üç eter ekstraktı tek bir ayırma hunisinde toplanır ve yıkama suyu nötr bir reaksiyon verene kadar (fenol ftalein indikatörlüğünde) saf su (her seferde 50 mL) ile yıkanır.

Yıkama suyu atıldıktan sonra, eter fazı susuz sodyum sülfat ile filtre edilerek darası alınmış 250 mL'lik şilifli balona süzülür. Huni az miktarda dietil eter ile yıkanır.

5.1.5. Birkaç mL dietil eter kalıncaya kadar 30 °C sıcaklıkta vakumlu döner buharlaştırıcıda uçurulur. 5 mL aseton eklenir ve uçucu solventler hafif bir vakum altında veya bir azot akımı ile kuru hale getirilir, kurutmaya 103 ± 2 °C'deki etüvde yaklaşık 15 dk devam edilir ve desikatörde soğutulduktan sonra tartılır.

5.2. Sterol ve (Eritrodiol+Uvaol) fraksiyonlarının ayrılması

5.2.1. Bazık plakaların hazırlanması: Silikajel plakaları yaklaşık 4 cm yükseklikte 0,2 N etanolü potasyum hidroksit çözeltisine 10 saniye süreyle tamamen daldırılır, sonra kuruması için kurutma dolabında iki saat bırakılır ve son olarak 100 °C'deki etüvde 1 saat bekletilir.

Etüvden çıkarılır ve kullanılıncaya kadar kalsiyum klorür bulunan plaka rafında bekletilir. Bu şekilde bir işleme tabi tutulan plakalar 15 gün içerisinde kullanılmalıdır. Plakalar kullanılmadan önce 100 °C'lik etüvde 5-10 dk tutulabilir.

Not 3: Bazık silikajel plakaları sterol fraksiyonu ayırmak için kullanılacağında sabunlaşmayan maddeleri alüminyum oksit ile işleme tabi tutmaya gerek yoktur. Bu yolla asidik tüm bileşikler (yağ asitleri ve diğerleri) belirli bir bantta tutulacak ve hem sterol bandı hem de alifatik ve triterpen alkol bantları açıkça ayrılacaktır.

5.2.2. 65:35 (v/v) hekzan/dietil eter karışımı (Not 4) yürütme tankı içine yaklaşık 1 cm yükseklikte doldurulur. Yürütme tankının kapağı kapatılır ve sıvı-buhar dengesi oluşması için en az yarım saat kadar soğuk ortamda bekletilir. Yürütme tankının iç yüzeyine çözeltiye batırılmış filtre kâğıdı şeritleri konulabilir. Bu işlem, taşınma zamanını yaklaşık üçte bir oranında azaltır ve bileşenlerin daha düzgün ve belirgin bir şekilde ayrımını sağlar.

Not 4: Yürütme tankının içindeki çözelti her çalışmada yenilenmelidir. Alternatif olarak 50:50 (v/v) n-hekzan/dietileter karışımı kullanılabilir.

5.2.3. Sabunlaşmayan maddelerin etil asetatla yaklaşık % 5'lik çözeltisi hazırlanır. Çözelti, 100 μ L'lik enjektör kullanarak 300 μ L'lik kısmı silikajel plakaya, alt ucuna yaklaşık 2 cm mesafede mümkün olduğu kadar ince ve düzgün bir çizgi halinde verilir. (Damlacıkların küçük olmasına ve birbirleriyle karışmayacak şekilde verilmesine dikkat edilmelidir.) Kontrol için plakanın bir ucuna, çizgi ile aynı hizaya 2-3 μ L referans çözeltisi damlatılır, böylece sterol ve (Eritrodiol+Uvaol) bandı taşımadan sonra tanımlanabilir.

5.2.4. Plaka 5.2.2.'de belirtildiği şekilde hazırlanmış olan yürütme tankına konulur. Ortam sıcaklığı 15-20 °C (Not 5) arasında tutulmalıdır. Yürütme tankının kapağı derhal kapatılır ve numunenin taşınması plakanın üst

kenarının yaklaşık 1 cm altına gelinceye kadar işleme devam edilir. İşlem sonunda tanktan çıkarılan plaka kuruması için bir süre normal ortamda ya da sıcak hava akımında bekletilir.

Not 5: Yüksek sıcaklık ayrımı kötüleştirir.

5.2.5. Plakaya % 0,2'lik alkollü 2,7-dikloroflorosein çözeltisi homojen şekilde püskürtülür ve hafifçe kurutulur. UV ışık altında plaka üzerinde, referans gölge esas alınarak sterol ve (Eritrodiol+Uvaol) bantları sınırları işaretlenir. (Şekil 3)

5.2.6. Metal bir kazıma spatulası kullanarak silikajel işaretlenmiş alandan kazınır. Kazınan silikajel içine süzgeç kağıdı yerleştirilmiş huniye konular. 10 mL sıcak etil asetat ilave edilir, spatula ile dikkatlice karıştırılır süzüntü darası alınmış 50 mL'lik ağız şilifli armudi balonda toplanır.

Hunideki kalıntı dietil eterle üç kez yıkanarak (her sefer yaklaşık 10 mL) süzüntü aynı balona toplanır. Süzüntü 4-5 mL kalıncaya kadar dönerli vakum buharlaştırıcıda düşük sıcaklıkta (40 °C'yi aşmayacak şekilde) uçurulur. Kalan çözelti kuru hale gelene kadar hafif bir azot akımı altında uçurulur.

Birkaç damla aseton kullanılarak kuruyana kadar tekrar uçurulur ve ağız şilifli armudi balonda kalan, sterol ve (Eritrodiol+Uvaol) fraksiyonları tartılır.

5.3. Trimetilsilil eterlerin hazırlanması.

5.3.1. 9:3:1 (v/v/v) oranında piridin/hekzametil disilazan/trimetil klorosilan karışımından oluşan silillendirme reaktifi (Not 6) sterol ve (Eritrodiol+Uvaol) fraksiyonu içeren ağız şilifli armudi balona sterol miktarının her miligramı için 50 µL oranında ilave edilir. Nem, analiz sonucunu olumsuz etkilemektedir (Not 7).

Not 6: Piyasada kullanıma hazır silillendirme reaktifi bulunmaktadır (örneğin bis-trimetilsilil, triflor asetamid + % 1 trimetil klorosilan). Bunlar kullanıldığında eşit miktarda susuz piridin ilave edilir. Piridin yerine aynı miktarda asetonitril kullanılabilir.

5.3.2. Ağız şilifli armudi balonun ağız kapatılır, steroller tamamen çözünene kadar (ters çevirmeden) dikkatlice balon döndürülerek cidarlarda kalan sterollerin de silillendirilmesi sağlanır. Ortam sıcaklığında 15 dk kadar bekletilir. Berrak çözelti GC'ye enjeksiyon için hazırdır.

Not 7: Oluşabilecek hafif opaklık normaldir ve herhangi bir soruna yol açmaz. Beyaz bir parçacığın veya pembemsi rengin oluşması nemliliğin mevcut olduğunu veya reaktifin bozulduğunu gösterir. Eğer bunlar gözlenirse analiz mutlaka tekrarlanmalıdır. (Eğer sadece hekzametil disilazan/trimetil klorosilan kullanılır ise)

5.4. Gaz kromatografisi ile analiz

5.4.1. Ön işlemler

5.4.1.1. Kolon giriş kısmı split enjeksiyon sistemine, çıkış kısmı dedektöre bağlantı yapılarak gaz kromatografisine takılır.

Gaz kromatografisi cihazının genel kontrolü yapılır (gaz akışı, dedektör ve kayıt edicinin işleyişinin etkinliği vb)

5.4.1.2. Eğer kolon ilk kez kullanılacak ise şartlandırılmalıdır. Kolonun içinden düşük akış hızı ile taşıyıcı gaz geçirilir. Kolon, çalışma sıcaklığının en az 20 °C'nin üzerinde olacak şekilde en az 2 saat süre ile şartlandırılır (Not 8).

Cihaz çalışma şartları ayarlanır (gaz akışı düzenlenir, ateşleme yapılır, fırın, detektör ve enjektör sıcaklığı ayarlanır vb.). Baseline, herhangi bir pik olmaksızın doğrusal olmalı ve herhangi bir sapma göstermemelidir.

Negatif doğrusal sapma : kolon bağlantılarının doğru yapılmadığını,

Pozitif sapma : kolonun yeterince şartlanmadığını gösterir.

Not 8: Şartlandırma sıcaklığı kolonun dayanabildiği en yüksek sıcaklığın 20 °C altında olmalıdır.

5.4.2. Çalışma şartları

5.4.2.1. Çalışma şartları aşağıdaki şekildedir:

– fırın sıcaklığı: 260 ± 5 °C,

– enjeksiyon sıcaklığı: 280-300 °C,

- detektör sıcaklığı: 280-300 °C,
- taşıyıcı gazın doğrusal ivmesi: helyum 20 - 35 cm/s, hidrojen 30-50 cm/s,
- split oranı: 1:50-1:100 aralığı,
- cihaz hassasiyeti: en düşük değerin 4 ile 16 katı arasında,
- enjekte edilen madde miktarı: Trimetilsilil ester çözeltisinin 0,5-1 μL 'si.

Aşağıdaki gerekliliklere uygun bir kromatogram almak için bu koşullar değiştirilebilir:

- β -sitosterol için alıkonma zamanı 20 ± 5 dk olmalı,
- Kampesterol piki zeytinyağı için (ortalama içerik % 3) tam kromatogramın % 15 ± 5 'i; soya yağı için (ortalama içerik % 20) tam kromatogramın % 80 ± 10 'u.
- Tüm steroller mutlaka ayrılmalıdır. Ayrılmaya ek olarak aynı zamanda pikler de birbirinden bağımsız olmalıdır. Yani pik bir sonraki pikten önce mutlaka baseline'a dönmelidir.

5.4.3. Prosedür

5.4.3.1. 10 μL 'lik mikro enjektör kullanarak 1 μL hekzan alınır, içine 0.5 μL hava çekilir ve bunu takiben örnekten 0.5-1 μL alınır. İğneyi boşaltmak için enjektörün pistonu kaldırılır. İğne enjeksiyon ünitesinin zarına batırılır ve bir-iki saniye sonra hızlıca enjekte edilir, beş saniye kadar sonra iğneyi yavaşça çıkarılır. Otomatik enjeksiyon sistemi kullanılabilir.

5.4.3.2. Mevcut triterpen dialkollerin Trimetilsilil esterleri tamamen elde edilinceye kadar işleme devam edilir.

Baseline düz olmalıdır. (5.4.1.2)

5.4.4. Piklerin tanımlanması

Her bir pikin tanımlanması alıkonma zamanları ve aynı koşullar altında analiz edilen Trimetilsilil ester sterol ve triterpen dialkollerin karışımlarının alıkonma zamanlarının karşılaştırılmasıyla yapılır.

Steroller ve (Eritrodiol+Uvaol) kromatogramda; kolesterol, brassikasterol, ergosterol, 24-metilen kolesterol, kampesterol, kampestanol, stigmasterol, Δ 7-kampesterol, Δ 5.23-stigmastadienol, klerosterol, β -sistosterol, sitostanol, Δ 5-avenasterol, Δ 5.24-stigmastadienol, Δ 7-stigmasterol, Δ 7-avenasterol, eritrodiol ve uvaol sırasıyla alıkonulur.

SE-52 ve SE-54 kolonları için β -sitosterole göre göreceli alıkonma süreleri aşağıdadır:

Steroller için göreceli alıkonma süreleri

Pik	Tanımlama	Göreceli alıkonma süresi		
		SE 54 kolonu	SE 52 kolonu	
1	kolesterol	Δ -5-kolesten- 3β -ol	0,67	0,63
2	kolestanol	5α -kolestan- 3β -ol	0,68	0,64
3	brassikasterol	[24S]-24-metil- Δ -5,22-kolestadien- 3β -ol	0,73	0,71
*	ergosterol	[24S]-24-metil- Δ -7-22-kolestatrien- 3β ol	0,78	0,76
4	24-metilen-kolesterol	24-metilen- Δ -5,24-kolesten- 3β -ol	0,82	0,80
5	kampesterol	(24R)-24-metil- Δ -5-kolesten- 3β -ol	0,83	0,81
6	kampestanol	(24R)-24-metil-kolestan- 3β -ol	0,85	0,82

7	stigmasterol	(24R)-24-etil- Δ -5,22-kolestadien-3 β -ol	0,88	0,87
8	Δ -7-kampesterol	(24R)-24-metil- Δ -7-kolesten-3 β -ol	0,93	0,92
9	Δ -5,23-stigmastadienol	(24R,S)-24-etil- Δ -5,23-kolestadien-3 β -ol	0,95	0,95
10	klerosterol	(24S)-24-etil- Δ -5,25-kolastadien-3 β -ol	0,96	0,96
11	β -sitosterol	(24R)-24-etil- Δ -5-kolestan-3 β -ol	1,00	1,00
12	sitostanol	24-etil-kolestan-3 β -ol	1,02	1,02
13	Δ -5-avenasterol	(24Z)-24-etiliden-5-kolesten-3 β -ol	1,03	1,03
14	Δ -5,24-stigmastadienol	(24R,S)-24-etil- Δ -5,24-kolestadien-3 β -ol	1,08	1,08
15	Δ -7-stigmastenol	(24R,S)-24-etil- Δ -7,24-kolestadien-3 β -ol	1,12	1,12
16	Δ -7-avenasterol	(24Z)-24-etiliden- Δ -7-kolesten-3 β -ol	1,16	1,16
17	eritrodol	5 α olean-12en-3 β 28 diol	1,41	1,41
18	uvaol	Δ 12-ursen-3 β 28 diol	1,52	1,52

Şekil 1 ve 2 bazı yağlar için tipik kromatogramları göstermektedir.

5.4.5. Miktarın Hesaplanması

5.4.5.1. α -kolestanol ve sterol ve (Eritrodol+Uvaol) pik alanları integratör kullanılarak hesaplanır. Yukarıda listelenenler arasında bulunmayan bileşiklerin pikleri göz önünde bulundurulmaz. α -kolestanol için tepki katsayısı 1'e eşittir.

5.4.5.2. Her bir sterolün miktarı aşağıdaki şekilde mg/kg örnek cinsinden hesaplanır:

$$\text{sterol x} = \frac{A_x \times m_s \times 1000}{A_s \times m}$$

Burada:

A_x = sterol x'in pik alanı;

A_s = α -kolestanol pik alanı

m_s = miligram cinsinden eklenen α -kolestanol kütlesi;

m = gram cinsinden saptama için alınan numunenin kütlesi.

6. Sonuçların değerlendirilmesi

6.1. Her bir sterol miktarı örneğin mg/kg cinsinden ve toplamları da "toplam steroller" olarak kaydedilir.

Kompozisyonun her bir sterolü ve eritrodol ve uvaol değerleri 1 ondalık olarak verilir.

Toplam sterol değeri ondalıksız verilir.

6.2. Her bir sterol yüzdesi, ilgili pik alanının sterollerin ve eritrodol ve uvaol toplam pik alanına oranından hesaplanır.

$$\% \text{ sterol x} = \frac{A_x}{\sum A} \times 100$$

Burada:

A_x = x'in pik alanı

$\sum A$ = sterollerin toplam pik alanı

- 6.3. Σ Beta-sitosterol: Δ -5,23-stigmastadienol + klerosterol + beta-sitosterol + sitostanol + Δ -5-avenasterol + Δ -5,24-stigmastadienol
- 6.4. Eritrodiol ve uvaol yüzdesi hesaplaması

$$\% (\text{eritrodiol} + \text{uvaol}) = \frac{E_r + U_v}{E_r + U_v + \sum A} \times 100$$

Burada:

ΣA = sterollerin toplam pik alanı

E_r = eritrodiol pik alanı

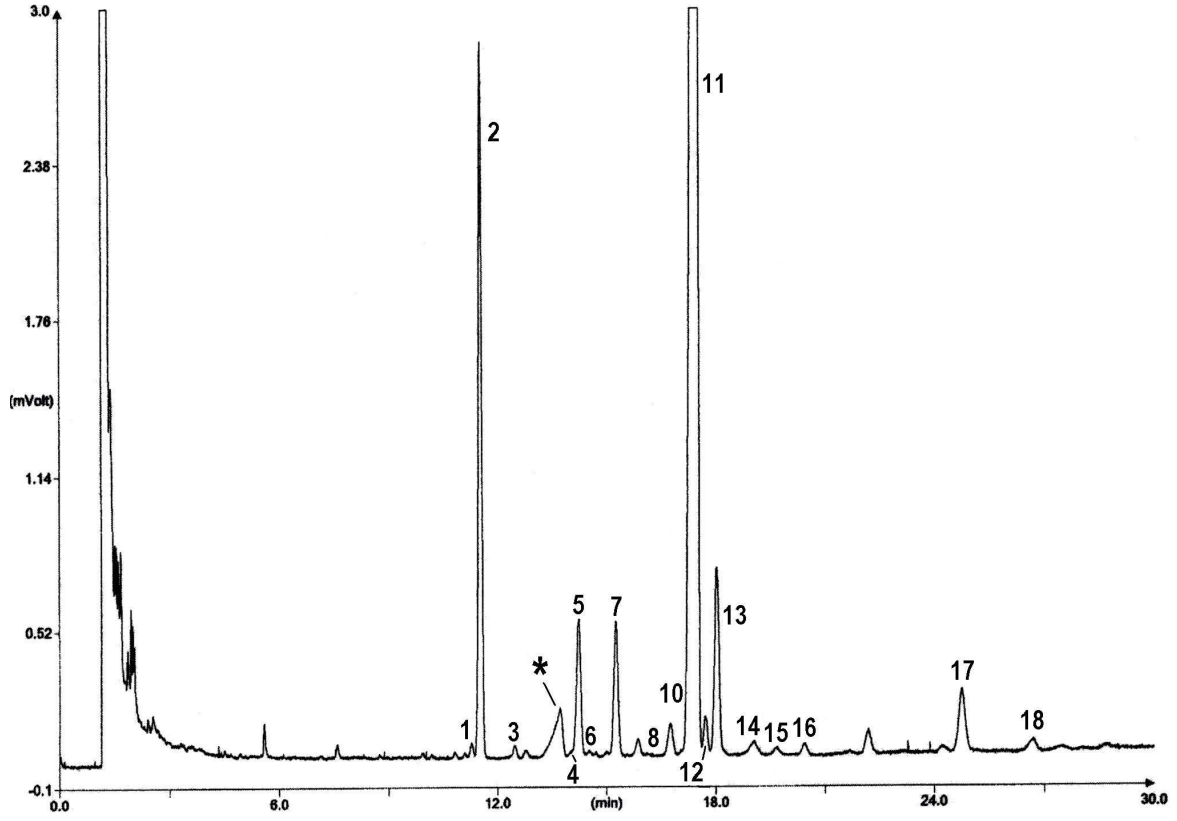
U_v = uvaol pik alanı

BİLGİ/AÇIKLAMALAR

Doğrusal gaz hızının saptanması:

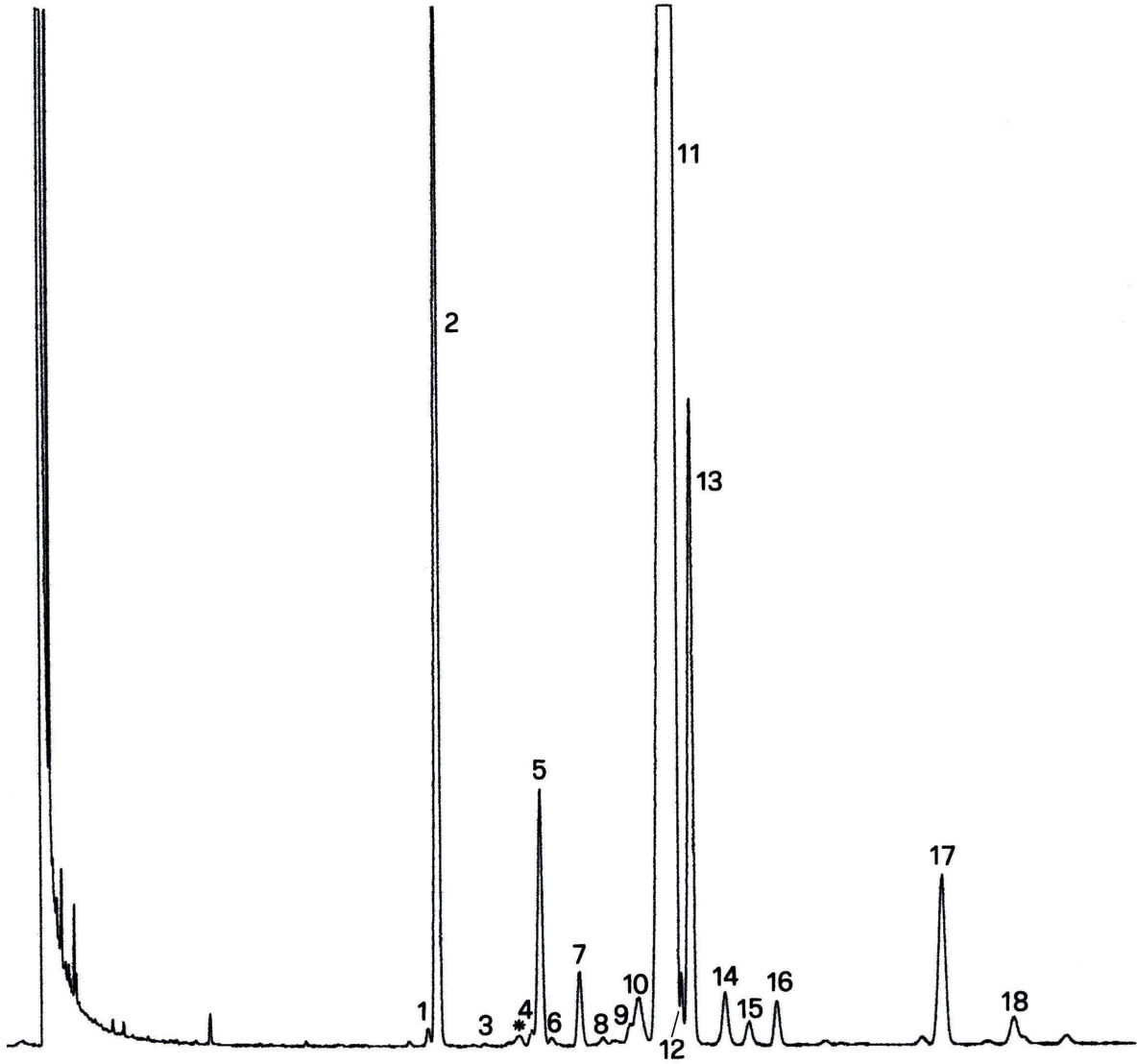
Normal çalışma şartları ayarladıktan sonra gaz kromatografi cihazına 1-3 μ L metan veya propan enjekte edilir. Enjekte edildiği andan pikin oluştuğu ana kadar gazın bütün kolonu geçmesi için gereken zaman ölçülür (tM).

Doğrusal hız, cm/saniye cinsinden L/tM formülü ile hesaplanır. Burada L kolonun cm. cinsinden uzunluğu, tM ise saniye cinsinden ölçülmüş zamandır.



Şekil 1

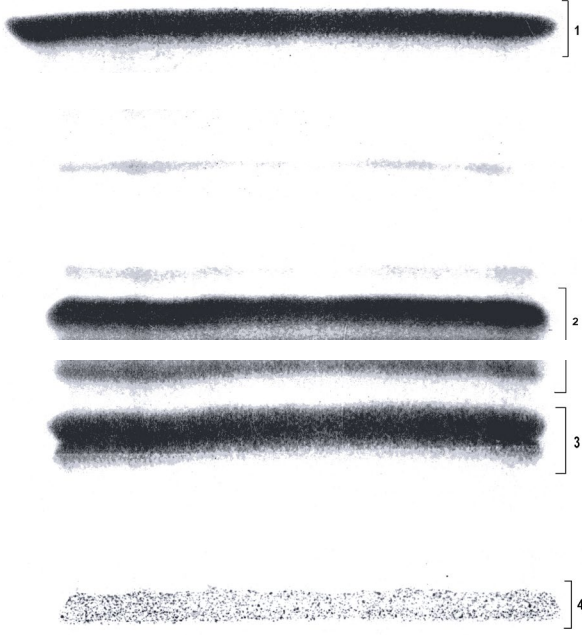
*Ham Zeytinyağının sterol ve (Eritrodiol+Uvaol) fraksiyonunun gaz kromatogramı
(iç standart içeren)*



Şekil 2

Rafine Zeytinyağının sterol ve (Eritriol+Uvaol) fraksiyonunun gaz kromatogramı

(iç standart içeren)



Şekil 3

Sterol ve (Eritrodiol+Uvaol) tespiti için kazanması gereken bölgeleri gösteren pirina yağına ait plaka

Burada;

- 1- Squalene
- 2- Triterpen ve alifatik alkol
- 3- Steroller ve (Eritrodiol+Uvaol)
- 4- Başlangıç ve serbest yağ asitleri

EK - 6

2-Gliseril Monopalmitat Yüzde Miktarının Tayini

1. Kapsam

Bu metot, 2-gliseril monopalmitatın değerlendirilmesiyle 2 pozisyonlu trigliseritlerin palmitik asit yüzdesinin tayini için gerekli prosedürü tanımlar ve oda sıcaklığındaki (20 °C) sıvı bitkisel yağlara uygulanabilir.

