

TEBLİĞ

Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığından:

TÜRK GIDA KODEKSİ ZEYTİNYAĞI VE PİRİNA YAĞI

ANALİZ METOTLARI TEBLİĞİ

(TEBLİĞ NO: 2014/53)

Amaç

MADDE 1 – (1) Bu Tebliğın amacı, zeytinyağı ve pirina yağının resmi kontrolleri için analiz metotlarını belirlemektir.

Kapsam

MADDE 2 – (1) Bu Tebliğ, zeytinyağı ve pirina yağının analiz metotlarını kapsar.

Dayanak

MADDE 3 – (1) Bu Tebliğ, 29/12/2011 tarihli ve 28157 3 üncü mükerrer sayılı Resmî Gazete’de yayımlanan Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliğine dayanılarak hazırlanmıştır.

Tanımlar

MADDE 4 – (1) Bu Tebliğde geçen;

- a) Bakanlık: Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığını,
 - b) Karar ağacı: Bu Tebliğ kapsamında yer alan ürünlerin özelliklerini tespit etmek için kullanılabilen sistematik işlemler dizisini,
 - c) UZK: Uluslararası Zeytin Konseyi’ni (IOC),
- ifade eder.

Karar ağaçları

MADDE 5 – (1) Bu Tebliğ kapsamındaki ürünlerin değeriendirilmesinde Ek-1’de yer alan karar ağaçları kullanılabilir.

(2) Karar ağacının kullanılmadığı durumlarda analizler 7/8/2010 tarihli ve 27665 sayılı Resmî Gazete’de yayımlanan Türk Gıda Kodeksi Zeytinyağı ve Pirina Yağı Tebliğinde yer alan kriterler dikkate alınarak uygun bir sıralamada gerçekleştirilebilir.

Analiz metotları

MADDE 6 – (1) Bu Tebliğ kapsamında yer alan ürünlerin resmi kontrolü için analiz metotları aşığıdaki 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 Tayini
- ç) Ek-5: Kapiler Kolonlu Gaz Kromatografisi ile Sterol ve Eritrodiol+Uvaol (Triterpenik dialkoller) Bileşiminin ve Miktarının Tayini
- d) Ek-6: Kapiler Kolonlu Gaz Kromatografisi ile Mumsu Maddelerin, Yağ Asitleri Metil Esterleri ve Yağ Asitleri Etil Esterlerinin Tayini
- e) Ek-7: 2- Gliseril Monopalmitat Yüzde Miktarının Tayini
- f) Ek-8: Ultraviyole Işığında Özgöl Soğurma Tayini
- g) Ek-9A: Yağ Asitlerinin Metil Esterlerinin Gaz Kromatografisi ile Tayini
- ğ) Ek-9B: Yağ Asitlerinin Metil Esterlerinin Hazırlanması
- h) Ek-10: Uçucu Halojenli Çözücülerin Tayini
- ı) Ek-11: Natürel Zeytinyağlarına Ait Duyusal Özelliklerin Tespiti
- i) Ek-12: Pirinada Yağ Miktarı Tayini
- j) Ek-13: Stigmastadienlerin Tayini
- k) Ek-14: Gerçek ve Teorik ECN 42 Triglicerid İçeriği Arasındaki Maksimum Farkın Tayini
- l) Ek-15: Kapiler Kolonlu Gaz Kromatografisi ile Alifatik Alkol Miktarının Tayini
- m) Ek-16: Zeytinyağında Yabancı Yağın Tespiti

Avrupa Birliği mevzuatına uyum

MADDE 7 – (1) Bu Tebliğin hazırlanmasında, 11/7/1991 tarihli ve 2568/91 EEC sayılı Zeytinyağı ve Pirina Yağının Karakteristiklerini ve İlgili Analiz Metotlarını Belirleyen Komisyon Tüzüğü dikkate alınmıştır.

Yürürlükten kaldırılan tebliğ

MADDE 8 – (1) 7/8/2010 tarihli ve 27665 sayılı Resmî Gazete’de yayımlanan Türk Gıda Kodeksi Zeytinyağı ve Pirina Yağı Numune Alma ve Analiz Metotları Tebliği (Tebliğ No: 2010/36) yürürlükten kaldırılmıştır.

Geçiş hükümleri

GEÇİCİ MADDE 1 – (1) Bu Tebliğin yayımı tarihinden önce resmi kontroller için analiz yapan kurum ve kuruluşlar 30/6/2015 tarihine kadar bu Tebliğ hükümlerine uyarlar.

(2) Bu Tebliğin yayımı tarihinden önce resmi kontroller için analiz yapan kurum ve kuruluşlar bu Tebliğ hükümlerine uyum sağlayana kadar 8 inci madde ile yürürlükten kaldırılan Tebliğ hükümlerine uyarlar.

Yürürlük

MADDE 9 – (1) Bu Tebliğ yayımı tarihinde yürürlüğe girer.

Yürütme

MADDE 10 – (1) Bu Tebliğ hükümlerini Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanı yürütür.

EK-1

Karar Ağacı

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

Zeytinyağı ve pirina yağının kategorilerinin doğrulanması amacıyla alınan numuneler, aşağıda verilen karar ağaçlarına göre veya TGK-Zeytinyağı ve Pirina Yağı Tebliğinde yer alan kriterler dikkate alınarak uygun bir sıralamada analiz edilir.

Tüm analiz sonuçları beyan edilen yağ kategorisinin özelliklerine uygun ise, yağın beyana uygun olduğu rapor edilir.