2. Prensiptir

Yağ numunesi hazırlandıktan sonra, pankreatik lipaz etkisiyle gerçekleşen 1- ve 3- pozisyonundaki trigliserit moleküllerinin kısmi ve spesifik hidrolizlenmesi sonucu görünür durumdaki 2 pozisyonlu mono gliseritler ayrılır. 2-gliserit monopalmitat elde edildikten sonra kapiller kolonlu gaz kromatografi ile monogliserit fraksiyonu içindeki 2-gliseril monopalmitat %'sinin silillendirilmesi sonucunda tayin edilir.

3. Cihaz ve malzemeler

- 3.1 25 mL' lik erlen
- 3.2 100, 250 ve 300 mL' lik beherler
- 3.3 İç çapı 21-23 mm, uzunluğu 400 mm olan, musluklu kromatografik cam kolon
- 3.4 10, 50, 100 ve 200 mL' lik dereceli silindirler
- 3.5 100 ve 250 mL'lik balonlar
- 3.6 Vakumlu döner buharlaştırıcı
- 3.7 10 mL' lik, konik dipli, kapaklı cam santrifüj tüpleri
- 3.8 10 ve 100 mL'lik tüpler için santrifüj cihazı
- 3.9 $40 \pm 0,5$ °C' ye ayarlanabilen su banyosu
- 3.10 1 ve 2 mL' lik dereceli pipetler,
- 3.11 1 mL' lik plastik enjektör (tıbbi enjektör)
- 3.12 100 µL'lik mikro enjektör,
- 3.13 1000 mL' lik ayırma hunisi,
- 3.14 Kolona doğrudan (on column) enjeksiyon sistemi, ± 1 °C hassasiyetli termostat kontrollü fırın ile donanımlı kapiler kolonla çalışmaya uygun gaz kromatografi cihazı
- 3.15 Kolonun içine doğrudan giriş için soğuk enjektör (on column)
- 3.16 Alev-iyonizasyon detektörü
- 3.17 PC ile bağlantılı gaz kromatografi verilerini saklayabilecek bilgisayar sistemi ve yazıcı
- 3.18 Uzunluğu 8-12 m, iç çapı 0,25-0,32 mm film kalınlığı 0,10-0,30 µm olan cam ya da eritilmiş silisten (Fused silica) metilpolisiloksan ya da % 5 fenil metilpolisiloksan ile kaplanmış, 370 °C sıcaklıkta kullanıma uygun kapiler kolon
- 3.19 En az 7,5 cm uzunluğunda sertleştirilmiş iğnesi olan enjeksiyon sisteminde kullanıma uygun 10 µL'lik enjektör
- 3.20. 500 mg silikajel içeren SPE kartuş

4. Reaktifler

- 4.1. Tanecik boyutu 0,063-0,200 mm olan (70/280 mesh) Silika jel,
Hazırlanışı; 160 °C'lik etüvde 4 saat kurutulur, desikatörde oda sıcaklığına soğutulur. % 5 oranında su eklenir (152g silika jel+8g saf su) ağzı kapatılıp dikkatlice homojenize edilir. Kullanmadan en az 12 saat önce hazırlanmalıdır.
- 4.2. Kromatografik saflıkta n-hekzan,
- 4.3. İzopropanol
- 4.4. İzopropanolun 1:1 lik (v/v) sulu çözeltisi
- 4.5. Lipaz aktivitesi 2,0-10 mg/ünite olan pankreatik lipaz enzimi,
- 4.6. pH' ı 1:1 seyreltilmiş HCl çözeltisi ile 8' e ayarlanmış 1 M'lık tris(hidroksimetil)aminometanın sulu tampon çözeltisi
- 4.7. Enzimatik saflıkta % 0,1'lik sodyum kolat çözeltisi. Bu çözelti hazırlandıktan sonra 2 hafta içinde kullanılmalıdır.
- 4.8. % 22' lik sulu kalsiyum klorür çözeltisi,
- 4.9. Kromatografik saflıkta dietil eter
- 4.10. Taşıma çözeltisi; n-hekzan:dietil eter (87:13, v/v)

- 4.11. % 12'lik (m/m) Sodyum hidroksit çözeltisi,
- 4.12. Fenolftalein (%1'lik etanollü çözeltisi)
- 4.13. Taşıyıcı gazlar: kromatografik saflıkta hidrojen veya helyum
- 4.14. Yardımcı gazlar:
Kromatografik saflıkta hidrojen
Kromatografik saflıkta kuru hava
- 4.15. 9:3:1 (v/v/v) oranında piridin/heksametil disilazan/trimetil klorosilan karışımından oluşan silillendirme reaktifi
Piyasada kullanıma hazır silillendirme reaktifi bulunmaktadır (örneğin bis-trimetilsilil, triflor asetamid + % 1 trimetil klorosilan). Bunlar kullanıldığında eşit miktarda susuz piridin ilave edilir.
- 4.16. Referans numune: saf monogliseritler ve buna benzer karışımdaki yüzde kompozisyonu bilinen numuneler

5. Prosedür

- 5.1 Numunenin hazırlanması:
- 5.1.1 Numunenin serbest yağ asitliği oleik asit cinsinden % 3'ün altındaysa silika jel kolondan önce nötralizasyon işlemine gerek yoktur. Eğer % 3' ün üzerinde ise aşağıdaki prosedür uygulanır;
- 5.1.1.1 1000 mL' lik ayırma hunisine 50 g numune eklenir ve 200 mL n-hekzanda çözünür. 100 mL propan-2-ol ve yağın serbest asitliğinin % 5 fazlası olacak şekilde % 12' lik NaOH çözeltisi eklenir. 1 dakika kuvvetlice çalkalanır. 100 mL saf su ilave edilerek tekrar çalkalanır. Faz ayrımı beklenir. Altta bulunan sabun fazı uzaklaştırıldıktan sonra tekrar oluşan çözünmeyen safsızlıklar da uzaklaştırılır. Hekzan fazı fenolftalein ile pembe renk vermeyinceye kadar 50-60 mL propan-2-ol/su karışımı ile birkaç kez yıkanır. Hekzan, tamamen uzaklaşana kadar vakumlu döner buharlaştırıcıda uçurulur. Bu uygulamanın sonunda yağın serbest asitliği % 0,5' in altına düşer.
- 5.1.2 Yukarıda bahsedilen şekilde hazırlanan yağ numunesinden 1g 25 mL' lik erlene tartılır. 10 mL taşıma çözeltisi içinde çözünür. Kolon kromatografisinden önce en az 15 dk bekletilir. Eğer çözelti bulanıksa santrifüj edilir. Bu şarta uygun kromatografi kolonu temin edilir. (500 mg silika jel içeren SPE kartuşlar kullanılabilir.)
- 5.1.3 Kolonun hazırlanması:
Kolonun dibine cam pipetle bir parça cam yünü oturtulur. Kolona yaklaşık 30 mL taşıma çözeltisi eklenir. Havayı uzaklaştırmak için basılır.
Bir beherde 80 mL taşıma çözeltisi içinde 25 g silika jel ile süspansiyon hazırlanır. Huni yardımıyla kolona transfer edilir. Bütün silikanın kolona aktarılması için taşıma çözeltisi ile defalarca yıkanır ve kolona eklenir. Musluk açılarak çözücü seviyesi silika jelin 2 mm üstüne gelinceye kadar akıtılır.
- 5.1.4 Kolon kromatografisi:
25 mL' lik erlende hassas olarak tartılan 1,0 g yağ numunesi 10 mL taşıma çözeltisi içinde çözünür ve hazırlanan kolona transfer edilir. Musluk açılır numune silika jel seviyesine gelene kadar akıtılır. 150 mL taşıma çözeltisi ile taşınır. Akış hızı 2 mL/dk ya ayarlanır. Böylece numune ortalama 60-70 dakikada kolondan geçer. Toplanan çözelti tartımı alınmış 250 mL'lik balona aktarılır. Vakumlu döner buharlaştırıcıda çözücü uçurulur. Son kalıntılar da azot gazı altında uçurulur. Balon tartılır ve geri alınan miktar hesaplanır. (Eğer kullanıma hazır SPE kartuşlar kullanıldıysa şu yol izlenir; kartuşa 3 mL n-hekzan ve 5.1.2' de hazırlanan çözeltinin 1 mL' si eklenir. Çözelti geçirildikten sonra 4 mL taşıma çözeltisi [n-hekzan:dietyl eter/9:1 (v/v)] ile yıkanır. Toplanan çözelti 10 mL' lik tüpe alınarak azot gazı altında uçurulur. Kuru kalıntı pankreatik lipaz ile parçalanır. SPE' den önce ve sonra numunenin yağ asidi kompozisyonunun kontrol edilmesi gerekir.)
- 5.2 Pankreatik lipaz ile hidroliz:

5.2.1 Santrifüj tüpüne hazırlanan numuneden 0,1 g tartılır. Her bir ekleden sonra iyi bir şekilde karıştırılarak 2 mL tampon çözelti, 0,5 mL sodyum kolat çözeltisi ve 0,2 mL kalsiyum klorür çözeltisi sırasıyla eklenir. Tüpün ağzı kapatılır ve 40 ±0,5 °C su banyosunda tutulur.

5.2.2 20 mg lipaz eklenir. Dikkatlice karıştırılır. Kapağın ıslanmaması gerekir. Su banyosunda (40±0,5 °C) tam olarak 2 dakika tutulur. Sonra kuvvetlice 1 dakika çalkalanır ve soğutulur.

5.2.3 1 mL dietil eter eklenir, kapağı kapatılıp kuvvetlice çalkalanır. Santrifüjlenir. Eter fazı temiz kuru bir tüpe mikro enjektörle alınır.

5.3 Silil türevlerinin hazırlanması ve gaz kromatografisi:

5.2.3' te hazırlanan çözülden 100 µL mikro enjektör yardımıyla 10 mL' lik konik dipli bir tüpe alınır.

Çözücü hafif azot akımında uçurulur, 200 µL silillendirme reaktifinden eklenir. Kapağı kapatılır ve ayrılması için 20 dakika bekletilir.

20 dakikanın sonunda kromatografi koşullarına göre 1-5 mL n-hekzan eklenir. Elde edilen çözelti GC için hazırdır.

5.4 Gaz kromatografisi (GC):

Çalışma şartları:

Enjektör sıcaklığı çözücünün kaynama noktasının altında olmalıdır (68 °C)

-Dedektör sıcaklığı: 350 °C

-Fırın Sıcaklığı: 60 °C başlangıç sıcaklığında 1 dk bekletildikten sonra 15 °C/dk sıcaklık artışı ile 180 °C ye çıkarılır. Daha sonra 5 °C/dk sıcaklık artışı ile 340 °C ye çıkarılır ve 13 dakika bekletilir.

	15 °C/dk		5 °C/dk	
Başlangıç 60 °C (1dk)	→	180 °C	→	340 °C (13dk)

-Taşıyıcı gaz: Hidrojen ya da helyum kullanılmalı

Doğrusal akış hızı Şekil 1'deki gibi bir kromatogram elde edilecek şekilde ayarlanmalıdır.

Alıkonma zamanı trigliseritlerin C54 piki 40±5 dakikada çıkacak şekilde ayarlanmalıdır (Şekil 2). (2-gliseril monopalmitat pikinin yüksekliği tüm skalanın en az % 10' u kadar olmalıdır.)

-Enjeksiyon miktarı: 0,5-1 µL, numunenin 5 mL n-hekzandaki çözeltisi

5.4.1 Piklerin tanımlanması

Pik tanımlaması, alıkonma zamanı bilinen monogliserit karışımının aynı şartlarda analiz edilmesiyle elde edilen tanımlanmış piklerle yapılır.

5.4.2 Miktarın hesaplanması

Bilgisayar programı yardımı ile pik alanları hesaplanır.

6. Sonuçların ifade edilmesi:

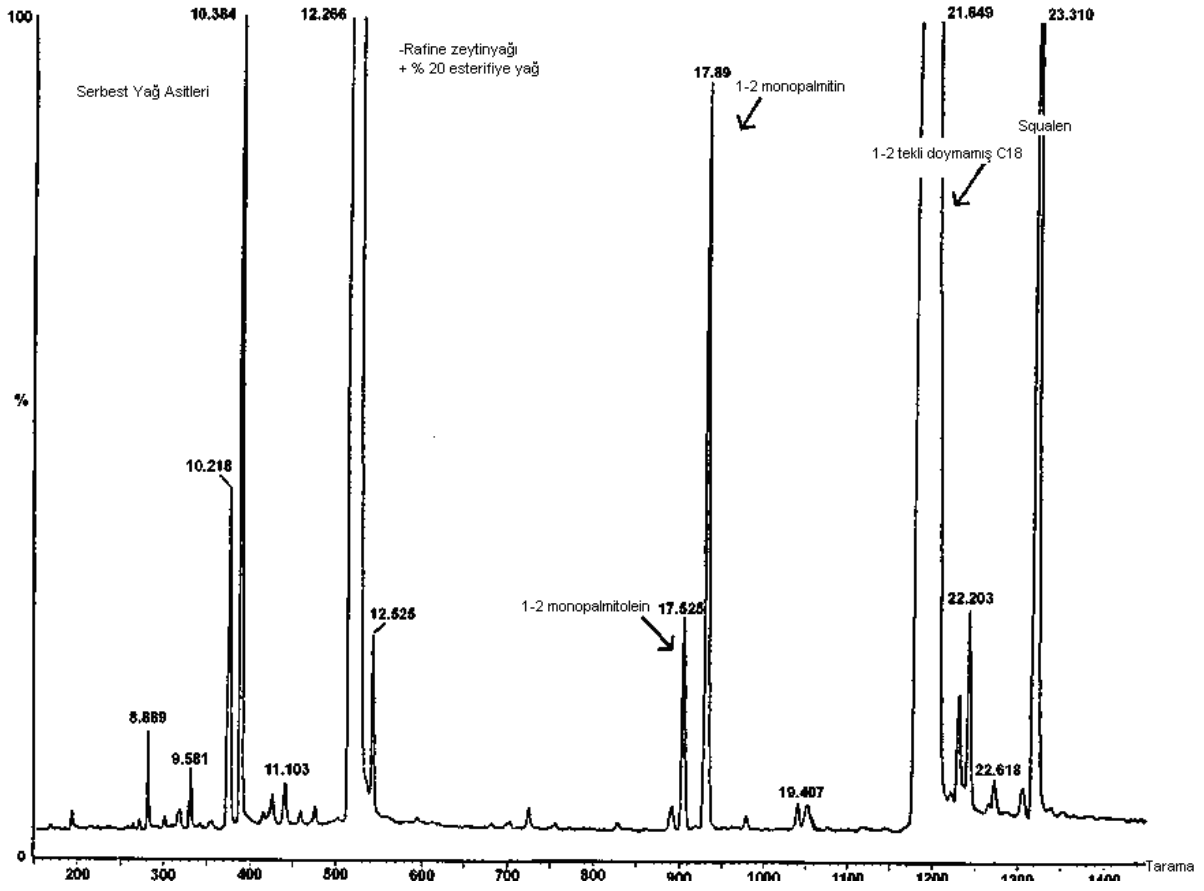
2-gliseril monopalmitatın yüzdesi ilgili pik alanının toplam pik alanına (Şekil 2) oranından aşağıdaki şekilde hesaplanır:

$$\% \text{ 2-gliseril monopalmitat} = 100 \times \frac{A_x}{\sum A}$$

Ax: gliseril monopalmitat pikinin alanı

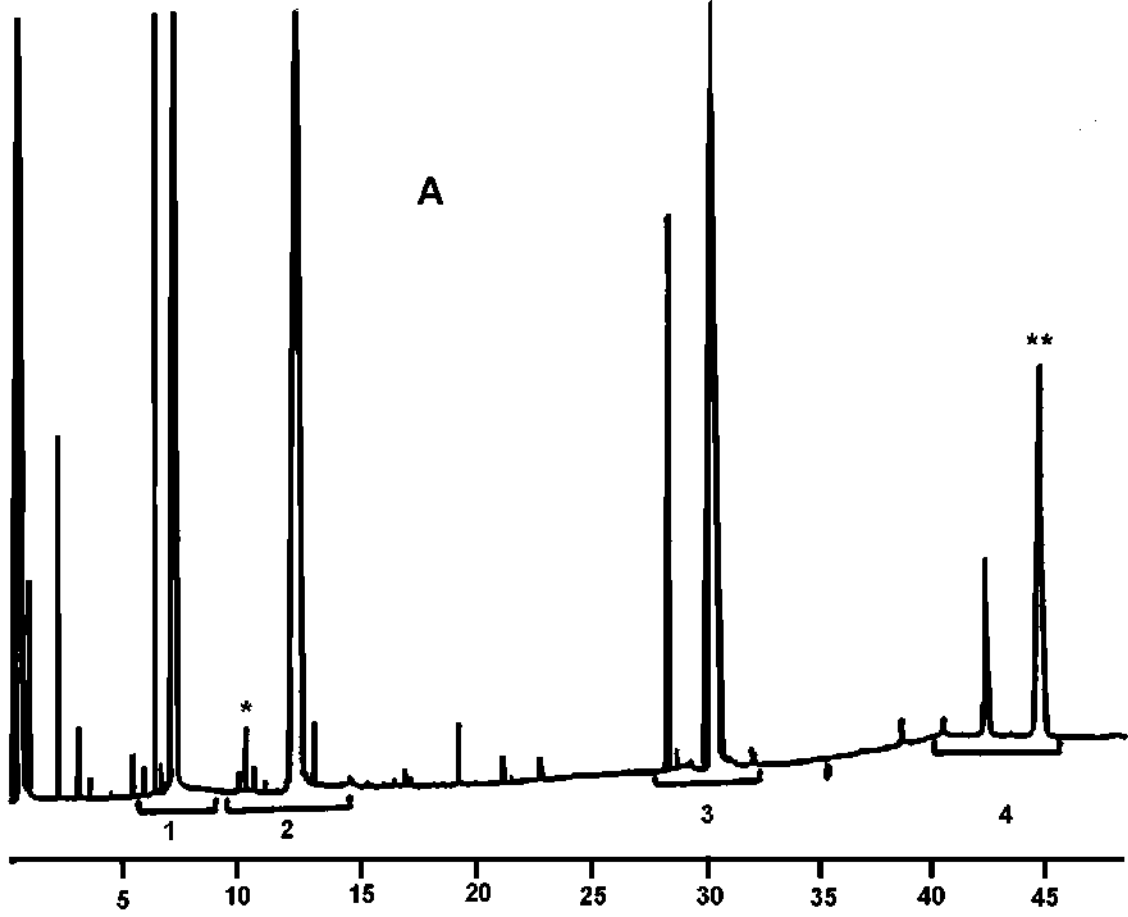
$\sum A$: Monogliserit piklerinin toplam alanı

Sonuçlar bir ondalık olarak verilir.



Şekil 1

% 20 esterifiye yağ eklenmiş rafine zeytinyağının (%100) lipaz ile parçalanmasından sonra silil reaktifi ile reaksiyonundan sonraki kromotogramı



Şekil 2

A Kromatogramı, esterifiye edilmemiş zeytinyağının mumsu maddeler fraksiyonunun digliserid fraksiyonu ile aynı zamanda veya hemen sonrasında (8-12 m kapiler kolon) elde edilen çözeltinin lipase aktivasyonundan sonra sililendirmesi ile elde edilmiştir.

Lipaz aktivasyonundan sonra trigliserid miktarı % 15'i geçmemelidir.

- 1 = Serbest yağ asitleri
- 2 = Monogliseridler
- 3 = Digliseridler
- 4 = Trigliseridler
- * = 2-monopalmitin
- ** = Trigliserid C54

7. Notlar

Not 1: Uygun lipaz aktivitesine sahip olan lipazlar piyasada bulunmaktadır.

Not 2: Lipaz aktivitesinin kontrol edilmesi;

100 g/L'lik arap zamkı çözeltisinden 165 mL, 15 g ezilmiş buz ve 20 mL nötrale yağ karışımı uygun bir çalkalayıcı içinde yaklaşık 10 dakika çalkalanarak yağ emülsiyonu hazırlanır.

50 mL'lik behere bu emülsiyondan 10 mL koyulur, ardından 0,2 g/mL'lik sodyum kolat çözeltisinden 0,3 mL ve 20 mL saf su ilave edilir. pH metrenin elektrodu behere daldırılarak beher $37 \pm 0,5$ °C'de su banyosuna konulur.

Bir büret vasıtasıyla pH 8,3'e ulaşıncaya kadar 0,1M sodyum hidroksit çözeltisi damlatılır. Üzerine 0,1g/mL'lik lipaz çözeltisinden yeteri kadar (1 mL) ilave edilir edilmez kronometre çalıştırılır ve pH tekrar 8,3 oluncaya kadar 0,1M sodyum hidroksit çözeltisinden damla damla eklenmeye devam edilir. Dakikada tüketilen alkali hacmi kaydedilir.

Veriler, x eksenini zaman ve y eksenini pH seviyesini sabit tutmak için gerekli alkali çözeltisi olacak şekilde grafik biçiminde kaydedilir. Doğrusal bir grafiğin elde edilmesi gerekmektedir.

$$A = \frac{V \times M \times 100}{m}$$

A= Lipaz Aktivitesi (lipaz unit/mg)

V= Grafikten hesap edilen bir dakikada tüketilen sodyum hidroksit miktarı (mL)

M= Sodyum hidroksitin molaritesi

m= Kullanılan lipazın kütlesi (mg)

Bir "Lipaz Unit" dakikada 10 µeq asidi açığa çıkaracak lipaz miktarını ifade eder. (µeq/dk)

EK - 7

Ultraviyole Işığında Özgül Soğurma Tayini

1. Amaç ve kapsam

Bu yöntem, zeytinyağı ve pirina yağının ultraviyole ışıkta spektrofotometrik olarak incelenmesini kapsar. Elde edilen sonuçlar saklama ve işleme sırasında yağda meydana gelebilecek kalite değişimlerinin göstergesidir.

Bu yöntemde belirtilen özgül dalga boylarındaki soğurma, yağlarda bulunan konjuge dien ve trien yapılarından kaynaklanmaktadır. Bu soğurmalar, $E_{1cm}^{1\%}$ (% 1'lik çözeltinin 1 cm ışık yolunda özgül soğurma katsayısı olarak ifade edilir) "soğurma katsayısı" olarak bilinir ve K ile de gösterilebilir. Formüllerde kullanılan Delta E ve Delta K ifadeleri eşdeğerdir.

2. Prensipte

Numune, uygun bir çözücü içinde çözünür ve numune çözeltisinin soğurması saf çözücüye (kör) karşı belirtilmiş olan dalga boylarında belirlenir. Yağların özgül soğurmaları spektrofotometre okumaları dikkate alınarak hesaplanır.

3. Cihaz ve malzemeler

- 3.1. Spektrofotometre (220-360 nm arasındaki dalga boylarında okuma yapabilen)
- 3.2. Kuvartz küvetler (Kapakları ile birlikte 1 cm'lik ışık yoluna sahip ve su veya kromatografik saflıkta uygun başka bir çözücü ile doldurulduklarında soğurma değerleri arasındaki fark 0,01 den büyük olmayan)
- 3.3. 25 mL'lik balon jöjeler
- 3.4. 45 cm uzunluğunda ve 35 mm çapında 10 mm'lik musluk çapına sahip kromatografik kolon

4. Reaktifler

- 4.1. Spektrofotometrik saflıkta izo-oktan (2.2.4-trimetilpentan) (Saf suya karşı spektrofotometrede 220 nm'de % 60'tan, 250 nm'de % 95'ten az olmayacak bir geçirgenliğe sahip) veya, Spektrofotometrik saflıkta sikloheksan (Saf suya karşı spektrofotometrede 220 nm.'de % 40'tan, 250 nm'de % 95'ten az olmayacak bir geçirgenliğe sahip)
- 4.2. Bazik alüminyum oksit (Bilgi/Açıklama I'de belirtildiği şekilde hazırlanarak kontrol edilen ve kolon kromatografisi için kullanılacak olan)
- 4.3. Kromatografik saflıktaki n-hekzan

5. Prosedür

- 5.1. Numune homojen olmalı ve herhangi bir safsızlık içermemelidir. Ortam sıcaklığında sıvı olan yağlar yaklaşık 30 °C'de süzgeç kâğıdından süzülmemelidir.
- 5.2. Yaklaşık 0,25 g numune hassas bir şekilde 25 mL'lik balon jöjeye tartılır. Belirtilen çözücü ile 25 mL'ye tamamlanır ve homojenize edilir. Elde edilen çözelti tamamen berrak olmalıdır. Eğer çözeltide opaklık veya bulanıklık varsa tekrar filtre edilmelidir.
- 5.3. Elde edilen bu çözelti küvete doldurulur ve yağ içeren bu çözeltinin soğurmaları spektrofotometrede 232-276 nm arasında uygun dalga boylarında saf çözücüye karşı ölçülür.
Ölçülen özgül soğurma değerleri 0,1-0,8 aralığında olmalıdır. Aksi takdirde, daha derişik veya daha seyreltik çözeltiler kullanılarak ölçümlerin mutlaka tekrarlanması gerekmektedir.
- 5.4. Numunenin bazik alüminyum oksit kolonundan geçirilmesi gerekiyorsa, natürel zeytinyağlarında saptanan özgül soğurma değeri limitin üzerindeyse, numunede özgül soğurmanın belirlenmesi için aşağıdaki işlemler uygulanır.
Hekzan içinde hazırlanan 30 g bazik alüminyum oksit kromatografi kolonuna boşaltılır. Bazik alüminyum oksit kolonun içerisinde çökeldikten sonra, hekzan fazı alüminyum oksit fazının 1 cm üzerinde olacak şekilde alttaki musluk yardımıyla ayarlanır.