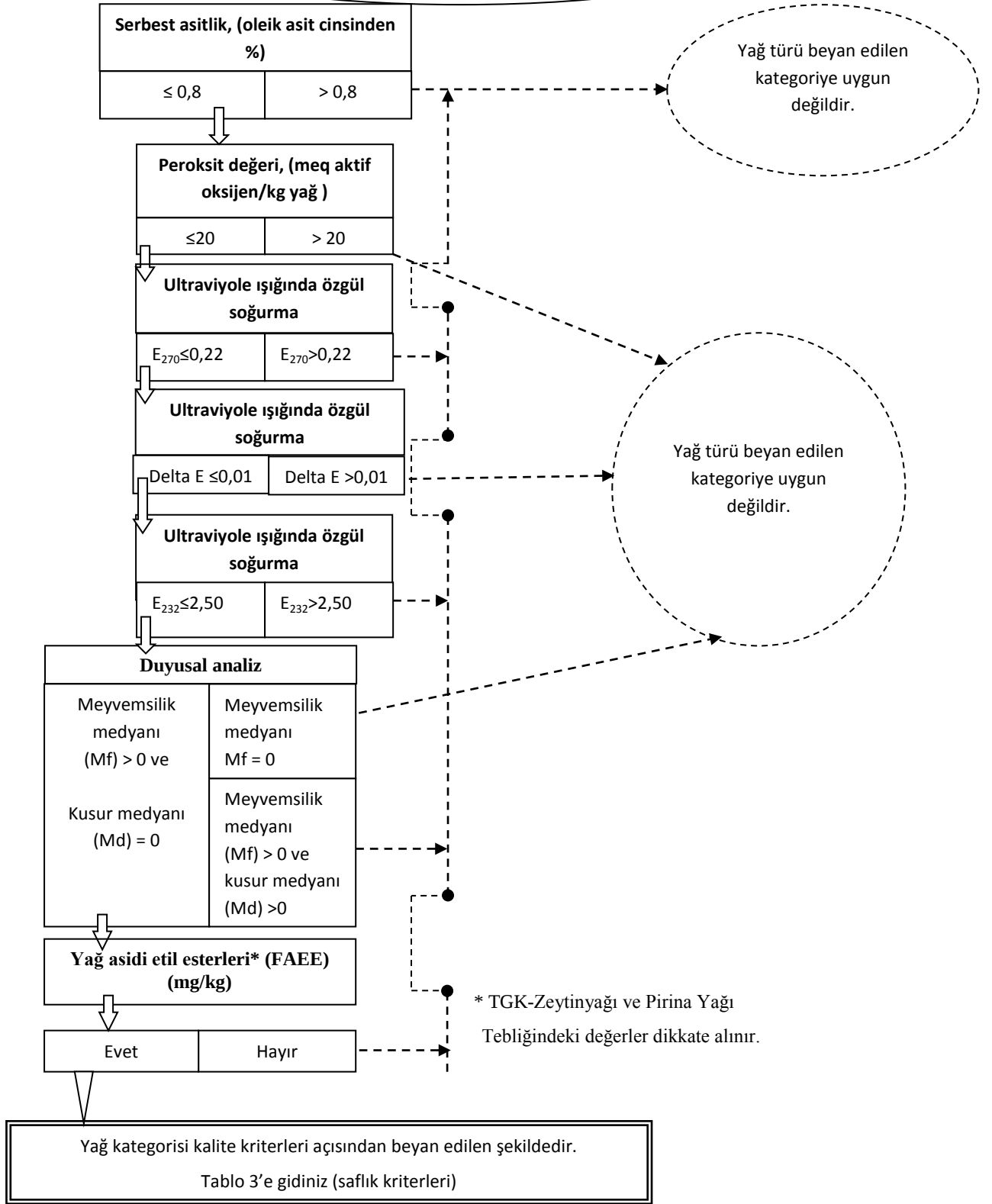
Tek bir analiz sonucu beyan edilen yağ kategorisine uygun değilse, yağın beyana uygun olmadığı rapor edilir.

Notlar:

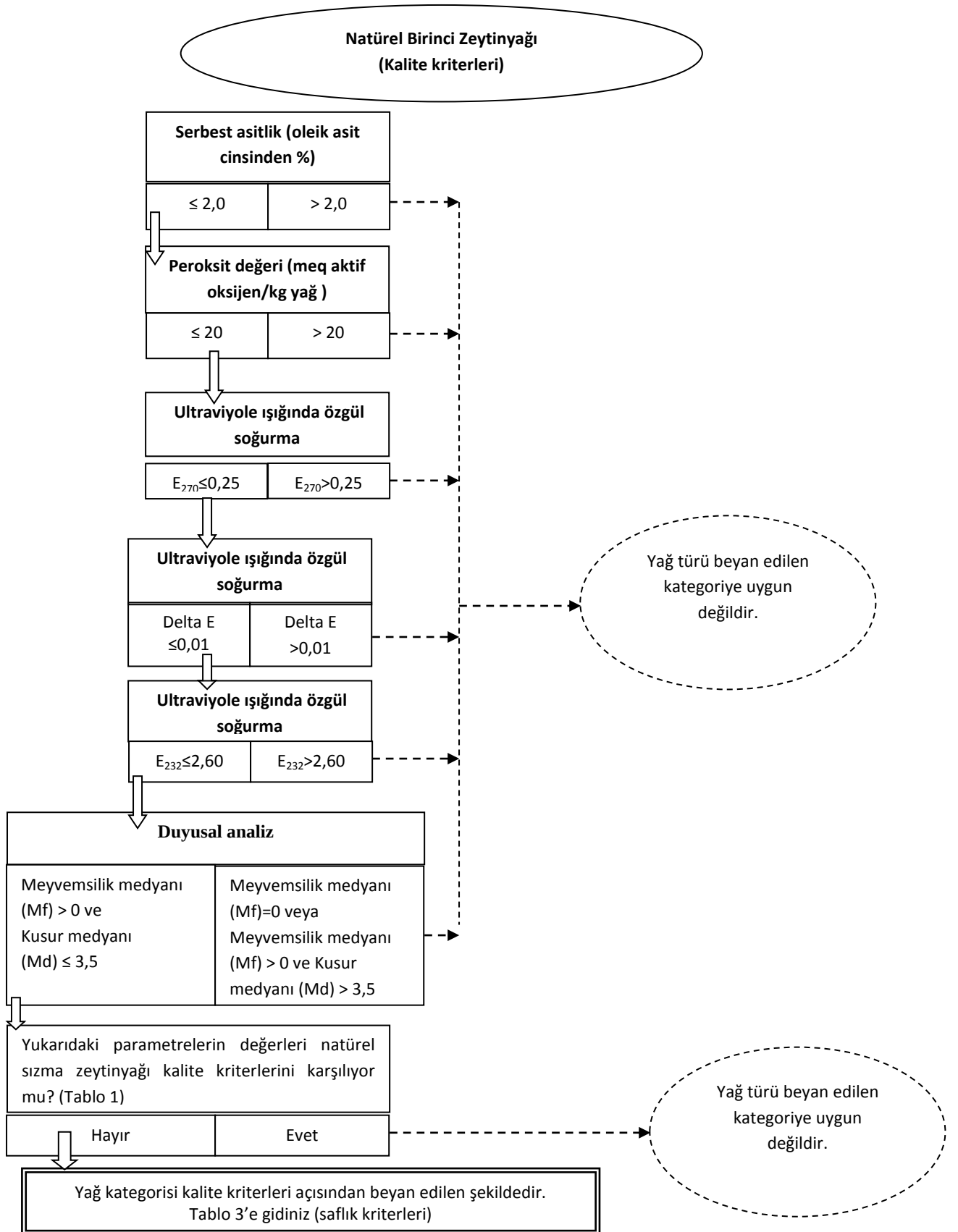
1. Analiz sonuçları Türk Gıda Kodeksi Zeytinyağı ve Pirina Yağı Tebliğinde belirtilen kalite ve saflık kriterleri ile aynı ondalıkla ifade edilir.
2. Analiz sonuçları ifade edilirken virgülden sonraki rakam 4'ten büyükse değer 1 artırılır.