6. Sonuçların hesaplanması

- 6.1. Çeşitli dalga boylarında aşağıdaki formülle hesaplanan özgül soğurmalar (soğurma katsayıları) kaydedilir:

$$K_{\lambda} = \frac{E_{\lambda}}{c \times s}$$

Burada:

- K_{λ} = λ dalga boyundaki özgül soğurma;
 E_{λ} = λ dalga boyunda ölçülen soğurma;
 c = Yağ çözeltisinin konsantrasyonu (g/100 mL)
 s = Kuvartz küvetin kalınlığı (cm)

Sonuçlar iki ondalıklı olarak ifade edilmelidir.

- 6.2. ΔE aşağıdaki formülle hesaplanır;

$$\Delta E = E_m - \frac{E_{m-4} + E_{m+4}}{2}$$

Burada;

E_m : m dalga boyunda özgül soğurma

Not: En yüksek özgül soğurma (E_m) için; izo-oktan kullanılıyorsa 268 nm'de, siklo-hekzan kullanılıyorsa 270 nm'de ölçüm yapılmalıdır.

BİLGİ/AÇIKLAMALAR-1

Bazik alüminyum oksidin hazırlanması ve aktivitesinin belirlenmesi

1. Bazik alüminyum oksidin hazırlanması

380-400 °C arasında üç saat boyunca bir fırında kurutulmuş olan bazik alüminyum oksit hava almayacak şekilde kapatılmış cam balona konulur. Her 100 g bazik alüminyum okside karşılık 5 mL saf su ilave edilir. Daha sonra cam balonun ağzı hemen kapatılır ve iyice çalkalanır. En az 12 saat dinlenmeye bırakılır.

2. Bazik alüminyum oksit aktivitesinin kontrol edilmesi

30 g bazik alüminyum oksit ile kromatografik kolon hazırlanır. Madde 5.4'te belirtildiği şekilde kolondan % 95'lik natürel zeytinyağı (özgül soğurması 268 nm dalga boyunda 0,18'den az olan) ve % 5'lik yer fıstığı yağı (özgül soğurması 268 nm dalga boyunda 4'ten az olan rafinasyon işlemleri sırasında ağartma toprağı ile muamele edilmiş) karışımı geçirilir.

Kolondan geçirildikten sonra karışımın 268 nm dalga boyunda ölçülen özgül soğurma değeri 0,11'den küçükse bazik alüminyum oksit kabul edilebilir özelliktedir. Bu değerden büyükse bazik alüminyum oksidin dehidrasyon derecesi mutlaka yükseltilmelidir.

BİLGİ/AÇIKLAMALAR-2

Spektrofotometrenin kalibrasyonu

1. Spektrofotometre belirli aralıklarla (en az altı ayda bir) hem dalga boyu tepkisi hem de tepkilerin doğruluğu açısından kontrol edilmelidir.
2. Dalga boyu bir cıva buhar lambası veya uygun filtreler vasıtasıyla kontrol edilebilir.
3. Fotosel ve fotoçoğaltıcıların tepkisini kontrol etmek için aşağıdaki işlemleri uygulanır.

0,2000 g saf potasyum kromat tartılır ve 1000 mL'lik balon joje içinde 0,05 N potasyum hidroksitle çözdürülerek 1000 mL ye tamamlanır. Elde edilen çözeltiden tam olarak 25 mL alınır ve 500 mL'lik balonjojeye aktarılır. Daha sonra 0,05 N potasyum hidroksitle 500 mL ye tamamlanır.

Elde edilen bu çözeltinin özgül soğurması 1 cm'lik bir küvet kullanılarak 275 nm'de potasyum hidroksit çözeltisine karşı (kör) ölçülür. Ölçülen soğurma değeri $0,200 \pm 0,005$ olmalıdır.

EK - 8A

Yağ Asitlerinin Metil Esterlerinin Gaz Kromatografisi İle Tayini

1. Kapsam

Bu yöntem Ek 9 B'de belirtilen yönteme uygun olarak elde edilen yağ asidi metil esterlerinin belirlenmesi prosedürünü tanımlar. Polimerize olmuş yağ asitleri için uygun değildir.

2. Reaktifler

2.1. Taşıyıcı gaz

İnert gaz (azot, helyum, argon, hidrojen, v.b. tam olarak kurutulmuş ve oksijen içeriği 10 mg/kg'dan az.)

Not 1: Sadece kapiler kolonlar için taşıyıcı gazı olarak kullanılan hidrojen gazı analiz hızını iki katına çıkarabilir. Zararlı olabileceğinden gerekli güvenlik önlemleri alınmalıdır.

2.2. Yardımcı gazlar

2.2.1. Kromatografik saflıkta hidrojen

2.2.2. Kromatografik saflıkta kuru hava

2.3. Referans standart

Saf yağ asitlerinin metil esterlerinin karışımı veya analiz edilecek yağ ile benzer özelliklere sahip, kompozisyonu bilinen bir yağın metil esterleri kullanılır.

Çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu önlemek için önlem alınmalıdır.

3. Cihaz ve malzemeler

3.1. Gaz kromatografi cihazı

3.1.1. Kolonlar için termostat kontrollü, $\pm 0,1$ °C hassasiyetle çalışabilen fırın

3.1.2. Split-splitless sisteme uygun liner içeren ve sıcaklığı ayarlanabilen enjeksiyon bloğu

3.1.3. Alev-iyonizasyon detektörü

3.1.4. Gerekli bilgisayar sistemi ve bilgisayar sistemine bağlı yazıcı

3.2. Uzunluğu en az 50 m, iç çapı 0,25 – 0,32 mm, film kalınlığı 0,10 – 0,30 μ m olan, genellikle sabit fazı poliglükol (poli(etilen glikol) 20,000), polyester (bütandiol polisüksinat) veya polar polisiloksan (siyanosilikonlar) olan kapiler kolonlar kullanılır. Sabit fazı çapraz bağlı olanlar uygundur.

Not 2: C18:3 ve C20 asitlerinin tanımlanması ve ayrılmasında polar polisiloksanların kullanımı bazı sorunlara neden olabilmektedir.

3.2.1. Kolonun şartlandırılması

Eğer kolon ilk kez kullanılacak ise şartlandırılmalıdır. Kolon, fırın sıcaklık programıyla ortam sıcaklığından başlayarak 3 °C/dk artacak şekilde kolonun dayanabildiği en yüksek sıcaklığın 10 °C altındaki sıcaklığa kadar artırılarak şartlanır. Şartlandırmaya, baseline herhangi bir pik olmaksızın doğrusal oluncaya kadar devam edilir, sapma göstermemelidir. Baseline doğrusal olduktan sonra bir saat bu sıcaklıkta tutulmalıdır. İzotermal koşullar altında çalışmak için fırın tekrar 180 °C'ye ayarlanır.

Not 3: Negatif doğrusal sapma : Kolon bağlantılarının doğru yapılmadığını gösterir.

Pozitif sapma : Kolonun yeterince şartlanmadığını gösterir.

3.3. Sertleştirilmiş iğneli 10 µL'lik gaz kromatografi enjektörü (0.1 µL taksimatlı)

4. Prosedür

4.1. Çalışma şartları

Çalışma şartları aşağıdaki şekildedir:

- Fırın sıcaklığı:
165 °C başlangıç sıcaklığında 15 dk bekletildikten sonra 5 °C/dk sıcaklık artışı ile 200 °C ye çıkarılır.
- Enjeksiyon sıcaklığı: 250 °C,
- Dedektör sıcaklığı: 260-280 °C,
- Taşıyıcı gazın akış hızı: 1,2 mL/dk (Analiz süresinin kısaltılması ya da daha belirgin ayırım yapılabilmesi için taşıyıcı gazın akış hızı ayarlanır.)
- Enjekte edilen madde miktarı: 1 µL

4.2. Numune miktarı

Ek 8B'ye göre hazırlanmış 0,1 – 0,2 µL metil ester çözeltisi kolona enjekte edilir.

Esterlerin çözeltinin içinde olmadığı durumda, kromatografik kalitedeki heptan içinde yaklaşık 100 mg/mL çözelti hazırlanır ve bu çözeltinin 0,1- 1 µL enjekte edilir.

İz miktardaki maddelerin analizi yapıldığında örnek miktarı 10 kata kadar arttırılabilir.

4.3. Analiz

Genel olarak çalışma şartları 4.1.'deki gibi olmalıdır.

Fırın sıcaklığı programlandıktan sonra tüm pikler çıkana kadar sabit sıcaklıkta ayırma devam edilir.

Not 4: Sıcaklık programı yoksa 100 - 195 °C arasındaki iki sabitlenmiş sıcaklık kullanılır.

Bu durumda, piklerin maskelenmediğinin doğrulanması için (C18:3 ve C20:0 veya konjuge C18:3 ve C18:2'nin eşzamanlı olarak bulunması gibi) numune analizinin farklı polaritede iki belirli fazda yapılması önerilir.

4.4. Referans kromatogramın ve referans grafiklerin hazırlanması

Numunenin çalışma şartlarıyla aynı şartlar altında referans standart karışımı analiz edilir ve yağ asitleri kompozisyonu için alıkonma süreleri veya alıkonma mesafeleri ölçülür. Alıkonma süresinin veya mesafesinin logaritmasını her doymamışlık derecesi için karbon atomu sayısının bir fonksiyonu olarak gösteren yarı logaritmik kâğıda işaretlenerek bir referans grafik elde edilir. İzotermal koşullarda aynı derecede doymamış olan düz zincirli asitler için grafikler düz çizgiler şeklinde olmalıdır. Bu çizgiler mümkün olduğunca paralel olmalıdır.

Piklerin maskelenmesine neden olacak koşullardan yani numunedeki iki bileşenin ayrıt edilemeyeceği durumlardan kaçınmak gerekir.

5. Sonuçların ifade edilmesi

5.1. Nitel analiz

Numunenin metil ester pikleri 4.4.'te hazırlanan grafiklerle tanımlanır, gerektiğinde interpolasyon yapılır.

5.2. Nicel analiz

5.2.1. Kompozisyonun belirlenmesi

İstisnai durumlar dışında toplam pik alanlarından numunenin yağ asitleri kompozisyonun bağıl yüzdeleri hesaplanır.

5.2.2. Hesaplama

Her bir yağ asidi yüzdesi, ilgili pik alanının yağ asitlerinin toplam pik alanına oranından hesaplanır.

$$\% i \text{ Yağ Asidi} = \frac{A_i}{\sum A} \times 100$$

Burada:

A_i = İlgili yağ asidine ait pikin alanı

ΣA = Tüm yağ asidi piklerinin alanlarının toplamı

Sonuçlar 2 ondalıklı olarak verilir.

Not 5: Buradaki bağıl alanlar temel alınarak yapılmış hesaplamaların sonuçlarının, kütlece yüzdeyi ifade ettiği kabul edilir. Bu varsayımın geçerli olmadığı durumlar için düzeltme faktörleri kullanılır.

5.2.2.1. Düzeltme faktörlerinin kullanılması

Karbon sayısı sekizden az olan yağ asitlerinin ya da ikincil gruplu asitlerin bulunması durumunda, özellikle yüksek derecede kesinlik istendiğinde, pik alanlarının yüzde oranlarını yağ asitlerinin kütlece yüzde oranlarına çevirmek için düzeltme faktörleri kullanılır.

Düzeltilme faktörleri, numuneye aynı koşullar altında kompozisyonu bilinen metil esterlerinin referans karışımının analiziyle elde edilen kromatogramı yardımıyla belirlenir.

Bu referans karışım için bileşen i 'nin kütlelerinin yüzde oranını aşağıdaki formülle bulunur:

$$\frac{m_i}{\sum m} \times 100$$

Burada:

m_i = Referans karışım içindeki yağ asidi i 'nin kütlesi

Σm = Referans karışımındaki değişik yağ asitlerinin kütleleri toplamı

Referans karışım kromatogramından elde edilen yağ asidi i 'nin yüzde oranı (alan/alan) aşağıdaki gibi hesaplanır:

$$\frac{A_i}{\sum A} \times 100$$

Burada:

A_i = Yağ asidi i 'ye karşılık gelen pikin alanı

ΣA = Tüm yağ asidi piklerinin toplam alanı

Bunu takiben düzeltme faktörü aşağıdaki gibi hesaplanır:

$$E_i = \frac{m_i \times \sum A}{A_i \times \sum m}$$

Genellikle düzeltme faktörleri E_{C16} 'yla göreceli olarak ifade edilir, göreceli faktörler aşağıdaki gibi hesaplanır:

$$E'_i = \frac{E_i}{E_{C16}}$$

Numunedeki her yağ asidi i 'nin içeriği, metil esterlerin kütlece yüzdesi olarak ifade edilir:

$$\frac{E'_i \times A_i}{\sum (E'_i \times A_i)} \times 100$$

Sonuçlar 2 ondalıklı olarak verilir.

5.2.2.2. İç standardın kullanılması

Bazı analizlerde (örneğin tüm yağ asitlerinin ölçülmemiş olduğu ve özellikle 4 ve 6 karbonlu asitlerin 16 ve 18 karbonlu asitlerle birlikte bulunduğu veya numunenin içindeki yağ asidinin tam miktarının belirlenmesinin önemli olduğu durumlarda) iç standart kullanılması gerekir. İç standart olarak 5, 17 veya 18 karbonlu yağ asitleri sıklıkla kullanılır. Eğer varsa düzeltme faktörü kullanılarak hesaplama yapılmalıdır.

Bileşen i 'nin metil esterler olarak ifade edilen kütlece yüzdesi aşağıdaki formülle hesaplanır.

$$\frac{m_s \times E'_i \times A_i}{m \times E'_s \times A_s} \times 100$$

Burada:

A_i = Yağ asidi i 'nin pik alanı;

A_s = İç standardın pik alanı;

E'_i = Yağ asidi i için düzeltme faktörü (E_{C16} 'ya göre);

E'_s = İç standart için düzeltme faktörü (E_{C16} 'ya göre);

m = Numunenin mg cinsinden kütlesi;

m_s = İç standardın mg cinsinden kütlesi

Sonuçlar 2 ondalıklı olarak verilir.

6. Trans-izomerlerin analizi

Karbon sayısı 10 – 24 arasındaki yağ asitlerinin trans-izomer miktarlarının belirli polaritedeki kapiler kolonlar kullanılarak tespit edilmesi mümkündür.

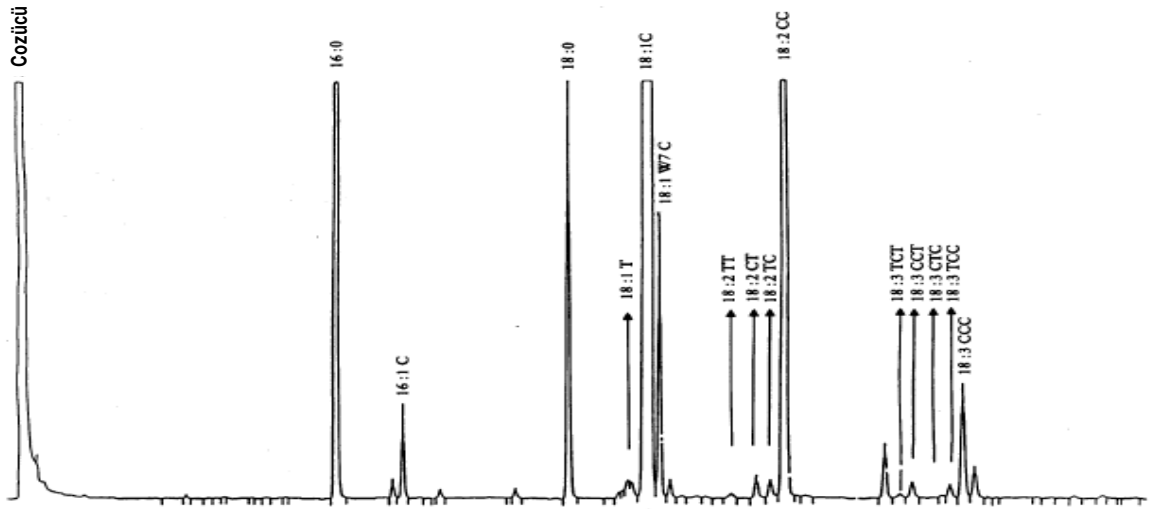
- 6.1. Uzunluğu 50 m, iç çapı 0,25 – 0,32 mm, film kalınlığı 0,10 – 0,30 µm olan, siyanopropisilikon ile kaplanmış (SP 2380, C.P. sil 88, silor 10 veya eşdeğeri) silikadan yapılmış kapiler kolon.
- 6.2. Metil esterler Ek 9B'de belirtilen prosedür ile hazırlanır. Serbest yağ asitliği % 3'ün üzerinde olan numuneler Ek 7 fıkra 5.1 uyarınca nötralize edilmelidir.
- 6.3. Çalışma şartları
 - Fırın sıcaklığı: 150 °C - 230 °C (örneğin; 165 °C başlangıç sıcaklığında 15 dk beklendikten sonra 5 °C/dk sıcaklık artışı ile 200 °C ye çıkarılır.)
 - Enjektör sıcaklığı:
split sistem kullanılıyorsa 250 °C,
kolona doğrudan enjeksiyon (on-column) sistemi kullanılıyorsa kolonun başlangıç sıcaklığı;
 - Detektör sıcaklığı: 260 °C
 - Taşıyıcı gaz (helyum) akış hızı 1,2 mL/dk (veya hidrojen)

Enjekte edilen miktar, hassas şartlar altında C20 metil esteri piki tüm skalanın % 20'sine eşit ya da daha fazla olacak şekilde ayarlanmalıdır.

6.4. Her bir pikin tanımlanması, alıkonma zamanları ve aynı koşullar altında analiz edilen referans karışımlarının alıkonma zamanlarının karşılaştırılmasıyla yapılır.

Trans yağ asitleri aynı yağ asidinin cis izomerlerden önce çıkar.

Örnek kromatogram Şekil 1'de verilmiştir.



Şekil 1

Yağ asitlerinin trans-izomerlerinin kromatogramı (kapiler kolon kullanılarak)

6.5. Çeşitli trans yağ asitlerinin yüzdeleri ilgili pikin alanı ile mevcut diğer tüm pik alanları toplamları arasındaki ilişki temel alınarak hesaplanır.

Aşağıdaki yüzdelere dikkate alınmalıdır;

- transoleik izomerlerin toplamı olarak TGK-Zeytinyağı ve Pirina Yağı Tebliği'nin Ek-1'inde yer alan trans oktadekenoik asitlerin yüzdesi (T 18:1);
- translinoleik izomerlerin toplamı olarak TGK-Zeytinyağı ve Pirina Yağı Tebliği'nin Ek-1'inde yer alan cis-trans ve trans-cis oktadekadienoik asitlerin yüzdesi [(CT/TC) 18:2];
- translinolenik izomerlerin toplamı olarak TGK-Zeytinyağı ve Pirina Yağı Tebliği'nin Ek-1'inde yer alan trans-cis-trans, cis-cis-trans, cis-trans-cis, trans-cis-cis, oktadekatrienoik asitlerin yüzdesi [(TCT+CCT+CTC+TCC) 18:3].

Not 6: Sonuçlar 3 ondalık olarak verilir.

EK - 8B

Yağ Asitlerinin Metil Esterlerinin Hazırlanması

Yağ asitleri metil esterlerini hazırlamak için aşağıdaki iki yöntemden biri kullanılır

- Metot A: Potasyum hidroksitin soğuk metanolik çözeltisi ile trans-esterifikasyon
- Metot B: Metanol içinde sodyum metilat aracılığıyla ısıtılarak metillendirme ve bunu takiben asit ortamında esterifikasyon.

Her bir metot aşağıda belirtilen yağ kategorilerine ve belirlenecek olan analitik parametreye göre uygulanır:

- (a) Gerçek ve teorik ECN42 trigliserid içerikleri arasındaki farkının (Δ ECN42) hesaplanması:
- Metot A tüm yağ kategorilerindeki numunelere uygulanır. (silikajel kolonun içerisinden geçirilerek saflaştırıldıktan sonra)
- (b) Yağ asidi kompozisyonunun saptanması:
- Metot A aşağıdaki yağ kategorilerindeki numunelere doğrudan uygulanır:
 - serbest yağ asitliği % 3,3'ten az olan natürel zeytinyağları,
 - rafine zeytinyağı,
 - riviera
 - rafine pirina yağı,
 - pirina yağı
 - Metot B aşağıdaki yağ kategorilerindeki numunelere doğrudan uygulanır:
 - serbest yağ asitliği % 3,3'ten fazla olan natürel zeytinyağları,
 - ham pirina yağı;
- (c) Yağ asitlerinin trans-izomerlerinin saptanması:
- Metot A aşağıdaki yağ kategorilerindeki numunelere doğrudan uygulanır:
 - serbest yağ asitliği % 3,3'ten az olan natürel zeytinyağları,
 - rafine zeytinyağı,
 - riviera
 - rafine pirina yağı,
 - pirina yağı
 - Metot B tüm yağ kategorilerindeki numunelere uygulanır. (silikajel kolonun içerisinden geçirilerek saflaştırıldıktan sonra)
 - serbest yağ asitliği % 3,3'ten fazla olan natürel zeytinyağları,
 - ham pirina yağı;

Yağ Numunelerinin Saflaştırılması

Gerektiğinde, numuneler IUPAC 2.507 sayılı yöntemde tarif edilen şekilde bir silikajel kolonun içinden geçirilerek, hekzan/dietil eterle (87:13, v/v) süzülüp saflaştırılır.

Buna alternatif olarak silikajel fazlı katı-faz ekstraksiyon kartuşları (SPE) kullanılabilir. Silikajel kartuş (1 g, 6 mL) vakumlu süzme sistemine yerleştirilerek 6 mL hekzan ile yıkanır. Kolonun kurumasını önlemek için vakum serbest bırakılır ve bunu takiben 0,5 mL hekzan içerisinde yağ (0,12 g kadar) çözeltisi kolonun içine konular ve vakumlanır. Çözelti vakum altında 10 mL hekzan/dietil eter (87:13 v/v) ile süzülür. Toplanan süzüntü homojenize edilir ve iki eşit hacme bölünür ve vakumlu döner buharlaştırıcıda uçurulur. Bunlardan biri GC için diğeri HPLC için hazırlanır.

GC için: Pirina yağı 1 mL heptan içerisinde çözünür ve çözelti GC ile yağ asidi analizine hazır hale gelir.

HPLC için: Pirina yağı 1 mL aseton içerisinde çözünür ve çözelti HPLC ile trigliserid analizine hazır hale gelir.

Yağ Asidi Metil Esterlerini Hazırlama Metotları

1. *Metot A: Potasyum hidroksitin soğuk metanollü çözeltisi ile trans-esterifikasyonu*

1.1. Kapsam

Bu metot zeytinyağlarına ve serbest yağ asitliği % 3,3'ten az olan pirina yağlarına uygulanır. Serbest yağ asitleri potasyum hidroksit ile esterifiye edilemezler. Yağ asitlerinin etil esterleri, gliseridik esterlerden daha düşük oranda trans-esterifiye olurlar ve sadece kısmi olarak metillendirilebilirler.

1.2. PrensiP

Bu metot, sabunlaşma meydana gelmeden önce ara bir aşama olarak metil esterlerin metanollü potasyum hidroksit ile trans-esterifikasyonu ile oluşması prensibine dayanır.

1.3. Reaktifler

% 0.5'ten (m/m) fazla su içermeyen metanol

Kromatografik saflıkta heptan.