Tablo 1

**Natürel Sızma Zeytinyağı
(Kalite kriterleri)**

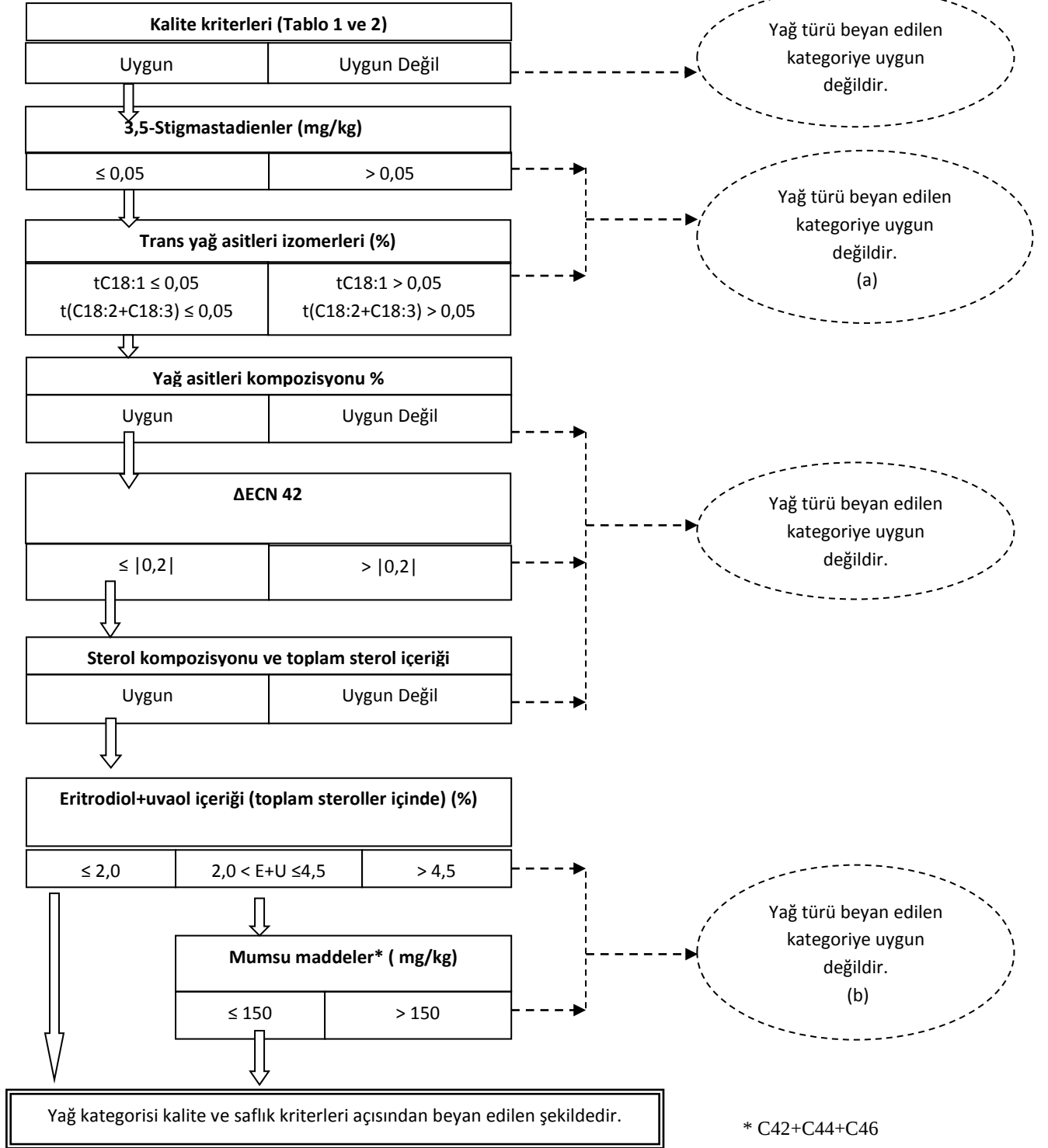


Tablo 2



Tablo 3

Natürel Sızma ve Natürel Birinci Zeytinyağları
(Saflik kriterleri)



(a) Rafine yağın mevcudiyeti (rafine zeytinyağı veya diğer tohum yağları)

(b) Pirina yağının mevcudiyeti

Tablo 4**Karar Ağacında Yer Alan Analizler İle Eklerde Yer Alan Analizler Arasındaki Eşleştirme Tablosu**

Serbest Asitlik	Ek – 2	<i>Serbest Yağ Asitliği Tayini</i>
Peroksit değeri	Ek – 3	<i>Peroksit Değeri Tayini</i>
UV spektrofotometrisi	Ek – 8	<i>Ultraviyole Işığında Özgül Soğurma Tayini</i>
Duyusal değerlendirme	Ek – 11	<i>Natürel Zeytinyağlarına Ait Duyusal Özelliklerin Tespiti</i>
Yağ asidi etil esterleri	Ek - 6	<i>Kapiler Kolonlu Gaz Kromatografisi ile Mumsu Maddelerin, Yağ Asitleri Metil Esterleri ve Yağ Asitleri Etil Esterlerinin Tayini</i>
Stigmastadienler	Ek – 13	<i>Stigmastadienlerin Tayini</i>
Yağ asitlerinin trans izomerleri	Ek – 9A	<i>Yağ Asitlerinin Metil Esterlerinin Gaz Kromatografisi ile Tayini</i>
	Ek – 9B	<i>Yağ Asitlerinin Metil Esterlerinin Hazırlanması</i>
Yağ asidi kompozisyonu	Ek – 9A	<i>Yağ Asitlerinin Metil Esterlerinin Gaz Kromatografisi ile Tayini</i>
	Ek – 9B	<i>Yağ Asitlerinin Metil Esterlerinin Hazırlanması</i>
Δ ECN42	Ek – 14	<i>Gerçek ve Teorik ECN 42 Trigliserid İçeriği Arasındaki Maksimum Farkın Tayini</i>
Sterol kompozisyonu ve toplam steroller ile Eritrodiol+Uvaol	Ek – 5	<i>Kapiler Kolonlu Gaz Kromatografisi İle Sterol ve Eritrodiol+Uvaol (Triterpenik dialkoller) Bileşiminin ve Miktarının Tayini</i>
Alifatik alkoller	Ek – 15	<i>Kapiler Kolonlu Gaz Kromatografisi ile Alifatik Alkol Miktarının Tayini</i>
Mumsu maddeler	Ek – 4	<i>Kapiler Kolonlu Gaz Kromatografisi ile Mumsu Maddelerin Tayini</i>
2-gliseril monopalmitat	Ek – 7	<i>2-Gliseril Monopalmitat Yüzde Miktarının Tayini</i>

EK-2

Serbest Yağ Asitliği Tayini

1. Kapsam

Bu metot zeytinyağı ve prina yağındaki serbest yağ asitleri miktarının belirlenmesi için kullanılan yöntemi tanımlar. Serbest yağ asitlerinin miktarı, genel olarak hesaplanan serbest asitlik (oleik asit cinsinden, %) şeklinde ifade edilir.

2. Prensi

Çözücü karışımı içinde numunenin çözündürülmesi ile çözücü ortamına geçen serbest yağ asitlerinin etanollü potasyum hidroksit çözeltisi ile titre edilmesidir.

3. Kimyasallar

Tüm kimyasallar analitik saflıkta olmalı ve saf su kullanılmalıdır.

3.1. Çözücü karışımı:

Dietil eter ve % 95 lik (v/v) etanolün 1:1 (v/v) oranında karışımı

Her 100 mL'lik etanol-dietil eter karışımı (v/v), kullanımdan hemen önce 0,3 mL fenolftalein indikatörü eşliğinde etanollü potasyum hidroksit çözeltisi ile nötralize edilmelidir.

Dietil eter yüksek derecede yanıcı olup ve patlayıcı peroksitler oluşturabildiğinden dikkatli kullanılmalıdır. Dietil eter kullanımı mümkün değilse bunun yerine etanol ve toluen içeren bir karışım kullanılabilir, gerektiğinde etanolün yerine ise propan-2-ol kullanılabilir.

3.2. 0,1 Molar (M) etanollü potasyum hidroksit çözeltisi: (gerekirse yaklaşık 0,5 M):

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.

Potasyum hidroksitin kararlı renksiz çözeltisi şu şekilde hazırlanır: 1000 mL etanol, 8 g potasyum hidroksit ve 0,5 g alüminyum talaşı ile birlikte geri soğutucu altında bir saat boyunca kaynatılır ve hemen damıtılır. Gerekli miktarda potasyum hidroksit damıtılmış etanol içinde çözülür. Potasyum karbonat çökeltisinin üzerindeki berrak sıvının ayrılması için çözelti birkaç gün dinlendirildikten sonra filtre edilir.

Çözelti damıtılmaksızın şu şekilde hazırlanabilir: 1000 mL etanole 4 mL alüminyum butilat eklenir ve karışım birkaç gün beklemeye bırakılır. Üstteki faz filtre edilir ve elde edilen distilat içinde gerekli miktarda potasyum hidroksit çözülür.

Titrasyonda kullanılan etanollü potasyum hidroksit çözeltisinin yerine suyun faz ayırmasına sebep olmaması şartıyla potasyum veya sodyum hidroksitin sulu çözeltisi de kullanılabilir.

3.3. Fenolftalein (%1'lik (m/v)) veya alkalin mavisi (%2'lik (m/v)) çözeltisi:

Çözeltiler % 95-96'lık (v/v) etanol ile hazırlanmalıdır. Alkalin mavisi çözeltisi çok koyu renkli yağlar için kullanılmalıdır.

4. Cihaz ve malzemeler

Aşağıdakileri içeren genel laboratuvar malzemeleri:

- 4.1. Analitik terazi,
- 4.2. Erlen: 250 mL'lik,
- 4.3. Büret: 10 mL'lik (0,05 mL taksimatlı)

5 Prosedür

5.1. Analiz için numunenin hazırlanması

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

5.2. Numunenin alınması

Beklenen asit sayısına bağlı olarak tartılacak numune miktarı Tablo 1'e göre belirlenir ve belirlenen miktardaki numune erlene tartılır.