2 N metanollü potasyum hidroksit çözeltisi

1.4. Malzemeler

Kapaklı deney tüpleri (5 mL'lik).

Derecelendirilmiş veya otomatik pipetler (2 mL ve 0,2 mL)

1.5. Prosedür

5 mL'lik kapaklı deney tüpünün içerisine 0,1 g yağ numunesi tartılır. 2 mL heptan ilave edilir ve çalkalanır. 0,2 mL 2 N metanollü potasyum hidroksit çözeltisi eklenir, kapağı sıkıca kapatılıp 30 saniye kuvvetlice çalkalanır. Üst faz berraklaşana kadar bekletilir. Metil esterleri içeren üst fazı ayrılır. Heptan çözeltisi kromatografik analize kadar buzdolabında saklanmalıdır. Çözelti 12 saat içinde kullanılmalıdır.

2. *Metot B: Metanol içinde sodyum metilat aracılığıyla ısıtılarak metillendirilmesi ve bunu takiben asit ortamda esterifikasyonu*

2.1. Kapsam

Bu metot zeytinyağlarına ve serbest yağ asitliği % 3,3'ten fazla olan pirina yağlarına uygulanır.

2.2. PrensiP

Bu yöntemin prensibi serbest yağ asitlerinin nötralizasyonu ve gliseridlerin metillendirilmesine ve bunu takiben yağ asitlerinin asit ortamda esterifikasyonuna dayanır (IUPAC yöntem 2.301 başlık 4.2).

2.3. Reaktifler

- kromatografik saflıkta heptan
- su içeriği % 0,05'ten (m/m) az olan metanol
- 0.2 N metanolü sodyum metilat çözeltisi
- % 0.2 lik metanollü fenolftalein çözeltisi
- 1 N metanollü sülfürik asit çözeltisi (100 mL metanole 3 mL % 96'lık sülfürik asit eklenir)
- doygun sodyum klorür çözeltisi

2.4. Malzemeler

- 50 mL'lik şilifli balon
- geri soğutucu
- kaynama taşları
- cam huni

2.5. Prosedür

0,25 g yağ numunesi 50 mL'lik şilifli balona tartılır, 10 mL 0,2 N metanollü sodyum metilat ve kaynama taşları ilave edilir. Geri soğutucuya takılır, çalkalanır ve kaynama noktasına getirilir. Çözelti 10 dakika içerisinde şeffaf hale gelir. Bu tepkime 15 dakika içerisinde tamamlanır. Balon ısıtıcıdan alınır, geriye akış sonlanana kadar beklenir, soğutucu çıkarılır ve iki damla fenolftalein çözeltisi ilave edilir. Çözelti renksiz olana kadar birkaç mL 1 N metanollü sülfürik asit ilave edilir ve üzerine 1 mL daha fazladan eklenir. Soğutucu takılır ve 20 dakika tekrar kaynatılır. Isıtıcıdan alınır ve balon akan su altında soğutulur. Soğutucu çıkarılır ve 20 mL doymuş sodyum klorür çözeltisi ilave edilir ve çalkalanır. 5 mL heptan ilave edilir, balonun ağzı kapatılır ve 15 saniye boyunca kuvvetlice çalkalanır.

Faz ayrımı için beklenir. Sulu faz, balon boyununun alt noktasına gelene kadar doymuş sodyum klorür çözeltisi ilave edilir. Balonunun boyun kısmında yer alan faz metil ester içermektedir. Bu çözelti GC'ye enjekte edilmeye hazırdır.

Dikkat: Metot B ile metillendirme mutlaka bir çeker ocak altında yapılmalıdır.

2.6. Metot B ile metillendirmeye alternatifler

2.6.1. Metot C

2.6.1.1. Prensip

Bu metot, numunenin metanol-hidroklorik asit ile ağzı kapalı vialde 100 °C'de metillendirilmesine dayanır.

2.6.1.2. Malzemeler

- 5 mL'lik dayanıklı cam vial (40- 45 mm yüksekliğinde, 14-16 mm çapında).
- 1 ve 2 mL'lik pipetler.

2.6.1.3. Reaktifler

Hidroklorik asitin % 2'lik metanollü çözeltisi (Çözelti, gaz halindeki hidroklorik asit ve susuz metanolden hazırlanır (Not 1)).

Kromatografik saflıkta hekzan

2.6.1.4. Prosedür

- Daha önceden sodyum sülfatla kurutulmuş ve filtre edilmiş olan 0,2 g yağ ve 2 mL hidroklorik asit-metanol çözeltisi cam vialde konulur. Kapağı kapatılır.
- Vial 100 °C'de 40 dk tutulur.
- Vial akan su altında soğutulur, kapağı açılır ve 2 mL saf su ve 1 mL hekzan ilave edilir.
- Santrifüjlenir ve hekzan fazı GC'de analiz edilmek üzere alınır.

2.6.2. Metot D

2.6.2.1. Prensip

Bu metot, numunenin geri soğutucu altında metanol–hekzan–sülfürik asit ile ısıtılarak metillendirilmesi ve bu esterlerin petrol eteri ile ekstraksiyonu prensibine dayanır.

2.6.2.2. Cihaz ve malzemeler

- Ortalama 1 m uzunluğunda hava soğutmalı yoğuşturucuya bağlanabilen, cam eklem yeri olan 20 mL'lik deney tüpü
- 5 mL'lik pipet.
- 50 mL'lik ayırma hunisi
- 10 mL'lik ve 25 mL'lik beher
- 15 mL'lik konik tabanlı deney tüpü

2.6.2.3. Reaktifler

- Metillendirme reaktifi: 75:25:1 oranında (v/v/v) susuz metanol–hekzan–konsantre sülfürik asit (p = 1.84)
- Petrol eteri
- Susuz sodyum sülfat

2.6.2.4. Prosedür

0,1 g yağ 20 mL'lik deney tüpünün içerisine konular ve 5 mL metillendirme reaktifi ilave edilir.

Geri soğutucuya yerleştirilir ve kaynayan su banyosunda 30 dakika ısıtılır (Not 1).

Miktarı bilinen karışım, 10 mL saf su ve 10 mL petrol eterinin yardımıyla 50 mL'lik ayırma hunisine konular. Kuvvetlice çalkalanır ve faz ayrımı beklenir. Sulu faz atılır ve eter fazı iki defa 20 mL saf su ile yıkanır. Ayırma hunisine az miktarda susuz sodyum sülfat ilave edilir ve çalkalanır. Birkaç dakika çökmesini bekledikten sonra filtre edilir ve süzöntü 15 mL'lik konik tabanlı deney tüpünde toplanır.

Çözeltili su banyosunda azot gazıyla uçurular.

Not 1: Kaynamayı kontrol etmek için, deney tüpünün içerisine cam baget konular ve su banyosunun sıcaklığı 90 °C'de tutulur.

3. Kesinlik parametreleri

A ve B yöntemlerinin kesinliğinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi Uluslararası Zeytin Konseyi tarafından COI/T.20/CO.24 sayılı yöntemi aracılığıyla yayınlanmıştır.

Zeytinyağı Ve Pirina Yağından Yağ Asidi Esterleri Gaz Kromatografisi Analizi İçin Öneriler

1. Prosedür

Heptan içerisindeki yağ asidi metil esterleri çözeltilisinin kromatografik analizleri ISO-5508 standardına uygun olarak kapiler kolon kullanılarak (uzunluğu 50 m ve iç çapı 0,25 mm veya 0,32 mm) siyanopropilsilikon fazı ile yağ asitlerinin trans-izomerlerinin saptanması yöntemi ile gerçekleştirilir (COI/T.20/Doc. no.17).

Şekil 2'de pirina yağının yağ asitleri metil ve etil esterleri ve metil esterlerin trans-izomerlerini içeren tipik kromatogramı verilmektedir

2. Hesaplamalar

2.1. Yağ asidi kompozisyonu ve Δ ECN42'nin hesaplamaları için aşağıdaki yağ asitleri dikkate alınacaktır:

Miristik (C14:0)

Palmitik (C16:0) Metil ve etil estere karşılık gelen tüm piklerin toplamı.

Palmitoleik (C16:1) Metil ester ω 9 ve ω 7 izomerlerine karşılık gelen tüm piklerin alanlarının toplamı.

Heptadekanoik / Margarik (C17:0)

Heptadesenoik / Margoleik (C17:1)

Stearik (C18:0)

Oleik (C18:1) Metil ester ω 9 ve ω 7 izomerleri, etil ester, metil esterlerin trans-izomerlerine karşılık gelen tüm piklerin alanlarının toplamı.

Linoleik (C18:2) Metil ve etil esterlerin ve metil esterlerin trans-izomerlerine karşılık gelen tüm piklerin alanlarının toplamı.

Araşidik (C20:0).

Linolenik (C18:3). Metil ester ve metil esterleri trans-izomerlerinin piklerinin alanlarının toplamı.

Eikosenoik (C20:1).

Behenik (C22:0).

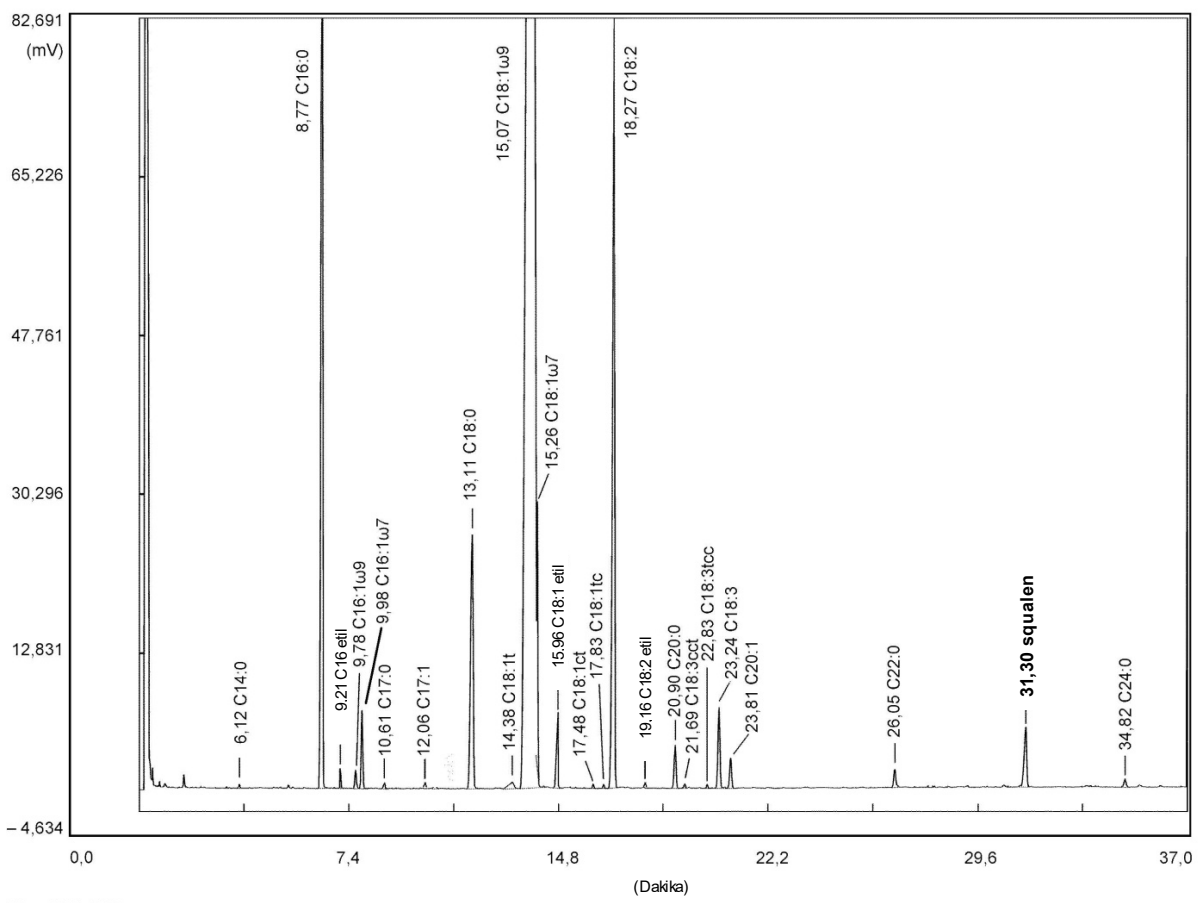
Lignoserik (C24:0).

Toplam alanın hesaplanmasında squalen alanı dikkate alınmamalıdır.

- 2.2 Trans-C18:1 yüzdelерinin hesaplanması için bu yağ asidinin metil esterlerine karşılık gelen pik kullanılmalıdır. [trans-C18:2 + trans-C18:3] toplamı için bu asitlerin trans-izomerlerine karşılık gelen tüm piklerin toplamı alınmalıdır. Toplam alanın hesaplanması için 2.1'de belirtilen tüm pikler dikkate alınmalıdır (COI/T.20/Doc. No. 17).

Her yağ asidinin yüzdesi aşağıdaki formüle göre hesaplanır:

$$\%X = \frac{\text{Alan}(X) \times 100}{\text{toplam alan}}$$



Şekil 2

Soğuk metilasyon metodu uygulanan pirina yağı kromatogram
(Başka şekilde belirtilmediği takdirde pikler metil ve etil esterlere karşılık gelir)

EK - 9

Uçucu Halojene Çözücülerin Tayini

1. Kapsam ve prensip

Bu metot zeytinyağında halojene çözücülerin miktarının tayinini kapsar.

Metodun prensibi zeytinyağlarında tetrakloroetilen miktarının tespitine dayanır. Aynı metotla 1,1,1 trikloroetan, dibromoklorometan ve bromoform da tespit edilebilir.

2. Cihaz ve malzemeler:

- 2.1. Elektron yakalama detektörlü (ECD) gaz kromatografi cihazı
- 2.2. Head space cihazı
- 2.3. Kapiler kolon, uzunluğu 25-50 m iç çapı 0,25-0,35 mm (SE 52/54 veya eşdeğeri)
- 2.4. Taşıyıcı ve yardımcı gaz: Kromatografik saflıkta azot
- 2.5. 10-15 mL'lik cam balon, teflon kaplanmış ve enjektör girişine uygun alüminyum tıpa
- 2.6. Hermetik mühürleme aleti
- 2.7. 0,5-2 mL'lik enjektör
- 2.8. 20 mL'lik HS vialleri
- 2.9. 1µL ve 5µL'lik enjektör
- 2.10. 40 µL'lik pipet veya enjektör

3. Reaktifler

- Kromatografik saflıkta halojene çözücü standartları: tetra kloretilen, kloroform, karbon tetra klorür, dikloretilen, diklorometan, 1,2 dikloreten'dir.

Standart çözeltilerin hazırlanışı; Belirli miktarlarda (1-2 g) alınan halojen standartları 100mL balon jöje içinde karışım standardı olarak DMA ile 1/20 ve 1/100'lük seyreltilerek analize uygun stok konsantrasyonlar elde edilir. Kalibrasyon eğrisini çizmek için halojen içermeyen 2 g rafine zeytinyağı (kör) üzerine konsantrasyonları 0,05-0,1-0,2 ppm olacak şekilde stok halojen standartlar eklenir. Cihaza tek tek enjekte edilen ve göreceli alıkonma zamanları tespit edilmiş halojen bileşiklerin konsantrasyonları yardımıyla numunede bulunan pikler tespit edilir.

4. Prosedür

- 4.1. Cam balona yaklaşık 2 g yağ tartılır ve hermetik olarak kapatılır. 70 °C'de 1 saat ısıtılır. Bir enjektör kullanılarak 0,2-0,5 mL dikkatlice head space'e verilir. Gaz kromatografi cihazı aşağıdaki koşullara ayarlanır:
 - Enjektör sıcaklığı: 150 °C
 - Fırın sıcaklığı : 65 °C'de 8 dk bekletilir ve daha sonra 3 °C /dk hızla 85 °C'ye getirilir.
 - Detektör sıcaklığı: 350 °C(Sıcaklıklar, elde edilen sonuçlara göre ayarlanabilir.)
- 4.2. Refereans çözelti: Rafine zeytinyağı, kalıntı bulunmayan çözücü ile 0,05-1ppm konsantrasyonunda (numunede tahmin edilen kalıntı dikkate alınarak) hazırlanır.
- 4.3. Kantitatif değerlendirme: Numunedeki pik yüksekliği, standart çözeltideki pik yüksekliği ile karşılaştırılır. Eğer sapma %10'dan büyükse standart sapma %10'u geçmeyecek şekilde standart yeniden hazırlanarak tekrar numune enjekte edilmeli ve ortalaması alınmalıdır.
- 4.4. Sonuçların gösterilmesi: Halojene çözücülerin toplamı ppm(mg/kg) olarak ifade edilir. Bu metodun tespit limiti; 0,01mg/kg'dır.

EK - 10

Natürel Zeytinyağlarına Ait Duyusal Özelliklerin Tespiti

1. Amaç ve kapsam

Bu metodun amacı, natürel zeytinyağının lezzet karakteristiklerini değerlendirmek için ihtiyaç duyulan kriterleri saptamak ve sınıflandırması için metodolojiyi geliştirmektir.

2. Uygulama alanı

Metot; bir panelde seçilen bir tadımcı grubuna natürel zeytinyağının sınıflandırılması ve zeytinyağının kusurlarının şiddetine, aromasına (meyvemsi) ve diğer pozitif özelliklerine göre derecelendirilmesinin belirlenmesinde ne tür uygulamalar yapılacağını tarif eder.

Tadım panelistlerinin seçimi ve eğitimi ile tadım odaları ve tadım bardaklarının seçiminde uluslararası standartlar kullanılmalıdır.

3. Özel terimler

3.1. Pozitif özellikler

- *Meyvemsi*: Zeytinin çeşidine bağlı olarak sağlıklı, taze, yeşil ya da olgun meyveden elde edilen yağın algılanan karakteristik meyvemsi aroması

Yağ yeşil zeytinden elde edilmiş ise aroma yeşil meyveyi anımsatır.

Yağ olgun zeytinden elde edilmiş ise aroma yeşil ve olgun meyveyi birlikte anımsatır.

- *Acılık*: Yeşil zeytinden veya rengi dönük zeytinlerden üretilmiş yağın karakteristik ilk tadıdır. Dilin "V" bölgesindeki tat alma hücreleri ile bulunur.

- *Yakıcılık*: Yağın duyuşsal karakteristiğı olan yakma hissidir.

Çoğunlukla mevsimin başlangıcında hala yeşil olan zeytinlerden üretilen yağlarda hissedilir. Bu his, tüm ağız boşluğunda algılanabilir, özellikle boğazda hissedilir.

3.2. Kusurlar

- *Kızışma-çamurlu tortu*:

Kızışma; yığın olarak saklanan veya depolanan zeytinlerden üretilen yağların, anaerobik fermantasyonun ileri safhalarındaki zeytinlerden üretilen yağların,

Çamurlu tortu; depolama tanklarının ya da fiçilerin dibinde biriken tortuyla temasta bırakılan yağların karakteristik tat ve kokusunu tanımlar

- *Küflü-rutubetli*: Nemli koşullarda uzun süreli depolama sonucunda çok sayıda küf ve mayanın gelişmiş olduğu meyvelerden üretilen yağın karakteristik tat ve kokusu.

- *Şarabımsı-sirkemsi/asidik-ekşimsi*: Belirli yağların şarap veya sirkeyi hatırlatan karakteristik tat ve kokusu.

Bu tat ve koku, esas olarak zeytinlerdeki, asetik asit, etil asetat ve etanol oluşumuna yol açan fermantasyon sürecinden kaynaklanır. Bu tat ve koku zeytinlerin veya zeytin hamurunun bastırılmasında kullanılan hasırların iyi temizlenmemesi nedeniyle elde edilen yağın aerobik fermantasyonundan kaynaklanır.

- *Metalik*: Metal tadı

Bu tat zeytinin ya da yağın; ezme, karıştırma, presleme veya depolama esnasında metalik yüzeylerle uzun süreli temasta bulunmasından kaynaklanır.

- *Ransid*: Şiddetli bir oksidasyon sürecine maruz kalan yağın karakteristik tat ve kokusudur.

- *Isıtılmış veya yanmış*: Isıtma işleminin yüksek sıcaklıkta ve/veya uzun süreli uygulanması sonucu oluşan karakteristik tat ve koku.

Bu durum, özellikle karıştırma sırasında hamur sıcaklığının yüksek olması sonucu oluşur.

- *Samansı-odunsu*: Kurumuş zeytinlerden üretilmiş yağların karakteristik tadı.

- *Kaba*: Bazı eski yağların ağızda yarattığı kalın, macunsu his.

- *Makine yağı*: Yağın, mazot, makine yağı veya mineral yağı anımsatan tadı.

- *Karasu*: Yağın, karasu ile uzun süreli teması sonucu fermente olmasından kaynaklanan tat.

- *Salamura*: Salamura zeytinlerden elde edilmiş yağın tadı.

- *Hasırımı*: Yeni hasırlara bastırılmış zeytinlerden elde edilen yağın karakteristik tadı.

Bu tat, hasırların yeşil veya kurutulmuş ottan yapılmış olmasına bağlı olarak değişebilir.

- *Topraksı*: Topraklı veya çamurlu olarak toplanmış ve uygun şekilde yıkanmamış zeytinlerden elde edilmiş yağın tadı.

- *Kurtlu*: Zeytin sineği (*Bactrocera oleae*) kurtlarının yoğun zararına uğramış zeytinlerden elde edilen yağın tadı.

- *Salatalık*: Yağın, özellikle hava geçirmez teneke kaplarda çok uzun süre depolanması sonucu oluşan 2-6 nonadienalden kaynaklanan tat.

- *Islak odun*: Don zararına uğramış zeytinlerden elde edilmiş yağın tadı.

3.3. Etiketleme için terminoloji

Panel başkanı, talep edildiğinde yoğunluk ve hissedilen özelliklere göre aşağıdaki sıfatlara karşılık gelen tanım ve aralıklara uyan yağları sertifikalandırabilir.

a) Madde 3.1 de bahsedilen her bir pozitif özellik (meyvemsi-yeşil veya olgun-yakıcı veya acı):

(i) *Yoğun*: medyan değeri 6'dan büyük olduğunda kullanılabilir.

(ii) *Orta*: medyan değeri 3-6 olduğunda kullanılabilir.

(iii) *Hafif*: medyan değeri 3'ten az olduğunda kullanılabilir.

(iv) Sorgulanan özelliğin yukarıdaki sıfatlarla ifade edilemediği ve medyan değeri 3 veya daha fazla olması durumunda (i), (ii), (iii) maddelerindeki sıfatlar olmadan ifade edilebilir.

b) *Dengeli*: Yağın verdiği koku, tat ve his özellikleri bakımından acı ve/veya yakıcı özelliği medyanı, meyvemsi özelliği medyanının 2 puan üstünde olduğu durumda kullanılabilir.

c) *Yumuşak yağ*: Acı ve yakıcılık özellikleri medyanlarının 2 veya daha az olması durumunda kullanılır.

4. Panel

Bir panel, panel başkanı ve 8-12 tadımcıdan oluşur.

Panel başkanı; yağ türleri konusunda uygun eğitim almış bir uzman olmalıdır ve panelin organizasyonundan ve işleyişinden (numunelerin hazırlanması, kodlanması, tadımcılara sunulması, verilerin toplanması ve işlenmesi) sorumludur.

Panel başkanı duyu analizlerde temel eğitimi almış tadımcılar arasından panel grubunu oluşturur performanslarının standartlara uygunluğunu değerlendirir.

Tadımcılar benzer numuneler arasındaki farkları ayırt edebilme becerilerine göre değerlendirilmelidir ve uluslararası kabul görmüş metotlara göre eğitilmiş olmalıdırlar.

5. Prosedür

5.1. Profil kâğıdının tadımcılar tarafından kullanımı

Tadımcılar tarafından kullanımı amaçlanan profil kağıdı Şekil 1'de yer almaktadır.

- Paneldeki her bir tadımcı, tadım bardağındaki yağı, önce koklar⁽¹⁾, daha sonra tadar, sonra negatif ve pozitif özelliklerin her biri için algıladığı yoğunluğu profil kağıdındaki 10 cm'lik skalaya işaretler. Tadımcı meyvemliliği yeşil veya olgun olarak algıladığında, profil kağıdındaki ilgili kutucuğu işaretler.

- Eğer tadımcı, profil kağıdında verilmemiş herhangi bir kusur algılayacak olursa, bunları "diğerleri" başlığı altına, metodun 3.2. bölümünde tanımlananlar arasından özellikleri en doğru tarif eden terim veya terimleri kullanarak kaydeder.

5.2. Verilerin panel başkanı tarafından işlenmesi

- Panel başkanı, her bir tadımcı tarafından doldurulan profil kağıdını toplar ve kaydedilen yoğunlukları gözden geçirir. Herhangi bir anormallik gözlemediğinde, tadımcıyı profil kağıdını revize etmeye ve eğer gerekliyse, testi tekrar etmeye davet eder.