Tablo 1- Tartılacak numune miktarı

Beklenen asit sayısı*	Numunenin kütlesi (g)	Tartım hassasiyeti (g)
< 1	20	0,05
1-4	10	0,02
4-15	2,5	0,01
15-75	0,5	0,001
>75	0,1	0,0002

*Asit sayısı: Oleik asit cinsinden serbest yağ asitliğinin yaklaşık iki katını ifade eder.

5.3. Analiz

Erlene 50–150 mL arasındaki miktarda nötrale edilmiş çözücü karışımı ilave edilerek numune çözülür. Fenolftalein eşliğinde 0,1 M etanollü potasyum hidroksit çözeltisi ile renk değişene kadar karıştırılarak titre edilir. (Fenolftaleinin hafif pembe rengi en az 10 saniye kalıcı olmalıdır.)

0,1 M etanollü potasyum hidroksit çözeltisinin sarfiyatı 10 mL'yi geçerse, titrasyonda 0,5 M etanollü potasyum hidroksit çözeltisi kullanılmalıdır.

Titrasyon sırasında bulanıklık oluşursa çözücü karışımından bulanıklık kayboluncaya kadar ilave edilir.

6. Sonuçların ifade edilmesi

Serbest yağ asitliği: % oleik asit cinsinden ifade edilir

Analiz iki paralel olarak yapılır. İki hesaplamanın aritmetik ortalaması olarak sonuç verilir.

Serbest yağ asitliği ağırlıkça yüzde olarak aşağıdaki formülle hesaplanır:

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

Burada:

V = Harcanan etanollü potasyum hidroksit çözeltisi hacmi (mL)

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

MA = Oleik asitin molekül ağırlığı (= 282);

m = Numune miktarı (g)

EK-3

Peroksit Değeri Tayini

1. Kapsam

Bu metot hayvansal ve bitkisel katı ve sıvı yağlardaki peroksit değerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemi tanımlamaktadır. Bu analiz için alınmış numuneler ışıktan uzakta, şilifli cam veya mantar tıpa ile hava almayacak şekilde kapatılmış, tamamen dolu cam kaplar içinde ve soğukta saklanmalıdır.

2. Tanım

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

3. Prensip

Asetik asit-kloroform çözücü karışımı 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. Şilifli yüzeylere kayganlaştırıcı yağ sürülmemelidir.

4.1. Şilifli cam balon: 250 mL'lik

Kullanım öncesinde kuru olmalı ve önceden içerisinde saf, kuru inert gaz (azot veya tercihen karbondioksit) geçirilmelidir.

4.2. Büret: 25 ya da 50 mL'lik (0,1 mL taksimatlı)

5. Kimyasallar

5.1. Kloroform:

Analitik saflıkta ve kuru inert bir gaz geçirilerek oksijeni uzaklaştırılmış.

5.2. Buzlu (glasiyel) asetik asit:

Analitik saflıkta ve kuru inert bir gaz geçirilerek oksijeni uzaklaştırılmış.

5.3. Doymuş potasyum iyodür sulu çözeltisi:

İyot ve iyodat içermeyen, taze hazırlanmış ve aşırı doymuş.

5.4. Sodyum tiyosülfat çözeltisi: (0,01 M veya 0,002 M'lık)

Kullanımdan hemen önce ayarlanmış.

5.5. Nişasta çözeltisi: 10 g/L 'lık. Çözünebilir doğal nişastadan taze hazırlanmış sulu çözelti.

6. Prosedür

Analiz direk güneş ışınlarından uzakta günışığının yayıldığı bir ortamda veya yapay ışık altında yapılmalıdır. Numune, beklenen peroksit değerine göre Tablo 1 kullanılarak şilifli balon içerisine 0,001g hassasiyetle tartılır.

Tablo1- Tartılacak numune miktarı

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

Balona 10 mL kloroform ilave edilir ve hızlı bir şekilde karıştırılarak numune çözülür. Çözölmüş numunenin üzerine 15 mL asetik asit ve 1 mL potasyum iyodür çözöltisi ilave edilerek balonun kapağı hızlıca kapatılır ve 1 dakika çalkalanır. Balon, 15°C ile 25°C arasındaki sıcaklıkta ve karanlık ortamda 5 dakika bekletilir. Kapak açılır ve balona 75 mL saf su ilave edilir. Balonda oluşan serbest iyot nişasta çözöltisi indikatörlüğünde ve titrasyon süresince kuvvetlice çalkalanarak sodyum tiyosülfatla (beklenen peroksit değeri 12'nin altında ise titrasyonda 0,002 M ve 12'nin üstünde ise 0,01 M sodyum tiyosülfat çözöltisi kullanılarak) titre edilir. Eş zamanlı olarak bir kör deneme yapılır. Eğer kör denemede 0,01 M sodyum tiyosülfat çözöltisinin sarfiyatı 0,05 mL'yi aşarsa kimyasallar değıştirilir.

7. Sonuçların ifade edilmesi

Analiz iki paralel olarak yapılır. Sonuç iki hesaplamanın aritmetik ortalamasıdır. Peroksit değeri (PV) kilogram başına aktif oksijenin milieşdeğer ağırlık cinsinden aşağıdaki formöl ile hesaplanır;

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

Burada;

V = Analiz için harcanan ayarlı sodyum tiyosülfat çözöltisinin hacmi, (mL)

V₀ = Kör deneme için harcanan ayarlı sodyum tiyosülfat çözöltisinin hacmi, (mL)

c = Harcanan sodyum tiyosülfat çözöltisinin kesin molaritesi;

m = Numunenin ağırlığı, (g)

EK-4

Kapiler Kolonlu Gaz Kromotografisi ile Mumsu Maddelerin Tayini

1. Kapsam

Bu metot, zeytinyağı ve pirina yağında mumsu maddelerin analizi için kullanılan yöntemi tarif eder. Mumsu maddeler karbon atomlarının sayılarına göre ayrılır. Yöntem özellikle de

mekanik ekstraksiyon ile elde edilen zeytinyağı ile çözücü ekstraksiyonu ile elde edilen pirina yağını ayırt etmek için kullanılır.

2. Prensip

Uygun bir iç standart ilave edilen yağ numunelerinin aktif sulu silikajel içeren kolon kromatografisi ile fraksiyonlarına ayrılması ve trigliseritlerden daha az polaritede fraksiyonlara ayrılmış numunenin test koşulları altında doğrudan kapiler kolonlu gaz kromatografisi (GC) cihazıyla analiz edilmesidir.

3. Cihaz ve malzemeler

- 3.1. Erlen: 25 mL'lik
- 3.2. Musluklu kromatografik cam kolon: İç çapı 15 mm ve uzunluğu 30-40 cm
- 3.3. Gaz kromatografi cihazı: Kapiler kolonla çalışmaya uygun, kolona direk bağlanabilen sistemle donatılmış aşağıdaki özelliklere sahip,
 - 3.3.1. Termostatik fırın: Kolonlar için sıcaklık programına sahip
 - 3.3.2. On-column enjeksiyon bloğu: Kolonun içine direk giriş için
 - 3.3.3. Alev-iyonizasyon dedektörü.
 - 3.3.4. Bilgisayar sistemi ve yazıcı: PC aracılığıyla gaz kromatografi verilerini kayıt edebilecek
 - 3.3.5. Kapiler kolon: Uzunluğu 8 -12 m, iç çapı 0,25-0,32 mm, film kalınlığı 0,10-0,30 µm olan cam ya da eritilmiş silisten. (SE-52, SE-54 veya eşdeğeri kolon)
- 3.4. Mikroenjektör: Kolona doğrudan (on-column) enjeksiyon için, 10 µL' lik
- 3.5. Elektrovibratör
- 3.6. Vakumlu döner buharlaştırıcı (rotary evaporator)
- 3.7. Kül fırını
- 3.8. Analitik terazi: $\pm 0,1$ mg hassasiyette
- 3.9. Genel laboratuvar cam malzemeleri

4. Kimyasallar

- 4.1. Silikajel:

Granül büyüklüğü 60-200 µm arasında olmalıdır.

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. n-hekzan: Kromatografik saflıkta
- 4.3. Etil eter: Kromatografik saflıkta
- 4.4. n-heptan: Kromatografik saflıkta
- 4.5. İç standart:

% 0,1'lik (m/v) lauril araşidat standart çözeltisi. n-hekzan ile hazırlanır. İç standart olarak palmitil palmitat ya da miristil stearat kullanmak da mümkündür.
- 4.5.1. Sudan I (1-fenil-azo-2-naftol):

% 1'lik. n-hekzan/dietilelerin 99:1 (v/v) oranındaki karışımı içerisinde hazırlanır.

4.6. Taşıyıcı gazlar: Yüksek saflıkta hidrojen veya helyum

4.7. Yardımcı gazlar: Yüksek saflıkta hidrojen

Yüksek saflıkta kuru hava

5. Prosedür

5.1. Kromatografi kolonun hazırlanması:

15 g silikajel n-hekzanla bulamaç hale getirilerek cam kolona boşaltılır. Silikajelin kolona kendiliğinden yerleşmesi için beklenir. Kolon içeriğini daha homojen hale getirmek için elektrovibratör kullanılarak yerleşme tamamlanır. Safsızlıkları uzaklaştırmak için 30 mL n-hekzan kolondan geçirilerek yıkama yapılır.

5.2. Numunenin hazırlanması

25 mL'lik erlen içine tam olarak 500 mg numune tartılır ve tahmin edilen mumsu madde miktarı doğrultusunda uygun miktarda iç standart çözeltisi ilave edilir. Örneğin, zeytinyağı için 0,1 mg lauril araşidat ve pirina yağı için 0,25-0,50 mg arasında lauril araşidat içeren standart çözeltisi eklenir. Yıkama işlemini görsel kontrol edilmek isteniyorsa yıkamaya başlamadan 100 µL sudan I boyası, kolona aktarılma aşamasındaki numune çözeltisi içine eklenir. Erlen içerisine 2 mL n-hekzan ilave edilerek karıştırılır ve karışım kromatografi kolonuna aktarılır. Erlen tekrar 2 mL n-hekzan ile çalkalanarak kromatografi kolonuna aktarılır. n-alkanları uzaklaştırmak için 70 mL n-hekzan kolondan geçirilir ve çözücü (n-hekzan) silikajel seviyesinin 1 mm üstünde kalacak şekilde çözücünün geçmesine izin verilir ve cam kolonun musluğu kapatılır. Daha sonra her 10 saniyede yaklaşık 15 damla akış hızı sağlanacak şekilde günlük hazırlanmış n-hekzan:etil eter (99:1 oranında) karışımı ile kromatografik yıkama yapılarak yaklaşık 200-220 mL süzüntü toplanır. Numune yıkama işlemi oda sıcaklığında yapılmalıdır. Renklendirici olarak kullanılan sudan I boyasının alıkonma zamanı trigiliseritler ile mumsu maddeler arasında olduğundan bant kolonun alt noktasına ulaştığında yıkama işlemine son verilir. Çünkü tüm mumsu maddeler yıkanarak alınmıştır. Toplanan süzüntüdeki çözücüler 2 mL kalana kadar vakumlu döner buharlaştırıcıda uçurulur. Kalan çözücü zayıf azot akımı altında uçurulduktan sonra kalıntı üzerine 2-4 mL n-heptan eklenir.

5.3. Gaz kromatografisi ile analiz

5.3.1. Hazırlık

Kapılar kolon giriş kısmı direk enjeksiyon sistemine, çıkış kısmı dedektöre bağlantı yapılarak kolonun gaz kromatografisi cihazına takılması sağlanır.

Eğer kolon ilk kez kullanılacak ise şartlandırılmalıdır. Bunun için kolondan biraz taşıyıcı gaz geçirilir ve sonra cihaz açılır. Fırın kademeli ısıtılarak yaklaşık 4 saat sonra 350 °C'ye ulaşması sağlanır. Bu sıcaklıkta en az 2 saat bırakılır ve cihaz analizin yapılacağı çalışma koşullarına ayarlanır (gaz akışı düzenlenir, ateşleme yapılır, fırın, dedektör ve enjektör sıcaklığı ayarlanır vb.). Analiz için gerekli olan duyarlılıktan en az iki kat yüksek duyarlılıkta sinyal kaydedilmelidir. 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.