- Panel başkanı her bir tadımcının verilerini, bilgi/açıklama bölümünde belirtilen hesaplamaları yapmak amacıyla bilgisayar programına kaydeder. Belirli bir numune hakkındaki veriler kullanılarak, 9 duyu özellikleri temsil eden 9 sütundan ve her bir tadımcı için bir satırdan oluşan tablo oluşturulur.

- Eğer bir kusur, panelin en azından %50'si tarafından "diğerleri" başlığı altına girilmişse, panel başkanı negatif özelliğin medyanını hesaplar ve karşılık gelen sınıflandırmayı belirler.

- İncelenecek yağın 3.3(a)'daki meyvemsi özelliği yeşil ve olgun terimlerinin tadımcıların en az %50 si tarafından tespit edilmesi sonucunda yağın özellikleri panel başkanı tarafından onaylanır.

- Normal koşullarda duyuusal analiz bir defa yapılması yeterlidir ancak, çelişkili değerlendirmeler olduğu taktirde panel başkanı duyuusal analizi tekrarlatmalıdır. Çelişkili değerlendirmeyi doğrulamak için üçüncü kez duyuusal analiz yapılmalıdır. Bu durumda özelliğin medyanı medyanların ortalamalarından hesaplanmalıdır. Tekrarlanan testler farklı oturularda yapılmalıdır.

5.3. Yağın derecelendirilmesi

Yağ, kusurların medyanı ve meyvemsiliğin medyanı ile birlikte aşağıdaki gibi derecelendirilir. En yoğun şekilde hissedilen kusurun medyanı kusurların medyanı olarak belirlenir. Kusurların ve meyvemsiliğin medyanı bir ondalık sayı şeklinde verilir ve belirlenen standart sapma % 20' den daha büyük olmamalıdır.

Yağ aşağıda verilen referans aralıklara göre kusurların medyanı ve meyvemsiliğin medyanları karşılaştırılarak derecelendirilir. Bu aralıkların limitleri belirlenirken hesaplanan metodun hatası, sonucun kesin olması için dikkate alınmalıdır. İstatistiksel bir tablo veya bir grafik kullanılan bilgisayar programları derecelendirmenin görsel hale gelmesini sağlar.

a) Sızma Zeytinyağı: Kusurların medyanı 0' dır ve meyvemsiliğin medyanı 0'ın üzerindedir.

b) Natürel Birinci Zeytinyağı: Kusurların medyanı 0-3,5 arasındadır ve meyvemsiliğin medyanı 0'ın üzerindedir.

5.4. Özel durum

Eğer diğer pozitif özelliklerin medyanı meyvemsiliğin medyanı olan 5' den büyükse, Panel başkanı bu değeri analiz sertifikasında belirtmelidir.

(1) Tadımcı yağı kokladığında aşın derecede yoğun bir kusur tespit ederse tadıma devam etmeyebilir ancak bunu profil kağına not etmelidir.

şekil 1

Profil Kâğı

KUSURLARIN ALGILANMA YOğUNLUğU:

Kızışma/Çamurlu tortu -----

Küflü-rutubetli -----

şarabımsı-sirkemsi/asidik-ekşimsi -----

Metalik -----

Ransid -----

Diğerleri (belirtiniz) -----

POZİTİF ÖZELLİKLERİN ALGILANMA YOĞUNLUĞU:

Meyvemsi -----
yeşil olgun

Acılık -----

Yakıcılık -----

Tadımcının adı: -----

Numune kodu: -----

Tarih: -----

Yorumlar:

BİLGİ/AÇIKLAMALAR

Medyanın ve Güven Aralıklarının Hesaplanma Yöntemi

Medyan

$$Me = [P(X < Xm) \leq \frac{1}{2} \wedge P(X \leq Xm) \geq \frac{1}{2}]$$

X_m medyan gerçek sayısı olarak tanımlanır. X_m ; 0,5'ten daha az olmayan X_m sayısının üzerinde olmayan X dağılım değerlerinin eş zamanlı olasılığı (P) ve 0,5'ten daha fazla olmayan X_m sayısının altındaki X dağılım değerlerinin olasılığı (P) ile karakterize edilir. Başka bir ifadeyle, medyanın, artan bir sıralamayla düzenlenmiş bir sayılar dağılımının 50nci yüzdeliğinde olduğudur. Diğer bir deyişle, sıralanmış bir tek sayılar setinin orta noktası veya sıralanmış bir çift sayılar setinin iki orta noktasının ortalamasıdır.

Güçlü standart sapma

$$S^* = \frac{1.25IQR}{1.35\sqrt{N}}$$

Ortalama etrafındaki değişkenliğin güvenilir bir tahminine varabilmek için, güçlü standart sapmaya, Stuart ve Kendall'a göre hesaplanan haliyle başvurmak gereklidir. Formül, N'in gözlemlerin sayısı olduğu yerde, asimptotik güçlü standart sapmayı verir, IQR interkuartil enterval ya da incelenmekte olan verilerin değişkenliğinin güçlü tahminidir.

(interkuartil enterval belirli bir olasılık dağılımının vakalarının tam %50'sini kapsar). interkuartil enterval, % 75nci ve % 25inci arasındaki fark büyüklüğünü hesaplamakla hesaplanır.

$$IQR = \% 75\text{inci} - \% 25\text{inci}$$

Yüzde birlik, dağılım değerlerinin X_{pc} 'den az ve spesifik bir yüzde birden küçük ve eşit olma olasılığı (P) ve eşzamanlı olarak dağılım değerlerinin X_{pc} 'den az veya eşit ve spesifik bir yüzde birden daha büyük ve eşit olma olasılığı (P) olgusuyla karakterize edilen X_{pc} değeridir. Yüzde birlik, seçilen dağılım fraksiyonunu belirtir. Medyan durumunda, bu 50/100'e eşittir.

$$\text{Yüzdellik} = \left[P(X < X_{pc}) \leq \frac{n}{100} \wedge P(X \leq X_{pc}) \geq \frac{n}{100} \right]$$

Pratikleştirme amacıyla, yüzdellik, dağılım veya yoğunluk eğrisinden iki ucu birleştirilen spesifik bir alana tekabül eden dağılım değeridir. Bir örnek verecek olursak, 25inci yüzde birlik, 0,25 veya 25/100'e eşit bir alana tekabül eden dağılım değerini temsil eder.

Güçlü değişkenlik katsayısı (%)

$$rVC = \frac{S^*}{Me} \times 100$$

% rVC, analiz edilen sayılar setinin yüzde değişkenliğini belirten bir saf sayıyı temsil eder. Bu sebepten, panel değerlendiricilerinin güvenilirliğini kontrol etmek için çok kullanışlıdır.

%95'teki medyanın güven aralıkları

%95'teki güven aralıkları (birinci çeşitten hatanın değeri 0,05 veya %5'e eşittir), şayet bir deneyi sonsuz kereler tekrar etmek mümkün olsaydı, medyanın değerinin içinde değişebileceği aralığı temsil eder. Pratikte bu, eğer birçok kez tekrar etmek mümkün olsaydı, benimsenen çalışma koşullarında testin değişebilirlik aralığını belirtir. CV%r'da olduğu gibi, aralık testin güvenilirliğini değerlendirmeye yardımcı olur.

$$\text{Üst C.I. (Güven Aralığı)} = Me + (cS^*)$$

$$\text{Alt C.I. (Güven Aralığı)} = Me - (cS^*)$$

Burada 0.95'e eşit güven aralığı için C=1.96'dır.

Sınıflandırma, metodun bölüm 9.3'ünde sabitlenen referans aralıklarıyla medyan değerlerinin karşılaştırmasıyla yapılır. Bilgisayar programının uygulamasında, sınıflandırma istatistiki veriler tablosunda ve grafikte gösterilir.

EK - 11

Pirinada Yağ Miktarı Tayini

1. Cihaz ve malzemeler

- 1.1. 200, 250 mL'lik yuvarlak dipli ağzı şilifli balona uygun ekstraksiyon ekipmanı
- 1.2. Elektrikli ısıtıcı banyo (kum banyosu, su banyosu) veya ısıtıcı tabla,
- 1.3. Analitik terazi,
- 1.4. Maksimum 80 °C'ye ayarlanabilen etüv,
- 1.5. 103±2 °C'ye ayarlanabilen sıcaklık kontrollü hava akımında veya düşük basınçta çalışabilen etüv,
- 1.6. Mekanik öğütücü, (temizlenmesi kolay ve küspeyi, ısıtmadan ve içerisindeki su, uçucu madde ve yağ kaybına meydan vermeden, 1 mm çapındaki delik büyüklüğünde bir elekten tamamen geçecek şekilde öğütebilen)
- 1.7. Ekstraksiyon kartuşu ve süzgeç kâğıdı veya içerisinde hegzanda çözünen madde bulunmayan pamuk
- 1.8. Desikatör
- 1.9. 1 mm çapında gözenek büyüklüğüne sahip elek,
- 1.10. Sünger taşı (küçük parçalar halinde önceden kurutulmuş)

2. Reaktifler

Hekzan (safsızlığı 0,002g/100mL)

3. Prosedür

3.1. Numunenin hazırlanması

Numune gerekirse, önceden iyice temizlenmiş mekanik bir öğütücüde öğütülür. Öğütücü temizliğinin tamamlanması için numunenin yaklaşık olarak yirmide biri kullanılır ve bu kısım öğütüldükten sonra atılır. Bundan sonra numunenin diğer kısmı öğütülür, öğütülen kısım toplanır, dikkatlice karıştırılır ve zaman geçirmeden hemen analize başlanır.

3.2. Analiz numunesi

Öğütme işlemi bitmez bitmez, öğütülen kısımdan ekstrakte edilecek madde miktarına göre, 10 g kadar numune 0,01 g hassasiyetle tartılarak alınır.

3.4. Kurutma;

Pirina 105±5 °C'den fazla olmayan bir etüvde kurutma işlemine tabi tutularak sabit tartıma getirilir.

3.3. Ekstraksiyon kartuşunun hazırlanması

Ön kurutma yapılan Tartılan numune kartuşa konular ve cam pamuğu ile kapatılır. Eğer filtre kâğıdı kullanılıyorsa analiz numunesi konulduktan sonra sarılarak iyice kapatılır.

3.5. Yuvarlak dipli balonun hazırlanması

İçerisine, önceden 100 °C'a yakın bir sıcaklıkta kurutulmuş ve ortamın sıcaklığına kadar soğutulmak üzere en az 1 saat bir desikatörde tutulmuş bir iki parça sünger taşı konan balon 0,001 g hassasiyetle tartılır.

3.6. Birinci ekstraksiyon

İçerisinde analiz numunesi bulunan ekstraksiyon kartuşu veya süzgeç kâğıdı ekstraksiyon cihazına konur. Balona yeterli miktarda (yaklaşık 1,5 sifon) hegzan ilave edilir. Balon ekstraksiyon cihazına takılır ve ısıtma işlemi ekstraksiyon hızı, saniyede en az 3 damla olacak şekilde ayarlanır (Isıtma çok şiddetli olmamalıdır.).

Numune 4 saatlik bir ekstraksiyondan sonra tekrar soğumaya bırakılır. Kartuş ekstraksiyon cihazından çıkarılır ve hava akımı altında kartuş tarafından emilmiş olan çözücünün büyük bir kısmı uzaklaştırılır.

3.7. İkinci ekstraksiyon

Kartuş içindeki numune bir havana boşaltılır, 10g kadar kum ilave edilerek mümkün olduğu kadar ince öğütülür (eğer mikro öğütücü varsa kum olmadan öğütülebilir.) Karışım tekrar kartuşa doldurularak yine cihaza konur. Aynı balon kullanılarak 2 saat daha ekstrakte edilir.

Ekstraksiyon balonundaki çözelti berrak olmalıdır. Eğer değilse, filtre kağıdı kullanılarak çözelti tekrar tartımı alınmış ekstraksiyon balonuna süzülür ve filtre kağıdı hekzan ile çok iyi şekilde yıkanır. Toplanan filtrat ve yıkama çözeltisi 1mg hassasiyetle, kurutulmuş (103±2 °C'de 20 dk süreyle) ve desikatörde 20dk soğutulmuş oda sıcaklığına getirilmiş ve darası alınmış yuvarlak dipli başka bir balonda toplanır.

3.8. Çözücünün uçurulması ve kalıntının tartımı

Çözücünün büyük bir kısmı elektrikli ısıtıcı banyoda distilasyonla uzaklaştırılır. Kalan iz miktardaki çözücü 103 ±2 °C'de 20 dk süreyle ısıtılarak uzaklaştırılır. Bu işlemi kolaylaştırmak için hava akımı (tercihen inert gaz) veya düşük basınç kullanılabilir.

Balon bir desikatörde en az bir saat tutularak oda sıcaklığına tekrar getirilir ve 0,001 g duyarlılıkla tartılır. Isıtma işlemi aynı şartlar altında 10 dk süre ile ikinci bir kez tekrarlanır, soğutulur ve tartılır.

Bu iki tartım arasındaki fark 0,01 g'ı geçmemelidir. Aksi halde aradaki fark 0,01 g'ı geçmeyinceye kadar 10'ar dakikalık sürelerle ısıtma işlemi tekrarlanmalıdır. Balonun son tartısı kaydedilir.

Analiz iki paralel olarak yapılır.

4. Sonuçların ifade edilmesi ve hesaplama

4.1. Hesaplama metodu ve formüller;

a) Hekzan ekstraktı, alınan ürünün ağırlık yüzdesi olarak aşağıdaki formülden hesaplanır:

$$S = m_1 \times \frac{100}{m_0}$$

Burada ;

S : Alınan ürün ekstraktının kütlece yüzdesi

m_0 : Analiz numunesinin ağırlığı, g

m_1 : Ekstraksiyon balonunun en son tartımındaki ekstraktın miktarı, g

Sonuçların tekrarlanabilirliği yeterli görülürse iki paralelde elde edilen değerlerin aritmetik ortalaması sonuç olarak alınır. Aksi halde analiz tekrarlanır.

Sonuçlar bir ondalık olarak verilir.

b) Ekstrakttaki yağ yüzdesi kuru madde bazında aşağıdaki formülle hesaplanır;

$$\text{Ekstrakttaki yağ (\%)} = S \times \frac{100}{100 - U}$$

S: Yukarıdaki formülden bulunan ekstrakt miktarı

U: Nem ve uçucu madde miktarı

4.2. Tekrarlanabilirlik

Aynı analizi tarafından peş peşe veya iki analizi tarafından eş zamanlı olarak yapılan paralel analizler arasındaki fark 100 g numune başına 0,2 g hekzan ekstraktını geçmemelidir.

Eğer tatmin edici bir sonuç elde edilmediyse, iki farklı örnekte analiz tekrarlanır. Eğer iki sonuç arasındaki fark 0,2'den farklı olursa 4 çalışmanın aritmetik ortalaması alınır.

EK - 12

Stigmastadienlerin Tayini

1. Amaç

Natürel zeytinyağı ve ham pirina yağında düşük konsantrasyonlarda bulunan stigmastadienlerin tanımlanmasıdır.

2. Kapsam

Bu metot hidrokarbon içeriği 0,01- 4,0 mg/kg arasında bulunan yağlar için güvenilir olmasına rağmen tüm bitkisel yağlara uygulanabilir. Metot özellikle natürel zeytinyağında rafine bitkisel yağların (rafine zeytinyağı, pirina yağı, ayçiçeği yağı, palm yağı vs.) varlığını tespit etmeye uygundur. Bunun nedeni rafine yağların stigmastadien içermesi, natürel yağların ise içermemesidir.

3. Prensiptir

Sabunlaşmayan maddelerin elde edilerek steroidal hidrokarbon fraksiyonunun silikajel üzerinde kolon kromatografisi ile ayrıştırılması ve kapiler kolonlu GC ile analiz edilmesidir.

4. Cihaz ve malzemeler

- 4.1. Geri soğutucu (250 mL'lik balon ile kullanıma uygun)
- 4.2. 500 mL'lik kapasiteye sahip ayırma hunileri.
- 4.3. 100 mL'lik yuvarlak dipli şifli balon
- 4.4. Vakumlu döner buharlaştırıcı.
- 4.5. İç çapı 1,5-2,0 cm, uzunluğu 50 cm olan teflon vanalı ve dibinde cam yün liflerinden bir tıpa veya sertleştirilmiş camdan bir disk olan cam kromatografi kolonu (Silikajel kolonu hazırlamak için, kromatografi kolonunun içine yaklaşık 5 cm'lik bir derinliğe kadar hekzan dökülür ve 15 g silikajel 40 mL n-hekzanla bulamaç hale getirilerek kolona boşaltılır. Çökeltmeyi tamamlamak için elektrovibratör kullanılır. Yaklaşık 0,5 cm'lik bir yüksekliğe kadar susuz sodyum sülfat ilave edilir ve son olarak fazla hekzan süzülür.
- 4.6. Alev iyonizasyon detektörüne sahip kapiller kolonlu split –splitless veya doğrudan kolona enjeksiyon sistemli ve ± 1 °C hassasiyetiyle çalışabilen fırınlı GC.
- 4.7. Uzunluğu 20 - 30 m, iç çapı 0,25 – 0,32 mm, film kalınlığı 0,10 – 0,30 μm olan, camdan ya da eritilmiş silisten kapiler kolon (SE-52, SE-54 veya eşdeğeri kolon)

Not 1: Benzer veya daha düşük polariteye sahip farklı kolonlar da kullanılabilir.

- 4.8. Sertleştirilmiş iğneli 10 μL 'lik gaz kromatografi enjektörü
- 4.9. Mantolu ısıtıcı veya elektrikli ısıtıcı

5. Reaktifler

Tüm reaktifler, aksi belirtilmediği takdirde analitik saflıkta olmalıdır. Kullanılan su, saf su veya en azından eşdeğer saflıkta bir su olmalıdır.

- 5.1. Kromatografik saflıkta hekzan
- 5.2. 96'lık v/v etil alkol
- 5.3. Analitik saflıkta susuz sodyum sülfat,
- 5.4. % 10'luk etanollü potasyum hidroksit çözeltisi: 50 g potasyum hidroksite 10 mL su ilave edilir, karıştırılır ve karışımı 500 mL etanol içerisinde çözülür.

Not 2: Etanollü potasyum hidroksit çözeltisi beklediği takdirde kahverengine döner. Günlük hazırlanmalı ve ağzı sıkıca kapatılmış koyu cam şişelerde muhafaza edilmelidir.

- 5.5. Kolon kromatografisi için 70 - 230 meshlik silikajel 60,

Not 3: Genelde silikajel doğrudan kullanılabilir. Ancak bazı silikajel partileri düşük aktivite göstererek kötü kromatografik ayrışımına neden olabilir. Bu koşullar altında, silikajel aşağıdaki şekilde muameleye tabi tutulmalıdır: Silikajel asgari dört saat boyunca 550 °C'de ısıtarak aktive edilir. Isıtma sonrasında silikajel desikatörde soğutulur ve şilfli balona aktarılır. % 2 su ilave edilir ve içerisinde topaklaşma olmayıncaya kadar çalkalanır.

Eğer silikajel partileri gürültü ve tanımlanamayan piklerin oluşmasına neden oluyorsa silikajel yukarıdaki şekilde işleme tabi tutulmalıdır. Buna alternatif olarak ekstra saf silikajel kullanılabilir.

- 5.6. % 99 saflıkta 10 mg kolesta-3.5-dien 50 mL hekzan içerisinde çözünerek stok çözeltisi(200 ppm) hazırlanır.
- 5.7. Stok çözeltiden hekzanla seyreltilerek hazırlanan 20 ppm konsantrasyonunda kolesta-3.5-dien standart çözeltisi

Not 4: 5.6 ve 5.7 çözeltileri 4 °C'den daha düşük sıcaklıkta muhafaza edildikleri takdirde en az dört ay boyunca stabil kalır.

- 5.8. Yaklaşık 100 ppm konsantrasyonunda hekzan içerisinde n-nonakosan çözeltisi
- 5.9. Taşıyıcı gazlar: Kromatografik saflıkta hidrojen veya helyum
- 5.10. Yardımcı gazlar kromatografik saflıkta hidrojen ve kuru hava

6. Prosedür

6.1. Sabunlaşmayan maddenin hazırlanması

- 6.1.1. $20 \pm 0,1$ g yağ tartarak 250 mL'lik şilfli balona konular, 1 mL standart kolesta-3.5-dien (20µg) çözeltisi ve % 10'luk 75 mL etanollü potasyum hidroksit çözeltisi ilave edilir, çalkalanarak geri soğutucuya bağlanır ve hafif kaynatılarak 30 dk bekletilir. Numunenin bulunduğu balon ısıtıcıdan indirilir ve soğuması beklenir. (Numune dibe çökeceğinden dolayı tamamen soğumasına izin verilmez). 100 mL su ilave edilir ve 100 mL hekzan yardımıyla ayırma hunisine aktarılır. Karışım 30 s boyunca kuvvetlice çalkalanır ve faz ayrımı beklenir.

Not 5: Herhangi bir emülsiyon oluşursa az miktarda etil veya metil alkol ilavesiyle yok edilebilir.

- 6.1.2. Alt fazı ayırmak için ikinci bir ayırma hunisi kullanılır. Üst fazdan 100 ml n-hekzan kullanılarak aynı şekilde bir ekstraksiyon daha yapılır. Hekzan ekstraktları tek bir ayırma hunisinde toplanır ve yıkama suyu nötr bir reaksiyon verene kadar (fenol ftalein indikatörlüğünde) en az üç kez 100 ml etanol/saf su (1:1) ile yıkanır.
- 6.1.3. Yıkama suyu alındıktan sonra yaklaşık 50 g susuz sodyum sülfatla kurutulur ve huni 20 mL n-hekzanla yıkanır ve vakumlu döner buharlaştırıcıda 30 °C ve düşük basınç altında kuruyana kadar uçurulur.

6.2. Steroidal hidrokarbon fraksiyonlarının ayrılması

- 6.2.1. Kromatografik işleme başlamadan önce n-hekzan akış hızı 1 mL/dk olarak ayarlanır. n-hekzan sodyum sülfat seviyesinin 1 mm üstüne gelinceye kadar geçirilir. Hazırlanan numune 1 mL n-hekzan ile kromatografik kolona verilir verilmez süzüntü toplanmaya başlanır. Balondaki kalıntı tekrar 1 mL n hekzan ile yıkanarak kromatografik kolona verilir. Süzüntünün yaklaşık ilk 25-30 mL'si (birinci fraksiyon) atılır, sonraki 40 mL'lik süzüntü (ikinci fraksiyon) toplanır ve 100 mL'lik yuvarlak dipli şilfli balona aktarılır.

Not 6: Birinci fraksiyon doymuş hidrokarbonları (Şekil 1 a), ikinci fraksiyon ise steroidal hidrokarbonları içerir. Sonraki süzüntü (üçüncü fraksiyon) squalen vb bileşikler içerir. Doymuş ve steroidal hidrokarbonların iyi şekilde ayrılmasını sağlamak için fraksiyon hacimlerinin optimizasyonu gereklidir. Bunun için birinci fraksiyonun hacmi ikinci fraksiyon analiz edildiğinde doymuş hidrokarbonları temsil eden pikler düşük olacak şekilde ayarlanmalıdır (Şekil 1 c). Bu piklerin çıkmadığı ancak standart pik yüksekliğinin düşük çıktığı durumda seyreltme hacmi azaltılmalıdır. GC koşullarının 6.3.1.'de gösterilen şekilde ayarlanması durumunda GC analizi sırasında üst üste gelen herhangi bir pik belirmez. İkinci fraksiyonun hacminin optimizasyonu, daha sonra çıkan bileşiklerle iyi bir ayırım gerçekleştiğinde genellikle gerekli değildir. Buna rağmen standarda göre yaklaşık 1,5 dakika daha düşük bir alıkonma süresi olan büyük bir pikin mevcudiyeti squalenden kaynaklanmaktadır ve kötü bir ayırım olduğunun göstergesidir.

6.2.2. İkinci fraksiyon vakumlu döner buharlaştırıcıda 30 °C ve düşük basınç altında kuruyuncaya kadar uçurulur ve derhal 0,2 mL n-hekzan içerisinde çözünür. Analiz edilene kadar çözelti buzdolabında saklanır.

Not 7: 6.1.3 ve 6.2.2'de hazırlanan numuneler oda sıcaklığında ve kuru tutulmamalıdır. Elde edilmelerinden hemen sonra çözücü ilave edilmeli ve çözeltiler buzdolabında saklanmalıdır.

6.3. Gaz kromatografisi

6.3.1. Çalışma şartları:

- Enjeksiyon sıcaklığı: 300 °C,
- Detektör sıcaklığı: 320 °C,
 - cihaz hassasiyeti: en düşük değer yaklaşık 16 katı,
 - enjekte edilen madde miktarı: 1 µL,
- Fırın sıcaklığı:
 - 235 °C başlangıç sıcaklığında 6 dk bekletildikten sonra 2 °C/dk sıcaklık artışı ile 285 °C ye çıkarılır.
- Split oranı: 1:15
- Taşıyıcı gaz: yaklaşık 120 kPA basınçta helyum veya hidrojen

Bu koşullar, aşağıda verilen şartları karşılayan kromatogramlar elde edilmesi için GC ve kolonun niteliklerine uygun olarak ayarlanabilir:

-İç standardın alıkonma zamanı 19±5 dk

-İç standart piki tam kromatogramın en az % 80'i

GC sistemi kolesta-3.5-dien ve n-nonakosan çözeltisi enjekte edilerek kontrol edilmelidir. Kolesta-3.5-dien piki mutlaka n-nonakosandan önce gelmelidir. (Şekil 1 c); bu durum gözlenmezse fırın sıcaklığı düşürülür ve/veya polaritesi daha düşük bir kolon kullanılır.

6.3.2. Piklerin tanımlanması

İç standart piki ortalama 19±5 dk da gelir. İç standardın alıkonma zamanı 1 kabul edilirse 3.5–stigmastadien piki ise yaklaşık 1.29 dur(Şekil 1 b.). 3,5-stigmastadien genelde az miktarda izomer içerir ve genellikle her ikisi birlikte tek bir pik oluşturur. Buna rağmen kolonun polaritesi fazla ise veya yüksek bir çözünürlük gücü varsa izomer stigmasta–3.5–dienden önce ve buna yakın küçük bir pik halinde belirebilir. Stigmastadienlerin tek bir pik olarak gözlenmesi için polaritesi düşük ya da daha geniş bir iç çapı olan kolonla değiştirilmesi önerilir.

Not 8: Stigmastadienlerin daha iyi tanımlanabilmesi için, natürel yağın içine az miktarda rafine bitkisel yağ konularak (örneğin 1-2 g) analiz edilir. Böylece stigmastadienler belirgin ve kolaylıkla teşhis edilebilir.

6.3.3. Miktarın hesaplanması

Stigmastadienlerin içeriği aşağıdaki formüle göre hesaplanır:

$$Stigmastadien(mg / kg) = \frac{A_s \times M_c}{A_c \times M_o}$$

Burada:

A_s= stigmastadien pik alanı (eğer pik iki izomer halinde gözlemlenirse iki pik alanının toplamı),

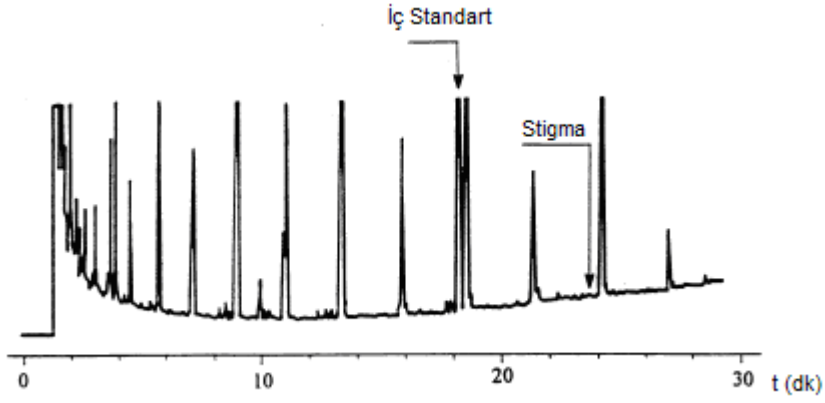
A_c= iç standart pik alanı (kolesta-3.5-dien),

M_c= eklenen standart miktarı, (µg)

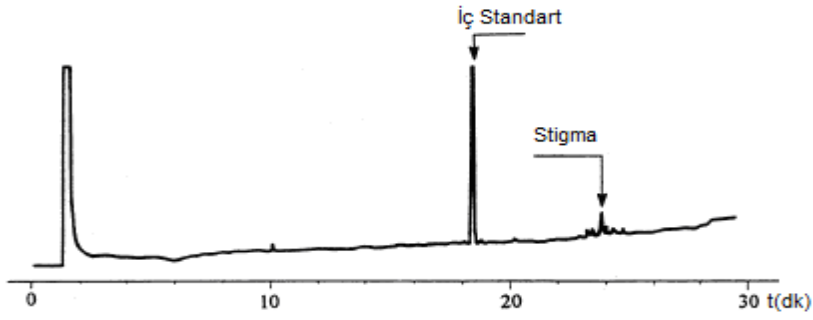
M_o= numune miktarı, (g).

Tespit limiti: yaklaşık 0,01 mg/kg

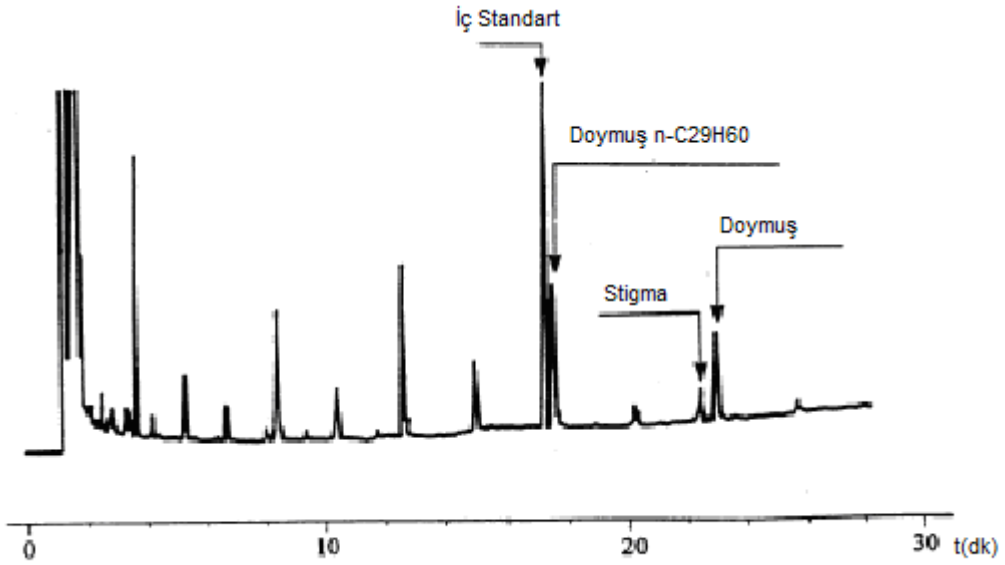
Zeytinyağı numunelerinden elde edilen kromatogramlar



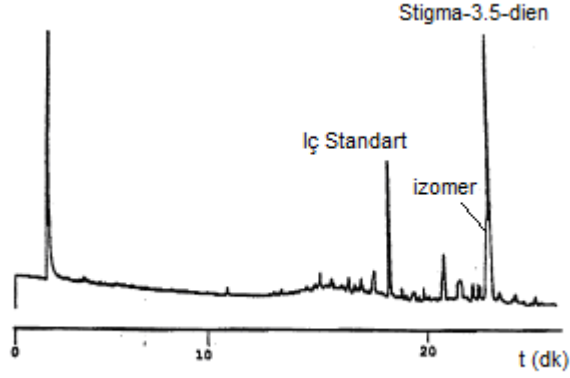
Şekil 1a İç standartla birlikte natürel zeytinyağından elde edilen birinci fraksiyonun (30 mL) kromatogramı



Şekil 1b 0,10 mg/kg stigmastadien içeren zeytinyağından elde edilen ikinci fraksiyonun (40 mL) kromatogramı



Şekil 1c Birinci fraksiyondan az miktar içeren ikinci fraksiyonun (40 mL) kromatogramı



Şekil 2

Rafine zeytinyağı numunesinden elde edilen, 3.5 stigmastadien izomerlerini gösteren kromatogram

EK – 13

Gerçek ve Teorik ECN 42 Trigliserid İçeriği Arasındaki Maksimum Farkın Tayini

1. Kapsam

Zeytinyağı bileşimindeki trigliserid (TAGs) kompozisyonunun, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) analitik sonuçlarından faydalanılarak elde edilen veriler ve yağ asidi kompozisyonundan hesaplanan teorik içerik arasındaki fark yardımıyla eşdeğer karbon sayısı cinsinden tayinidir.

2. Amaç ve uygulama alanı

Bu metot, zeytinyağı ve pirina yağındaki az miktarda tohum yağı (linoleik asit açısından zengin olan) varlığının tespiti için uygulanır.

3. Prensip

Metot, eşdeğer karbon sayısı (ECN) 42 olan trigliseridlerin HPLC yardımıyla saptanan içeriği ve GC ile tespit edilen yağ asidi kompozisyonundan yararlanılarak hesaplanan teorik ECN içeriğinin saf zeytinyağlarında belirli bir sınır dâhilinde birbirine eşdeğer olması prensibine dayanır.

Not 1: TGK-Zeytinyağı ve Pirina Yağı Tebliğinde belirtilen değerlerden daha büyük bir fark, o yağın tohum yağı içerdiğini işaret etmektedir.

4. Metot

Eşdeğer karbon sayısı (ECN) 42 olan trigliseridlerin teorik içeriğinin ve bunun HPLC'den elde edilen veriler ile arasındaki farkın hesaplanması, aşağıda belirtilen 3 metotla elde edilen verilerin birlikte değerlendirilmesi ile belirlenir:

- Yağ asidi kompozisyonunun kapiler gaz kromatografisiyle tayini,
- ECN 42 olan trigliseridlerin teorik miktarının hesaplanması ve
- ECN 42 olan trigliseridlerin HPLC ile tayini.

4.1. Cihaz ve malzemeler

4.1.1. 250 ve 500 mL'lik cam balonlar

4.1.2. 100 mL'lik beherler

4.1.3. Uzunluğu 450 mm iç çapı 21 mm olan musluklu cam kromatografi kolonu

4.1.4. 250 mL'lik ayırma hunileri

- 4.1.5. 600 mm uzunlukta baget
- 4.1.6. 80 mm çapında cam huni
- 4.1.7. 50 mL'lik balon jojeler
- 4.1.8. 20 mL'lik balon jojeler
- 4.1.9. Vakumlu döner buharlaştırıcı.
- 4.1.10. Kolon sıcaklığı ayarlanabilen termostat kontrollü HPLC
- 4.1.11. 10 µL'lik enjeksiyon bloğu (loop)
- 4.1.12. RID dedektör: diferansiyel refraktometre (Tam-ölçek duyarlılığı en az 10^{-4} birim)
- 4.1.13. Kolon: Uzunluğu 250 mm, iç çapı 4,5 mm olan ve % 22-23 oranında karbon içeren oktadesil silan şeklinde 5 µm partikül çapında silika ile doldurulmuş paslanmaz çelik kolon (RP 18 HPLC kolonu)
- 4.1.14. Bilgisayarla bağlantılı ve HPLC verilerini saklayabilecek bilgisayar sistemi ve yazıcısı
- 4.2. Reaktifler

HPLC'de kullanılan hareketli fazın gazları giderilmiş olmalıdır. Net ayırım görüldüğü sürece hareketli faz kullanılmaya devam edilir.
- 4.2.1. Kromatografik saflıkta petrol eteri
- 4.2.2. Dietil eter
- 4.2.3. Kolon kromatografisinde kullanılan ayırım çözücüsü: petrol eteri/dietil eter karışımı 87:13 (v/v).
- 4.2.4. Su içeriği % 5 olacak şekilde standardize edilmiş 70-230 mesh tane büyüklüğünde silikajel
- 4.2.5. Cam yünü
- 4.2.6. HPLC için aseton
- 4.2.7. HPLC için asetonitril
- 4.2.8. Hareketli faz çözeltisi: asetonitril + aseton (oranlar arzu edilen ayrılmayı sağlamak amacıyla; 50:50 (v/v) oranından başlanarak ayarlanır).
- 4.2.9. Çözücü: aseton
- 4.2.10. Standart saf triaçilgliseridler: Piyasada bulunan triaçilgliseridler (tripalmitin, triolein, vs.) standardizasyon amacıyla kullanılabilir ve alıkonma süreleri karşıt gelen karbon sayılarına göre belirlenebilir veya buna alternatif olarak soya yağından referans triaçilgliserid kromatogramı elde edilebilir (Not 3 ve 4 ile Şekil 1,2,3 ve 4).
- 4.3. Numunenin hazırlanması

Bazı girişim yapıcı maddeler olması gereken değerlerden yüksek sonuçlar verebileceğinden numune okside olmuş yağlardaki polar maddelerin saptanması için kullanılan UPAC 2.507 yöntemine uygun olarak saflaştırılmalıdır.
- 4.3.1. Kromatografik kolonun hazırlanması

Kolon yaklaşık 30 mL ayırım çözücüsü ile doldurulur ve bundan sonra kolon içerisine, baget yardımıyla dibe doğru bastırarak bir parça cam yünü yerleştirilir.

100 mL'lik bir behere 80 mL ayırım çözücüsü koyulur ve daha sonra üzerine 25 g silikajel ilave edilir, sonra bu karışım bir cam huniyle cam kolon içerisine boşaltılır.

Beher içinde kalan silikajelin tamamını kolon içerisine boşaltmak için beher ayırım çözücüsü ile yıkanır ve yıkanan kısım da kolonun içine dökülür.

Cam kolonun musluğu açılır ve ayırım çözücüsü seviyesi silikajelin yaklaşık 1 cm üstüne ininceye kadar kolondan akıtılır.
- 4.3.2. Kolon kromatografisi

Daha önceden süzölmüş, homojenize edilmiş susuz yağ numunesinden $2,5 \pm 0,1$ g (0,001 g duyarlılıkla) 50 mL'lik balon joje içerisine tartılır, 20 mL ayırım çözücüsü içerisine çözünür. Gerekli olursa çözünme

işlemini kolaylaştırmak için hafifçe ısıtılır. Oda sıcaklığında soğutulur ve hacmi ayırım çözücüsü ile 50 mL'ye tamamlanır.

20 mL çözelti bir pipet vasıtasıyla kolon içerisine boşaltılır, musluk açılır ve silikajel temizlenir.

Bundan sonra 150 mL ayırım çözücüsü kolona ilave edilir. Çözücünün musluktan akış hızı yaklaşık 2 mL/dk'ya ayarlanır (150 mL ayırım çözücüsü kolondan 60-70 dakikada geçmelidir.).

Süzüntü daha önceden sabit tartıma getirilmiş 250 mL'lik, cam balonda toplanır. Çözücü vakumlu döner buharlaştırıcıda uçurulur ve HPLC analizi ile metil esterlerin hazırlanmasında kullanılacak olan bu kalıntı tartılır.

Kalıntı miktarı, natürel sızma, natürel birinci, natürel ikinci, rafine ve riviera zeytinyağları kategorileri için başlangıçta kolona ilave edilen numunenin en az % 90'ı, ham zeytinyağı ve pirina yağları için ise en az % 80'i olmalıdır.

4.4. HPLC analizi

4.4.1. Kromatografik analiz için numunelerin hazırlanması

Analiz edilecek olan numunenin % 5'lik çözeltisi aşağıdaki gibi hazırlanır.

10 mL'lik balon joje içine $0,5 \pm 0,001$ g numune tartılır. Aseton ile 10 mL'ye tamamlanır.

4.4.2. Prosedür

Tüm sistemi temizlemek için hareketli faz çözeltisi 1,5 mL/dk hızla akıtılır. Doğrusal baseline elde edinceye kadar beklenir.

Hazırlanan numuneden 10 µL enjekte edilir.

4.4.3. Sonuçların hesaplanması ve açıklanması

Alan normalleştirme yöntemini kullanılır (ECN42'den ECN52'ye kadar olan TAG'lere karşılık gelen pik alanları toplamalarının % 100'e eşit olduğunu kabul edilir). Her triaçilgliseridin göreceli yüzdesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanır:

$$\% \text{ triaçilgliserid} = \text{pikin alanı} \times 100 / \text{pik alanlarının toplamı}$$

Sonuçlar 2 ondalık olarak verilmelidir.

Not 2: Triaçilgliserid piklerinin çıkış sırası, genelde $ECN = CN - 2n$ ilişkisi ile tanımlanan eşdeğer karbon sayısı hesaplanarak saptanır. Burada CN karbon sayısı ve n çift bağların sayısıdır. Bu çift bağların bağlandıkları karbon atomu dikkate alınarak çok daha kesin olarak saptanabilir. Eğer n_o , n_i ve n_n sayıları sırasıyla oleik, linoleik ve linolenik asitlerin bileşiminde bulunan çift bağlar ise, eşdeğer karbon sayısı aşağıdaki formüldeki ilişkiyle hesaplanabilir:

$$ECN = CN - d_{o_n} - d_{i_n} - d_{n_n}$$

Burada d_o , d_i ve d_n katsayıları referans triaçilgliseridler yardımıyla hesaplanır. Bu metotta belirtilen koşullar altında elde edilen bağıntı aşağıdaki formül uygulanarak elde edilene yakın olacaktır.

$$ECN = CN - [2,60 n_o] - [2,35 n_i] - [2,17 n_n]$$

Not 3: Çeşitli triaçilgliserid referansının ayrışmasını triolein yardımıyla hesaplamak mümkündür.

$$\alpha = RT' / RT_{\text{triolein}}$$

$$\text{İndirgenmiş alıkonma süresi: } RT' = RT - RT_{\text{çözelti}}$$

f'ye karşı (çift bağların sayısı) log α grafiği yardımıyla referans triaçilgliseridlerde bulunan yağ asitlerinin tüm triaçilgliseridlerinin alıkonma sürelerinin belirlenmesi mümkündür (Şekil 2).

Not 4: Kolon, trilinein pikinin diğer triaçilgliserid piklerinden net bir şekilde ayrılmasını sağlamalıdır. Ayrıma ECN 52 piki görülene kadar devam edilir.

4.5. Trigliseridlerin kompozisyonunun hesaplanması

4.5.1. Yağ asitlerinin kompozisyonunun saptanması

Yağ asidi kompozisyonunun saptanması EK 9A'ya göre gerçekleştirilir.

Yağ asidi metil esterleri EK 9B'ye göre gerçekleştirilir.

4.5.2. Yağ asitlerinin hesaplanması

Yağ asitleri ve bunlara karşılık gelen ECN aşağıdaki tabloda görülmektedir. Tabloda sadece 16 ve 18 karbon atomuna sahip olan yağ asitleri dikkate alınmıştır.

Yağ asidi (Y.A)	Kısaltma	Molekül ağırlığı (MA)	ECN
Palmitik asit	P	256,4	16
Palmitoleik asit	Po	254,4	14
Stearik asit	S	284,5	18
Oleik asit	O	282,5	16
Linoleik asit	L	280,4	14
Linolenik asit	Ln	278,4	12

4.5.3. Alan %'lerinin tüm yağ asitleri için mol cinsine çevrilmesi

$$\left. \begin{aligned} \text{mol P} &= \frac{\text{P Alan \%}}{\text{MA P}} & \text{mol S} &= \frac{\text{S Alan \%}}{\text{MA S}} & \text{mol Po} &= \frac{\text{Po Alan \%}}{\text{MA Po}} \\ \text{mol O} &= \frac{\text{O Alan \%}}{\text{MA O}} & \text{mol L} &= \frac{\text{L Alan \%}}{\text{MA L}} & \text{mol Ln} &= \frac{\text{Ln Alan \%}}{\text{MA Ln}} \end{aligned} \right\} (1)$$

4.5.4. Yağ asitlerinin % 100'e normalleştirilmesi

$$\left. \begin{aligned} \% \text{ mol P (1,2,3)} &= \frac{\text{mol P} \times 100}{\text{mol (P + S + Po + O + L + Ln)}} \\ \% \text{ mol S (1,2,3)} &= \frac{\text{mol S} \times 100}{\text{mol (P + S + Po + O + L + Ln)}} \\ \% \text{ mol Po (1,2,3)} &= \frac{\text{mol Po} \times 100}{\text{mol (P + S + Po + O + L + Ln)}} \\ \% \text{ mol O (1,2,3)} &= \frac{\text{mol O} \times 100}{\text{mol (P + S + Po + O + L + Ln)}} \end{aligned} \right\} (2)$$

$$\left. \begin{aligned} \% \text{ mol L (1,2,3)} &= \frac{\text{mol L} \times 100}{\text{mol (P + S + Po + O + L + Ln)}} \\ \% \text{ mol Ln (1,2,3)} &= \frac{\text{mol Ln} \times 100}{\text{mol (P + S + Po + O + L + Ln)}} \end{aligned} \right\} (2)$$

Elde edilen sonuç, TAG'ların genel (1,2,3-) pozisyonundaki her yağ asidinin mol cinsinden yüzdesini verir. Bunu takiben doymuş yağ asitleri P ve S (SFA*) ile doymamış yağ asitleri Po, O, L ve Ln (UFA**) hesaplanır:

$$\left. \begin{aligned} \% \text{ molSFA} &= \% \text{ molP} + \% \text{ molS} \\ \% \text{ molUFA} &= 100 - \% \text{ molSFA} \end{aligned} \right\} (3)$$

4.5.5. TAG'ların 2- ve 1,3- pozisyonlarında yağ asidi bileşiklerinin hesaplanması

Yağ asitleri aşağıda belirtildiği gibi

1- ve 3- pozisyonları için iki özdeş grup, 2- pozisyonu için bir grup olmak üzere üç gruba ayrılırlar.

Ayrıca doymuş (P ve S) ve doymamış (Po, O, L ve Ln) yağ asitleri de farklı katsayılarla gruplandırılır.

4.5.5.1. 2- pozisyonunda doymuş yağ asitleri [P(2) ve S(2)]

$$\left. \begin{aligned} \% \text{ molP(2)} &= \% \text{ molP(1,2,3)} \times 0,06 \\ \% \text{ molS(2)} &= \% \text{ molS(1,2,3)} \times 0,06 \end{aligned} \right\} (4)$$

4.5.5.2. 2-pozisyonundaki doymamış yağ asitleri [Po(2), O(2), L(2) ve Ln(2)]:

$$\left. \begin{aligned} \% \text{ mol Po (2)} &= \frac{\% \text{ mol Po (1,2,3)}}{\% \text{ mol} \times \text{UFA}} \times [100 - \% \text{ mol P(2)} - \% \text{ mol S(2)}] \\ \% \text{ mol O(2)} &= \frac{\% \text{ mol O (1,2,3)}}{\% \text{ mol} \times \text{UFA}} \times [100 - \% \text{ mol P(2)} - \% \text{ mol S(2)}] \\ \% \text{ mol L (2)} &= \frac{\% \text{ mol L (1,2,3)}}{\% \text{ mol} \times \text{UFA}} \times [100 - \% \text{ mol P(2)} - \% \text{ mol S(2)}] \\ \% \text{ mol Ln (2)} &= \frac{\% \text{ mol Ln (1,2,3)}}{\% \text{ mol} \times \text{UFA}} \times [100 - \% \text{ mol P(2)} - \% \text{ mol S(2)}] \end{aligned} \right\} (5)$$

4.5.5.3.

1,3-pozisyonadaki yağ asitleri [P(1,3), S(1,3), Po(1,3) O(1,3), L(1,3) ve Ln(1,3)]:

$$\begin{aligned} \% \text{ mol P}(1,3) &= \frac{\% \text{ mol P}(1,2,3) - \% \text{ mol P}(2)}{2} + \% \text{ mol P}(1,2,3) \\ \% \text{ mol S}(1,3) &= \frac{\% \text{ mol S}(1,2,3) - \% \text{ mol S}(2)}{2} + \% \text{ mol S}(1,2,3) \\ \% \text{ mol Po}(1,3) &= \frac{\% \text{ mol Po}(1,2,3) - \% \text{ mol Po}(2)}{2} + \% \text{ mol Po}(1,2,3) \\ \% \text{ mol O}(1,3) &= \frac{\% \text{ mol O}(1,2,3) - \% \text{ mol O}(2)}{2} + \% \text{ mol O}(1,2,3) \\ \% \text{ mol L}(1,3) &= \frac{\% \text{ mol L}(1,2,3) - \% \text{ mol L}(2)}{2} + \% \text{ mol L}(1,2,3) \\ \% \text{ mol Ln}(1,3) &= \frac{\% \text{ mol Ln}(1,2,3) - \% \text{ mol Ln}(2)}{2} + \% \text{ mol Ln}(1,2,3) \end{aligned} \quad (6)$$

4.5.6. Trigliseridlerin hesaplanması

4.5.6.1. Tek yağ asitli TAG'lar (AAA, burada LLL, PoPoPo)

$$\% \text{ mol AAA} = \frac{\% \text{ mol A}(1,3) \times \% \text{ mol A}(2) \times \% \text{ mol A}(1,3)}{10000} \quad (7)$$

4.5.6.2. İki yağ asitli TAG'lar (AAB, burada PoPoL, PoLL)

$$\begin{aligned} \% \text{ mol AAB} &= \frac{\% \text{ mol A}(1,3) \times \% \text{ mol A}(2) \times \% \text{ mol B}(1,3) \times 2}{10000} \\ \% \text{ mol ABA} &= \frac{\% \text{ mol A}(1,3) \times \% \text{ mol B}(2) \times \% \text{ mol A}(1,3)}{10000} \end{aligned} \quad (8)$$

4.5.6.3. Üç yağ asitli TAG'lar (ABC, burada OLLn, PLLn, PoOLn, PPOln)

$$\begin{aligned} \% \text{ mol ABC} &= \frac{\% \text{ mol A}(1,3) \times \% \text{ mol B}(2) \times \% \text{ mol C}(1,3) \times 2}{10000} \\ \% \text{ mol BCA} &= \frac{\% \text{ mol B}(1,3) \times \% \text{ mol C}(2) \times \% \text{ mol A}(1,3) \times 2}{10000} \\ \% \text{ mol CAB} &= \frac{\% \text{ mol C}(1,3) \times \% \text{ mol A}(2) \times \% \text{ mol B}(1,3) \times 2}{10000} \end{aligned} \quad (9)$$

4.5.6.4. Eşdeğer karbon sayısı 42 olan triaçilgliseroller

Aşağıdaki ECN si 42 olan trigliseridler HPLC'de beklenen elüsyon sırasına göre denklem 7, 8 ve 9'a uygun olarak hesaplanır (normalde sadece üç pik).