5.3.2. Çalışma şartlarının seçimi

Çalışma şartları genellikle aşağıdaki şekildedir:

- fırın sıcaklığı:

	20 °C/dk		5 °C/dk		20 °C/dk	
Başlangıç 80 °C (1dk)	→	240°C	→	325°C (6 dk)	→	340 °C (10 dk)

- Dedektör sıcaklığı: 350 °C,

- Enjeksiyon miktarı: 1 µL (2-4 mL n-heptan çözeltisinden)

- Taşıyıcı gaz: Seçilen gaz için doğru doğrusal akış hızında helyum ya da hidrojen olabilir.

- Cihaz duyarlılığı: aşağıdaki şartlara uygun olmalıdır:

Koşullar, tüm mumsu maddelerin ayrılması ve yeterli pik çözünürlüğü (Şekil 1) elde edilebilecek şekilde kolon ve gaz kromatografisinin özelliklerine bağlı olarak değiştirilebilir; iç standardın (C₃₂) alıkonma zamanı 18±3 dakika olmalıdır. En iyi temsilci mumsu madde piki tüm skalanın en az % 60'ında yer almalıdır. Söz konusu pik alanlarının doğru değerlendirilmesi amacıyla pik integrasyon parametreleri oluşturulmalıdır. En yüksek sıcaklıkta, tüm skalanın %10'undan fazla pozitif sapmaya izin verilmemelidir.

5.3.3. Analiz performansı

10 µL'lik bir mikro enjektör yardımıyla 1µL numune çözeltisi alınır ve 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 sterol esterleri tamamen ayrılana kadar analize devam edilir ve veriler kaydedilir. Baseline her zaman gerekli koşulları karşılamalıdır.

5.4. Piklerin tanımlanması

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

Şekil 1'de bir zeytinyağına ait mumsu maddelerin kromatogramı verilmiştir.

5.5. Mumsu madde miktarının 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.

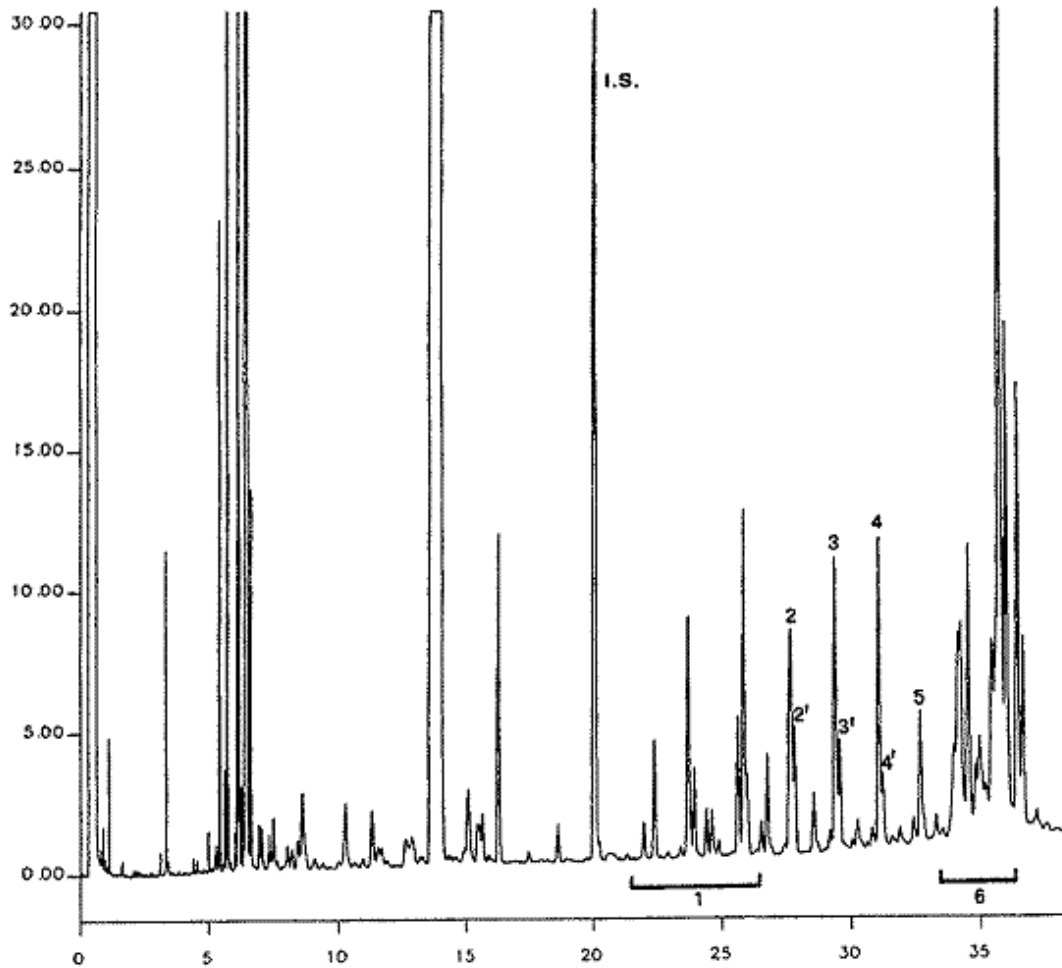
$$\text{Ester (mg/kg)} = \frac{A_x \times m_s \times 1000}{A_s \times m}$$

Burada:

- A_x = Milimetre karede her esterin pikinin alanı;
 A_s = Milimetre karede iç standardın pikinin alanı;
 m_s = Eklenen lauril araşidin miligram cinsinden miktarı;
 m = Analiz numunesinin gram cinsinden miktarı

6. Sonuçların ifade edilmesi

C40 – C46 arasındaki istenilen farklı mumsu maddelerin toplamı olarak mg/kg (ppm) cinsinden verilir. C40-C46 esterleri arasında karbon sayılarına göre pik bileşenlerini gösteren zeytinyağına ait örnek bir kromatogram ekteki şekilde verilmiştir. Eğer C46 ester kromatogramda iki defa görülüyorsa C46 esterinin belirgin şekilde büyük olduğu pirina yağında mumsu madde fraksiyonu analiz edilerek bu pikin tanımlanması önerilir. Sonuçlar bir ondalık basamak ile verilir.