LLL

PoLL ve pozisyonel izomer LPoL

OLLn ve pozisyonel izomerler OLnL ve LnOL

PoPoL ve pozisyonel izomer PoLPo

PoOLn ve pozisyonel izomerler OPoLn ve OLnPo

PLLn ve pozisyonel izomerler LLnP ve LnPL

PoPoPo

SLnLn ve pozisyonel izomerler LnSLn

PPoLn ve pozisyonel izomerler PLnPo ve PoPLn

Eşdeğer karbon sayısı 42 olan triaçilgliseroller, pozisyonel izomerleri dahil olmak üzere dokuz triaçilgliserolden oluşur. Sonuçlar virgülden sonra 2 basamak olarak verilmelidir.

5. Sonuçların değerlendirilmesi

GC den elde edilen verilerle hesaplanan teorik trigliserit miktarları ile HPLC analizi ile bulunan TAG miktarları karşılaştırılır. HPLC'den elde edilen ECN 42 verisi ile teorik olarak bulunan ECN 42 verisi arasındaki fark Türk Gıda Kodeksi-Zeytinyağı ve Pirina Yağı Tebliği'nde söz konusu zeytinyağının kategorisi için belirtilen değerlerden daha büyük ise numunenin tohum yağı içerdiği sonucuna varılır.

Sonuçlar 2 ondalık olarak verilmelidir.

6. Örnek:

4.5.1. GLC verisinden yağ asitlerinin mol cinsinden yüzdesinin hesaplanması (alan yüzdesi)

Aşağıdaki veriler yağ asidi kompozisyonu için GLC aracılığıyla elde edilmiştir:

Yağ Asidi	P	S	Po	O	L	Ln
Molekül Ağırlığı	256,4	284,5	254,4	282,5	280,4	278,4
Alan %'si	10,0	3,0	1,0	75,0	10,0	1,0

4.5.3. Alan %'sinin tüm yağ asitleri için mollere çevrilmesi

$$\text{mol P} = \frac{10}{256,4} = 0,03900 \text{ mol P} \quad \text{Bkz. formül (1)}$$

$$\text{mol S} = \frac{3}{284,5} = 0,01054 \text{ mol S} \quad \text{Bkz. formül (1)}$$

$$\text{mol Po} = \frac{1}{254,4} = 0,00393 \text{ mol Po} \quad \text{Bkz. formül (1)}$$

$$\text{mol O} = \frac{75}{282,5} = 0,26549 \text{ mol O} \quad \text{Bkz. formül (1)}$$

$$\text{mol L} = \frac{10}{280,4} = 0,03566 \text{ mol L} \quad \text{Bkz. formül (1)}$$

$$\text{mol Ln} = \frac{1}{278,4} = 0,003594 \text{ mol Ln} \quad \text{Bkz. formül (1)}$$

Toplam = 0,35822 mol TAG'lar

4.5.4 Yağ asitlerinin % 100 normalleştirilmesi

$$\% \text{ mol P (1,2,3)} = \frac{0,03900 \text{ mol P} \times 100}{0,35822} = \%10,888 \quad \text{Bkz. formül (2)}$$

$$\% \text{ mol S (1,2,3)} = \frac{0,01054 \text{ mol S} \times 100}{0,35822} = \%2,944 \quad \text{Bkz. formül (2)}$$

$$\% \text{ mol Po (1,2,3)} = \frac{0,00393 \text{ mol Po} \times 100}{0,35822} = \%1,097 \quad \text{Bkz. formül (2)}$$

$$\% \text{ mol O (1,2,3)} = \frac{0,26549 \text{ mol O} \times 100}{0,35822} = \%74,113 \quad \text{Bkz. formül (2)}$$

$$\% \text{ mol L (1,2,3)} = \frac{0,03566 \text{ mol L} \times 100}{0,35822} = \%9,956 \quad \text{Bkz. formül (2)}$$

$$\% \text{ mol Ln(1,2,3)} = \frac{0,00359 \text{ mol Ln} \times 100}{0,35822} = \%1,003 \quad \text{Bkz. formül (2)}$$

$$\% \text{ Toplam mol} = \% 100,0$$

TAG'ların 1,2,3- pozisyonlarında doymuş ve doymamış yağ asitlerinin toplamı;

$$\% \text{ mol SFA} = \%10,888 + \% 2,944 = \%13,831 \quad \text{Bkz. formül (3)}$$

$$\% \text{ mol UFA} = \% 100,000 - \%13,831 = \% 86,169 \quad \text{Bkz. formül (3)}$$

4.5.5. TAG'ların 2- ve 1,3- pozisyonlarında yağ asidi kompozisyonlarının hesaplanması

4.5.5.1. 2- pozisyonunda doymuş yağ asitleri [P(2) ve S(2)]

$$\% \text{ mol P(2)} = \%10,888 \times 0,06 = \%0,653\text{mol} \quad \text{Bkz. formül (4)}$$

$$\% \text{ mol S(2)} = \%2,944 \times 0,06 = \%0,177\text{mol} \quad \text{Bkz. formül (4)}$$

4.5.5.2. 1.3-pozisyonlarında doymamış yağ asitleri [Po(1,3), O(1,3), L(1,3) ve Ln(1,3)]

$$\% \text{ mol Po (2)} = \frac{\% 1,097}{\% 86,169} \times (100 - 0,659 - 0,177) = \%1,263\text{mol} \quad \text{Bkz. formül (5)}$$

$$\% \text{ mol O (2)} = \frac{\% 74,113}{\% 86,169} \times (100 - 0,659 - 0,177) = \%85,295\text{mol} \quad \text{Bkz. formül (5)}$$

$$\% \text{ mol L (2)} = \frac{\% 9,956}{\% 86,169} \times (100 - 0,659 - 0,177) = \% 11,458 \text{ mol} \quad \text{Bkz. formül (5)}$$

$$\% \text{ mol Ln (2)} = \frac{\% 1,003}{\% 86,169} \times (100 - 0,659 - 0,177) = \% 1,154 \text{ mol} \quad \text{Bkz. formül (5)}$$

4.5.5.3. 1,3- pozisyonlarında yağ asitleri [P(1,3), S(1,3), Po(1,3), O(1,3), L(1,3) ve Ln(1,3)]

$$\% \text{ mol P(1,3)} = \frac{10,888 - 0,659}{2} + 10,888 = \% 16,005 \text{ mol} \quad \text{Bkz. formül (6)}$$

$$\% \text{ mol S(1,3)} = \frac{2,944 - 0,177}{2} + 2,944 = \% 4,327 \text{ mol} \quad \text{Bkz. formül (6)}$$

$$\% \text{ mol Po(1,3)} = \frac{1,097 - 1,263}{2} + 1,097 = \% 1,015 \text{ mol} \quad \text{Bkz. formül (6)}$$

$$\% \text{ mol O(1,3)} = \frac{74,113 - 85,295}{2} + 74,113 = \% 68,522 \text{ mol} \quad \text{Bkz. formül (6)}$$

$$\% \text{ mol L(1,3)} = \frac{9,956 - 11,458}{2} + 9,956 = \% 9,205 \text{ mol} \quad \text{Bkz. formül (6)}$$

$$\% \text{ mol Ln(1,3)} = \frac{1,003 - 1,154}{2} + 1,003 = \% 0,927 \text{ mol} \quad \text{Bkz. formül (6)}$$

4.5.6. Trigliseridlerin hesaplanması

2- ve 1,3-pozisyonlarında hesaplanmış yağ asidi kompozisyonlarından (Yukarıya bakınız):

Yağ Asitleri	1,3-poz.	2-poz.
P	% 16,005	% 0,653
S	% 4,327	% 0,177
Po	% 1,015	% 1,263
O	% 68,522	% 85,295
L	% 9,205	% 11,458
Ln	% 0,927	% 1,154
Toplam	% 100,0	% 100,0

Aşağıdaki trigliseridler (triacilgliseroller-TAG) hesaplanmıştır:

LLL

PoPoPo

PoLL, 1 pozisyonel izomerli

SLnLn, 1 pozisyonel izomer

PoPoL, 1 pozisyonel izomer

PPoLn, 2 pozisyonel izomerler

OLLn, 2 pozisyonel izomerler

PLLn, 2 pozisyonel izomerler

PoOLn, 2 pozisyonel izomerler

4.5.6.1. Tek yağ asitli TAG'lar (LLL, PoPoPo)

Bkz. formül (7)

$$\% \text{ mol PoPoPo} = \frac{\%1,015 \times \%1,263 \times \%1,015}{10000} = 0,00013 \text{ mol PoPoPo}$$

$$\% \text{ mol LLL} = \frac{\%9,205 \times \%11,458 \times \%9,205}{10000} = 0,09708 \text{ mol LLL}$$

4.5.6.2. İki yağ asitli TAG'lar (PoLL, SLnLn, PoPoL)

Bkz. formül (8)

$$\% \text{ mol PoLL} + \text{LLPo} = \frac{\%1,015 \times \%11,458 \times \%9,205 \times 2}{10000} = 0,02141$$

$$\% \text{ mol LPoL} = \frac{\%9,205 \times \%1,263 \times \%9,205}{10000} = 0,01070$$

$$= 0,03211 \text{ mol PoLL}$$

$$\% \text{ mol SLnLn} + \text{LnLnS} = \frac{\%4,327 \times \%1,154 \times \%0,927 \times 2}{10000} = 0,00093$$

$$\% \text{ mol LnSLn} = \frac{\%0,927 \times \%0,177 \times \%0,927}{10000} = 0,00002$$

$$= 0,00095 \text{ mol SLnLn}$$

$$\% \text{ mol PoPoL} + \text{LPoPo} = \frac{\%1,015 \times \%1,263 \times \%9,205 \times 2}{10000} = 0,00236$$

$$\% \text{ mol PoLPo} = \frac{\%1,015 \times \%11,458 \times \%1,015}{10000} = 0,00118$$

$$= 0,0354 \text{ mol PoPoL}$$

4.5.6.3. İki yağ asitli TAG'lar (PoPLn, OLLn, PLLn, PoOLn)

Bkz. formül (9)

$$\% \text{ mol PPLn} = \frac{\%16,005 \times \%1,263 \times \%0,927 \times 2}{10000} = 0,00375$$

$$\% \text{ mol LnPPo} = \frac{\%0,927 \times \%0,653 \times \%1,015 \times 2}{10000} = 0,00012$$

$$\% \text{ mol PoLnP} = \frac{\%1,015 \times \%1,154 \times \%16,005 \times 2}{10000} = 0,00375$$

0,00762 mol PPOln

$$\% \text{ mol OLLn} = \frac{\%68,522 \times \%11,458 \times \%0,927 \times 2}{10000} = 0,14577$$

$$\% \text{ mol LnOL} = \frac{\%0,927 \times \%85,295 \times \%9,205 \times 2}{10000} = 0,14577$$

$$\% \text{ mol LLnO} = \frac{\%9,205 \times \%1,154 \times \%68,522 \times 2}{10000} = 0,14577$$

0,43671 mol OLLn

$$\% \text{ mol PLLn} = \frac{\%16,005 \times \%11,458 \times \%0,927 \times 2}{10000} = 0,03400$$

$$\% \text{ mol LnPL} = \frac{\%0,927 \times \%0,653 \times \%9,205 \times 2}{10000} = 0,00111$$

$$\% \text{ mol LLnP} = \frac{\%9,205 \times \%1,154 \times \%16,005 \times 2}{10000} = 0,03400$$

0,06911 mol PLLn

$$\% \text{ mol PoOLn} = \frac{\%1,015 \times \%85,295 \times \%0,927 \times 2}{10000} = 0,01605$$

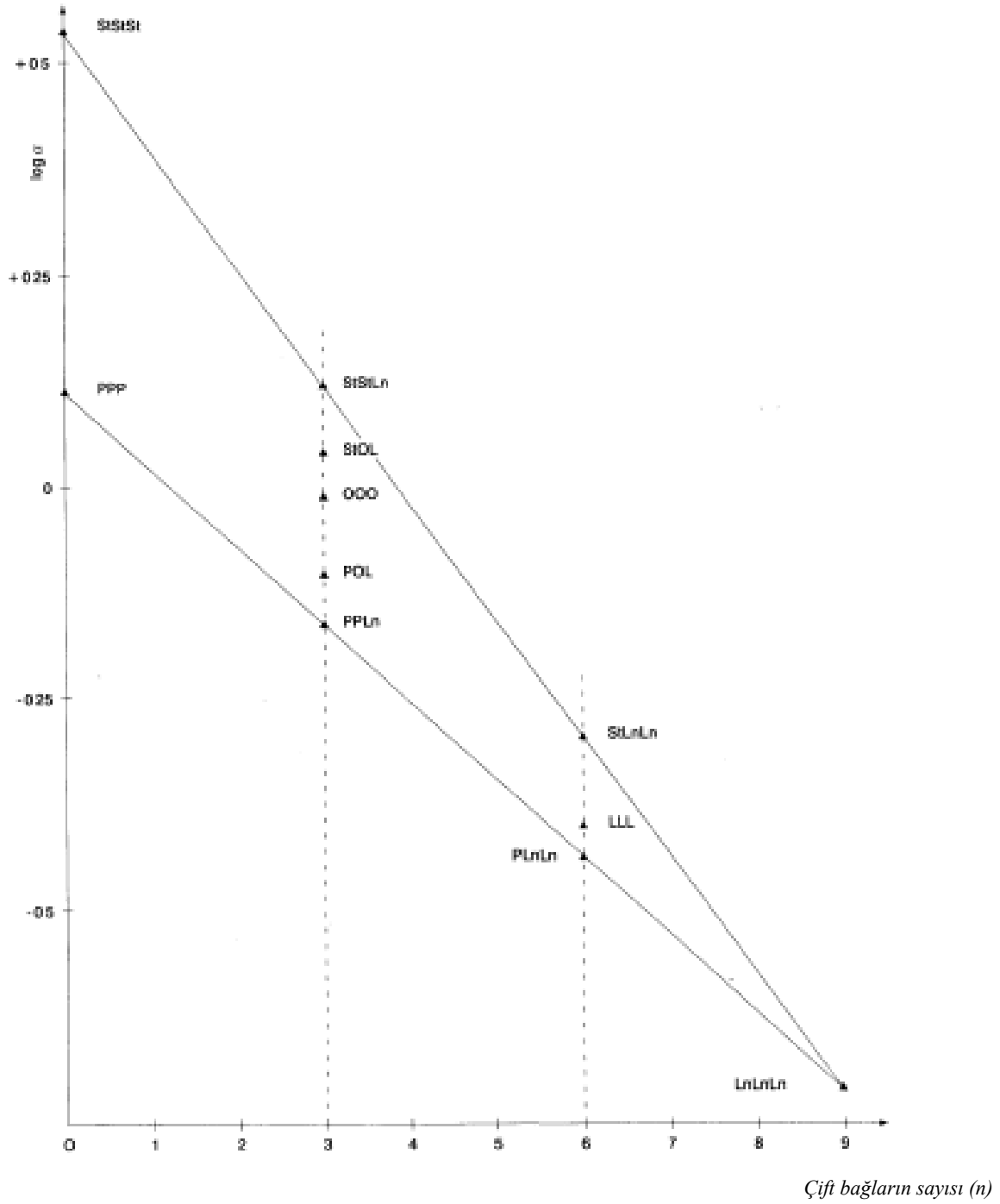
$$\% \text{ mol LnPoO} = \frac{\%0,927 \times \%1,263 \times \%68,522 \times 2}{10000} = 0,01605$$

$$\% \text{ mol OLnPo} = \frac{\%68,522 \times \%1,154 \times \%1,015 \times 2}{10000} = 0,01605$$

0,04815 mol PoOLn

ECN42 = 0,69540 mol TAGler

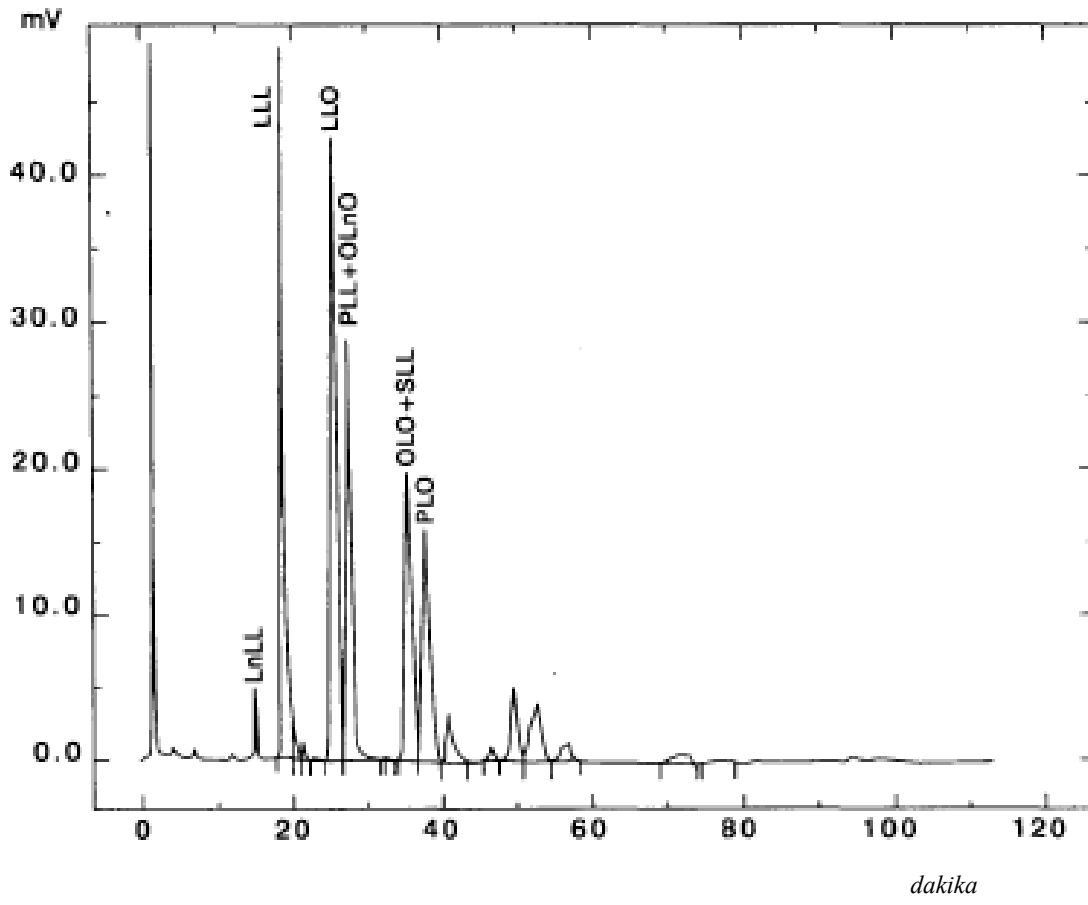
Not: Hesaplamalar pratik olarak bilgisayar programı yardımıyla yapılabilir.



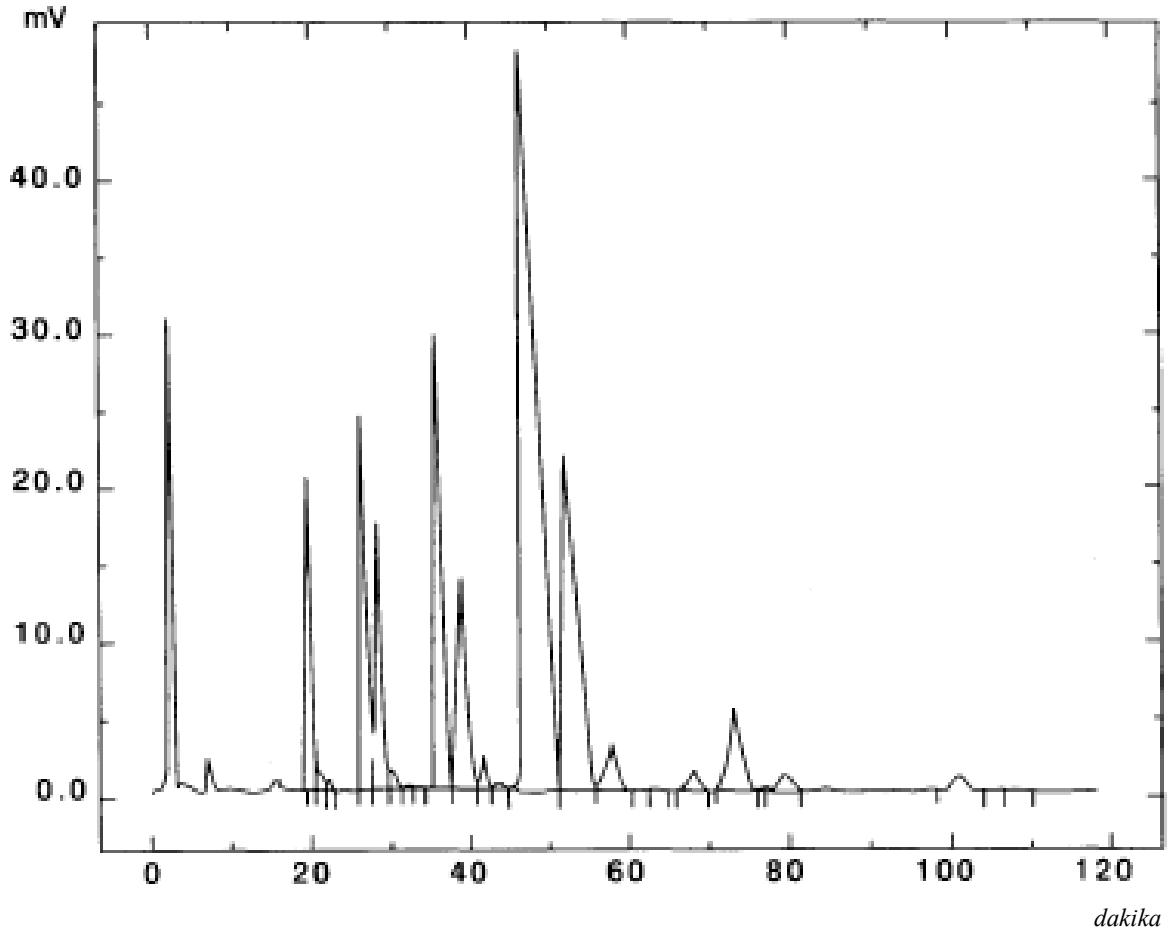
Şekil 1

*f*ye (çift bağların sayısı) karşı log α grafiği

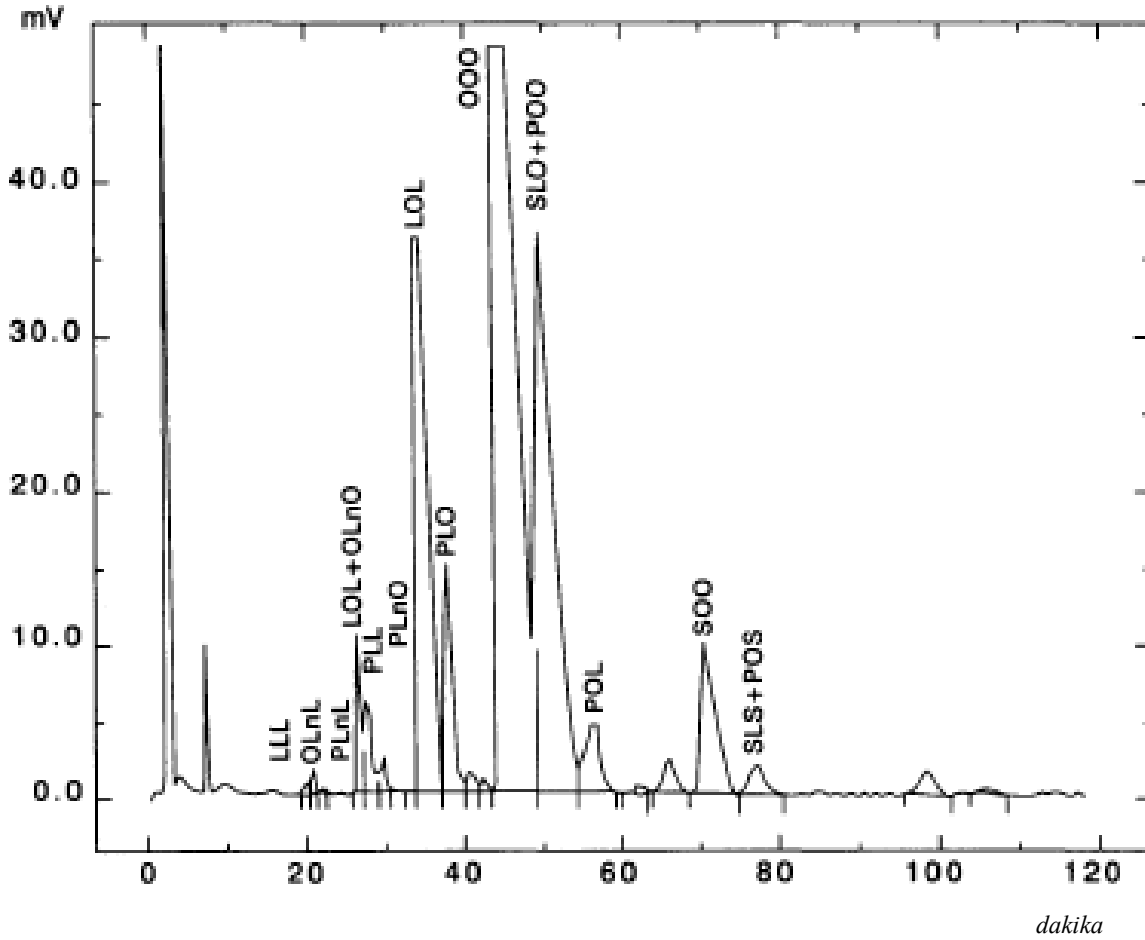
Not: La = laurik asit; My = miristik asit; P = palmitik asit; St = stearik asit; O = oleik asit; L = linoleik asit; Ln = linolenik asit.



Şekil 2
Soya Yağı



Şekil 3
Soyayağı/zeytinyağı 30/70



Şekil 4
Zeytinyağı

EK – 14

Kapiler Gaz Kromatografisi ile Alifatik Alkol Miktarının Tayini

1. Kapsam

Bu yöntem, katı ve sıvı yağların alifatik alkol içeriklerinin saptanması prosedürünü tanımlar.

2. Prensiptir

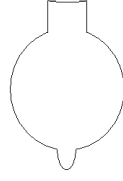
İç standart olarak 1-eikosanol ilave edilmiş yağ numunesi etanollü potasyum hidroksit çözeltisi ile sabunlaştırılır ve bunu takiben sabunlaşmayan maddeler dietil eterle ekstrakte edilir.

Alkol fraksiyonu diğer sabunlaşmayan maddelerden bazik silikajel plaka üzerinde ince tabaka kromatografisi kullanılarak ayrılır. Silikajel üzerinden alkol bandı alınır ve trimetil-silil esterlerine dönüştürülerek GC ile analiz edilir.

3. Cihaz ve malzemeler

- 3.1. Geri soğutucu
- 3.2. 500 mL' lik ayırma hunileri
- 3.3. 250 mL'lik şilifli balon
- 3.4. 20x20 cm cam plakaya uygun ince-tabaka kromatografisi için gerekli olan malzemeler
- 3.5. 366 veya 254 nm dalga boyu olan UV lamba
- 3.6. 100 μ L ve 500 μ L'lik enjektörler

- 3.7. Huni ve siyah bant süzgeç kâğıdı
- 3.8. 50 mL'lik ağzı şilifli armudi balon



- 3.9. İncelen bir dip kısmı ve contalı kapağı olan 10 mL'lik deney tüpü
- 3.10. Kapiler kolonlu split –splitless enjeksiyon sistemi olan GC
- 3.10.1. Kolonlar için termostat kontrollü, $\pm 1^\circ$ C hassasiyetle çalışabilen fırın
- 3.10.2. Split sisteme uygun liner içeren ve sıcaklığı ayarlanabilen enjeksiyon bloğu
- 3.10.3. Alev-iyonizasyon detektörü
- 3.10.4. Gerekli bilgisayar sistemi ve bilgisayar sistemine bağlı yazıcı
- 3.11. Uzunluğu 20 - 30 m, iç çapı 0,25 – 0,32 mm, film kalınlığı 0,10 – 0,30 μ m olan, camdan ya da eritilmiş silisten kapiler kolon(SE-52, SE-54 veya eşdeğeri kolon)
- 3.12. Sertleştirilmiş iğneli 10 μ L'lik gaz kromatografi enjektörü.
- 3.13. Analitik terazi (0,1 mg hassasiyetli)

4. Reaktifler

- 4.1. 2 N etanollü potasyum hidroksit çözeltisi, 130 g potasyum hidroksit (en az % 85 saflıkta) 200 mL saf su içinde soğutulmuş çözünür ve etanolla bir litreye tamamlanır. Çözelti ağzı iyi kapatılmış koyu renkli cam şişelerde saklanır.
- 4.2. Analitik saflıkta dietil eter
- 4.3. Analitik saflıkta susuz sodyum sülfat
- 4.4. Silikajel ile kaplanmış, floresan özelliği olmayan, 0,25 mm kalınlıkta cam plakalar. (Kullanıma hazır olarak bulunmaktadır)
- 4.5. 0,2 N etanollü potasyum hidroksit çözeltisi, 13 g potasyum hidroksit 20 mL saf su içinde çözünür ve etanolla 1 litreye tamamlanır.
- 4.6. Kromatografik saflıkta benzol
- 4.7. Kromatografik saflıkta aseton
- 4.8. Kromatografik saflıkta hekzan
- 4.9. Kromatografik saflıkta dietil eter
- 4.10. Kromatografik saflıkta kloroform
- 4.11. İnce-tabaka kromatografisi için referans çözelti: 1-eikosanol kloroform içindeki % 0,5'lik çözeltisi
- 4.12. % 0,2 lik etanollü 2,7-dikloroflorosein çözeltisi. (Birkaç damla 2 N etanollü potasyum hidroksit çözeltisi ilave edilerek hafifçe bazik hale getirilir.)
- 4.13. Kromatografik saflıkta susuz piridin
- 4.14. Heksametil disilazan.
- 4.15. Trimetilklorosilan.
- 4.16. 20-28 karbonlu alifatik alkol trimetilsilil eterlerinin referans çözeltileri (bunları içeren yağlardan elde edilen saf alkol ya da alkol karışımları günlük hazırlanır.)
- 4.17. Kloroformda hazırlanmış % 0,1'lik (m/v) 1-eikosanol çözeltisi, (iç standart)

4.18. Taşıyıcı gazlar: Kromatografik saflıkta hidrojen veya helyum

4.19. Yardımcı gazlar: Kromatografik saflıkta hidrojen

Kromatografik saflıkta kuru hava

4.20. Kromatografik saflıkta azot gazı

4.21. Fenolftalein (%1'lik etanollü çözeltisi)

5. Prosedür

5.1. Sabunlaşmayan maddelerin hazırlanması

5.1.1. 500 µL'lik enjektör kullanarak 250 mL'lik balona, numunenin alifatik alkol içeriğinin yaklaşık % 10'u kadar % 0,1'lik 1-eikosanol ilave edilir. Örneğin, 5 g numune için zeytinyağında 250 µL, pirina yağında ise 1500 µL % 0,1 1-eikosanol çözeltisi ilave edilir. Azot gazı altında uçurulur ve nemi alınmış, filtre edilmiş numuneden balona tam 5 g tartılır.

5.1.2. 50 mL 2 N etanolik potasyum hidroksit çözeltisi ilave edilir, geri soğutucuya takılır. Sabunlaşma gerçekleşene kadar (çözelti berrak hale gelene kadar) mantolu ısıtıcıda karıştırılarak ısıtılır. Isıtmaya 20 dk daha devam edilir ve sonra geri soğutucunun üzerinden 50 mL saf su ilave edilir, geri soğutucu çıkarılır ve balon yaklaşık 30°C'ye soğutulur.

5.1.3. Balonun içindekiler birkaç defa saf suyla çalkalanarak 500 mL'lik ayırma hunisine dikkatlice aktarılır. Kullanılan saf su toplam 50 mL olmalıdır. Yaklaşık 80 mL dietil eter ilave edildikten sonra 30 s kadar güçlü bir şekilde çalkalanıp faz ayrımı için bekletilir. (Herhangi bir emülsiyon oluşursa az miktarda etil veya metil alkol ilavesiyle yok edilebilir.)

Alt fazı ayırmak için ikinci bir ayırma hunisi kullanılır. Üst fazdan her sefer 60-70 mL dietil eter kullanılarak aynı şekilde iki ekstraksiyon daha yapılır.

5.1.4. Eter ekstraktları tek bir ayırma hunisinde toplanır ve yıkama suyu nötr bir reaksiyon verene kadar (fenol ftalein indikatörlüğünde) saf su (her seferde 50 mL) ile yıkanır.

Yıkama suyu atıldıktan sonra, eter fazı susuz sodyum sülfat ile filtre edilerek darası alınmış 250 mL'lik şilifli balona süzülür. Huni az miktarda dietil eter ile yıkanır.

5.1.5. Birkaç mL dietil eter kalıncaya kadar vakumlu döner buharlaştırıcıda uçurulur. Hafif bir vakum altında veya bir azot akımı ile kuru hale getirilir, kurutmaya 100 °C'deki etüvde yaklaşık 15dk devam edilir ve desikatörde soğutulduktan sonra tartılır.

5.2. Alifatik alkol fraksiyonlarının ayrılması

5.2.1. Bazik plakaların hazırlanması: Silikajel plakaları 0,2 N etanollü potasyum hidroksit çözeltisine 10 s süreyle tamamen daldırılır, sonra kuruması için kurutma dolabında iki saat bırakılır ve son olarak 100 °C'deki etüvde 1 saat bekletilir.

Etüvden çıkarılır ve kullanılmaya kadar kalsiyum klorür bulunan plaka rafında bekletilir. Bu şekilde bir işleme tabi tutulan plakalar 15 gün içerisinde kullanılmalıdır. Plakalar kullanılmadan önce 100 °C'lik etüvde 5-10 dk tutulabilir.

Not 1: Bazik silikajel plakaları alkolik fraksiyonu ayırmak için kullanılacağında sabunlaşmayan maddeleri alüminyum oksit ile işleme tabi tutmaya gerek yoktur. Bu yolla asidik tüm bileşikler (yağ asitleri ve diğerleri) belirli bir bantta tutulacak ve hem sterol bandı hem de alifatik ve triterpen alkol bantları açıkça ayrılacaktır.

5.2.2. 65:35 (v/v) hekzan/dietil eter karışımı yürütme tankı içine yaklaşık 1 cm yükseklikte doldurulur. Buna alternatif olarak 95:5 (v/v) benzol/aseton karışımı kullanılabilir. Yürütme tankının kapağı kapatılır ve sıvı-buhar dengesi oluşması için yaklaşık yarım saat kadar bu şekilde bekletilir. Yürütme tankının iç yüzeyine çözeltiye batırılmış filtre kâğıdı şeritleri konulabilir. Bu işlem, taşınma zamanını yaklaşık üçte bir oranında azaltır ve bileşenlerin daha düzgün ve belirgin bir şekilde ayrımını sağlar.

Not 2: Yürütme tankının içindeki çözelti her çalışmada yenilenmelidir.

- 5.2.3. Sabunlaşmayan maddelerin kloroformda yaklaşık % 5'lik çözeltisi hazırlanır. Çözelti, 100 µL'lik enjektör kullanarak 300 µL'lik kısmı silikajel plakaya, alt ucuna yaklaşık 2 cm mesafede mümkün olduğu kadar ince ve düzgün bir çizgi halinde verilir. (Damlacıkların küçük olmasına ve birbiriyle karışmayacak şekilde verilmesine dikkat edilmelidir.) Kontrol için plakanın bir ucuna, çizgi ile aynı hizaya 2-3 µL referans çözeltisi damlatılır, böylece alifatik alkol bandı taşınmadan sonra tanımlanabilir.
- 5.2.4. Plaka 5.2.2.'de belirtildiği şekilde hazırlanmış olan yürütme tankına konular. Ortam sıcaklığı 15-20 °C arasında tutulmalıdır. Yürütme tankının kapağı derhal kapatılır ve numunenin taşınması plakanın üst kenarının yaklaşık 1 cm altına gelinceye kadar işleme devam edilir. İşlem sonunda tanktan çıkarılan plaka kuruması için bir süre normal ortamda ya da sıcak hava akımında bekletilir.
- 5.2.5. Plakaya % 0,2'lik 2,7-dikloroflorosein çözeltisi homojen şekilde püskürtülür ve hafifçe kurutulur. UV ışık altında plaka üzerinde, referans gölge esas alınarak alifatik alkol bandı sınırları işaretlenir.

Not 3: Alifatik ve terpenik alkol bantları bazı alifatik alkollerin terpenik alkoller bandına karışması ihtimaline karşı bantlar birlikte gruplandırılmalıdır.

- 5.2.6. Metal bir kazıma spatulası kullanarak silikajel işaretlenmiş alandan kazınır. Kazınan silikajel içinde süzgeç kağıdı yerleştirilmiş huniye konular. 10 mL sıcak kloroform ilave edilir, spatula ile dikkatlice karıştırılır süzüntü darası alınmış 50 mL'lik ağız şilifli armudi balonda toplanır.

Hunideki kalıntı dietil eterle üç kez yıkanarak (her sefer yaklaşık 10 mL) süzüntü aynı balona toplanır. Süzüntü 4-5 mL kalıncaya kadar dönerli vakum buharlaştırıcıda düşük sıcaklıkta (40 °C'yi aşmayacak şekilde) uçurular. Kalan çözelti kuru hale gelene kadar hafif bir azot akımı altında uçurular.

Birkaç damla aseton kullanılarak kuruyana kadar tekrar uçurular ve ağız şilifli armudi balonda kalan, alifatik alkol fraksiyonu tartılır.

- 5.3. Trimetilsilil eterlerin hazırlanması.

- 5.3.1. 9:3:1 (v/v/v) oranında piridin/heksametil disilazan/trimetil klorosilan karışımından oluşan silillendirme reaktifi (Not 4) alifatik alkol fraksiyonu içeren ağız şilifli armudi balona alifatik alkol miktarının her miligramı için 50 µL oranında ilave edilir. Nem analiz sonucunu olumsuz etkilemektedir (Not 5).

Not 4: Piyasada kullanıma hazır silillendirme reaktifi bulunmaktadır (örneğin bis-trimetilsilil, triflor asetamid + % 1 trimetil klorosilan). Bunlar kullanıldığında eşit miktarda susuz piridin ilave edilir.

- 5.3.2. Ağız şilifli armudi balonun ağız kapatılır, alifatik alkoller tamamen çözünene kadar (ters çevirmeden) dikkatlice balon döndürülerek cidarlarda kalan alifatik alkollerin de silillendirilmesi sağlanır. Ortam sıcaklığında 15 dk kadar bekletilir. Berrak çözelti GC'ye enjeksiyon için hazırdır.

Not 5: Oluşabilecek hafif opaklık normaldir ve herhangi bir soruna yol açmaz. Beyaz bir parçacığın veya pembemsi rengin oluşması nemliliğin mevcut olduğunu veya reaktifin bozulduğunu gösterir. Eğer bunlar gözlenirse analiz mutlaka tekrarlanmalıdır.

- 5.4. Gaz kromatografisi ile analiz

- 5.4.1. Ön işlemler

- 5.4.1.1. Kolon giriş kısmı split enjeksiyon sistemine, çıkış kısmı dedektöre bağlantı yapılarak gaz kromatografisine takılır. Gaz kromatografisi cihazının genel kontrolü yapılır (gaz akışı, detektör ve kayıt edicinin işleyişinin etkinliği vb)

- 5.4.1.2. Eğer kolon ilk kez kullanılacak ise şartlandırılmalıdır. Kolonun içinden düşük akış hızı ile taşıyıcı gaz geçirilir. Kolon, çalışma sıcaklığının en az 20 °C'nin üzerinde olacak şekilde en az 2 saat süre ile şartlandırılır (Not 6).

Cihaz çalışma şartları ayarlanır (gaz akışı düzenlenir, ateşleme yapılır, fırın, detektör ve enjektör sıcaklığı ayarlanır vb.). Baseline, herhangi bir pik olmaksızın doğrusal olmalı ve herhangi bir sapma göstermemelidir.

Negatif doğrusal sapma : Kolon bağlantılarının doğru yapılmadığını gösterir.

Pozitif sapma : Kolonun yeterince şartlanmadığını gösterir.

Not 6: Şartlandırma sıcaklığı kolonun dayanabildiği en yüksek sıcaklığın 20 °C altında olmalıdır.

5.4.2. Çalışma şartları

5.4.2.1. Çalışma şartları aşağıdaki şekildedir:

- Fırın sıcaklığı: 180 °C başlangıç sıcaklığında 8 dk bekletildikten sonra 5 °C/dk sıcaklık artışı ile 260 °C ye çıkarılır ve bu sıcaklıkta 15 dk bekletilir.
- enjeksiyon sıcaklığı: 280 °C,
- detektör sıcaklığı: 290 °C,
- taşıyıcı gazın doğrusal ivmesi: helyum 20 - 35 cm/sn, hidrojen 30-50 cm/s,
- split oranı: 1:50-1:100 aralığı,
- cihaz hassasiyeti: en düşük değerin 4 ile 16 katı arasında,
- enjekte edilen madde miktarı: Trimetilsilil ester çözeltisinin 0,5-1 µL'si.

Aşağıdaki gerekliliklere uygun bir kromotogram almak için bu koşullar değiştirilebilir:

- Alkol C26 için alıkonma zamanı 18 ± 5 dk ,
- Alkol C22 piki zeytinyağı için tam kromotogramın % 80 ± 20 'i; tohum yağı için tam kromotogramın % 40 ± 20 'si.
- Tüm alkoller mutlaka ayrılmalıdır. Ayrılmaya ek olarak aynı zamanda pikler de birbirinden bağımsız olmalıdır. Yani pik bir sonraki pikten önce mutlaka baseline'a dönmelidir.

5.4.2.2. Yukarıdaki şartlar alkollerin standart TMSE karışımı tekrar tekrar enjekte edilerek ve çalışma şartları mümkün olan en iyi sonuçları verecek şekilde ayarlanarak kontrol edilir.

5.4.2.3. Piklerin integrasyonu için parametreler dikkate alınan piklerin alanlarının doğru bir şekilde değerlendirilmesini sağlayacak şekilde ayarlanmalıdır.

5.4.3. Analitik prosedür

5.4.3.1. 10 µL'lik enjektör kullanarak 1 µL hekzan alınır, içine 0,5 µL hava çekilir ve bunu takiben örnekten 0,5 - 1 µL alınır. İğneyi boşaltmak için enjektörün pistonu kaldırılır. İğne enjeksiyon ünitesinin zarına batırılır ve bir-iki saniye sonra hızlıca enjekte edilir, beş saniye kadar sonra iğne yavaşça çıkarılır.

5.4.3.2. Mevcut alifatik alkollerin trimetilsilil esterleri tamamen elde edilinceye kadar işleme devam edilir.

Baseline düz olmalıdır.

5.4.4. Piklerin tanımlanması

Her bir pikin tanımlanması alıkonma zamanları ve aynı koşullar altında analiz edilen alifatik alkoller Trimetilsilil ester karışımlarının alıkonma zamanlarının karşılaştırılmasıyla yapılır.

Natürel zeytinyağının alifatik alkol kromatogramı Şekil 1'de gösterilmektedir.

5.4.5. Miktarın hesaplanması

5.4.5.1. 1-eikosanol ile C22, C24, C26 ve C28 alifatik alkollerinin pik alanları integratör kullanılarak hesaplanır.

5.4.5.2. mg/1000 g örnek cinsinden ifade edilen her bir alifatik alkol miktarı aşağıdaki şekilde den hesaplanır:

$$\text{Alkol } x = \frac{A_x \times m_s \times 1000}{A_s \times m}$$

Burada:

A_x = Alkol x'in pik alanı;

A_s = 1-eikosanol pik alanı

m_s = miligram cinsinden eklenen 1-eikosanol kütlesi;

m = gram cinsinden saptama için alınan numunenin kütlesi.

6. Sonuçların değerlendirilmesi

6.1. Her bir alifatik alkol miktarı örneğin mg/1000 g'ı cinsinden ve toplamları da "toplam alifatik alkol" olarak kaydedilir.

BİLGİ/AÇIKLAMALAR

Doğrusal gaz hızının saptanması

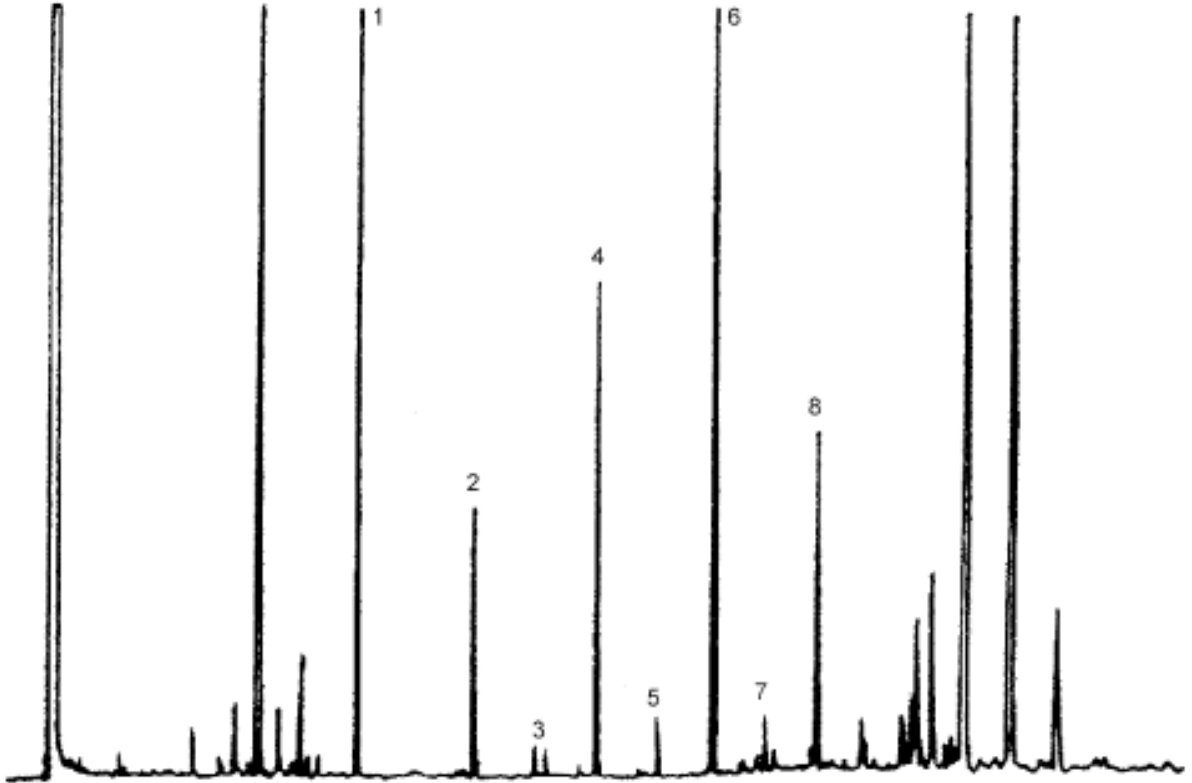
Normal çalışma şartları ayarladıktan sonra gaz kromatografi cihazına 1-3 µL metan veya propan enjekte edilir. Enjekte edildiği andan pikin oluştuğu ana kadar gazın bütün kolonu geçmesi için gereken zaman ölçülür (tM)

Doğrusal hız, cm/saniye cinsinden "L/tM" formülü ile hesaplanır.

Burada;

L: kolonun cm. cinsinden uzunluğu

tM: ise saniye cinsinden ölçülmüş zamandır



Şekil 1

Natürel zeytinyağının alkol fraksiyonunun kromatogramı

- 1 = Eikosanol
- 2 = Dekosanol
- 3 = Trikosanol
- 4 = Tetrakosanol

- 5 = Pentakosanol
- 6 = Heksakosanol
- 7 = Heptakosanol
- 8 = Oktakosanol