Şekil 1
Zeytinyağının mumsu maddeler kromatogramı*

- 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 ayırımından sonra kromatogramda belirgin hiçbir pik (trigliseridler) görülmemesi gereklidir.

EK-5

Kapiler Kolonlu Gaz Kromatografisi İle Sterol ve Eritrodiol+Uvaol (Triterpenik dialkoller) Bileşiminin ve Miktarının Tayini

1. Kapsam

Bu metot zeytinyağı ve pirina yağındaki sterol kompozisyonu ve toplam sterol miktarı ile triterpenik dialkollerin belirlenmesi yöntemini tanımlar.

2. Prensipte

İç standart olarak α -kolestanol ilave edilmiş yağ numunesi etanollü potasyum hidroksit ile sabunlaştırıldıktan sonra sabunlaşmayan maddeler dietil eterle ekstrakte edilir. Sterol ve triterpenik dialkoller fraksiyonu diğer sabunlaşmayan maddelerden bazik silikajel plaka üzerinde ince tabaka kromatografisi kullanılarak ayrılır. Plaka üzerinden alınan sterol ve triterpenik dialkol bandı trimetil-silil esterlerine dönüştürülerek kapiler kolonlu GC ile analiz edilir.

3. Cihaz ve malzemeler

- 3.1. Şilifli geri soğutucu: 250 mL'lik balona uygun
- 3.2. Ayırma hunileri: 500 mL'lik
- 3.3. Şilifli balon: 250 mL'lik
- 3.4. Cam plaka ince-tabaka kromatografisi için gerekli olan malzemeler
- 3.5. UV lamba: 366 veya 254 nm dalga boyu olan.
- 3.6. Enjektörler: 100 μ L ve 500 μ L'lik.
- 3.7. Huni ve siyah bant süzgeç kâğıdı
- 3.8. Ağzı şilifli armudi balon: 50 mL'lik
- 3.9. Deney tüpü: Konik dipli ve contalı kapağı olan, 10 mL'lik.
- 3.10. Gaz kromatografi cihazı: Kapiler Kolonlu, Split/Splitless enjeksiyon sistemi ile aşağıdaki parçaları bulunan
 - 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 dedektörü
 - 3.10.4. Gerekli bilgisayar sistemi ve bilgisayar sistemine bağlı yazıcı
- 3.11. Kapiler kolon: Uzunluğu 20-30 m, iç çapı 0,25–0,32 mm, % 5 difenil-% 95 dimetilpolisiloksan içeren ve film kalınlığı 0,10–0,30 μ m olan, camdan ya da eritilmiş silisten (SE-52 , SE-54 veya eşdeğeri kolon)

3.12. Gaz kromatografi enjektörü: Sertleştirilmiş iğneli 10 μ L'lik.

3.13. Analitik terazi: 0,1 mg hassasiyetli

3.14. Desikatör

4. Kimyasallar

4.1. Potasyum hidroksit: En az % 85 saflıkta

4.2. 2 M Etanollü potasyum hidroksit çözeltisi:

130 g potasyum hidroksit 200 mL saf su içinde soğutularak çözülür ve etanolla bir litreye tamamlanır. Bu çözelti koyu renkli şişede ağzı iyice kapatılarak maksimum 2 gün saklanır.

4.3. Etil eter: Analitik saflıkta

4.4. 0,2 M etanollü potasyum hidroksit çözeltisi:

13 g potasyum hidroksit 20 mL saf su içinde çözülür ve etanolla 1 litreye tamamlanır.

4.5. Susuz sodyum sülfat: Analitik saflıkta

4.6. Cam plakalar:

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

4.7. Toluen: Kromatografik saflıkta

4.8. Aseton: Kromatografik saflıkta

4.9. n-hekzan: Kromatografik saflıkta

4.10. Etil eter: Kromatografik saflıkta

4.11. Etanol: Analitik saflıkta

4.12. Etil asetat: Analitik saflıkta

4.13. İnce-tabaka kromatografisi için referans çözelti:

Kolesterol veya fitosteroller ile eritrodiol veya uvaolün etil asetat içindeki % 5'lik çözeltisi.

4.14. % 0,2 lik etanollü 2,7-dikloroflorosein çözeltisi:

Birkaç damla 2 M etanollü potasyum hidroksit çözeltisi ilave edilerek hafifçe bazik hale getirilir.

4.15. Susuz piridin: Kromatografik saflıkta

4.16. Heksametil disilazan: Analitik saflıkta

4.17. Trimetilklorosilan: Analitik saflıkta

4.18. Sterol trimetilsilil eterin referans çözeltileri:

Bunları içeren yağlardan elde edilen saf sterol ya da sterol karışımlarından kullanılacağı zaman hazırlanır.

4.19. α -kolestanol (GC saflıkta) iç standart çözeltisi:

Etil asetatta hazırlanmış % 0,2'lik (m/v) çözelti.

4.20. Fenolftalein çözeltisi: 10 g/L'lik, etanolla hazırlanmış.

- 4.21. Hareketli faz: n-hekzan/etil eter 65:35 (v/v) oranındaki karışımı
- 4.22. Silillendirme reaktifi: piridin/hekzametil disilazan/trimetil klorosilan 9:3:1 (v/v/v)
- 4.23. Taşıyıcı gazlar: Yüksek saflıkta hidrojen veya helyum
- 4.24. Yardımcı gazlar: Yüksek saflıkta hidrojen, helyum, azot ve kuru hava

5. Prosedür

5.1. Sabunlaşmayan maddelerin hazırlanması

5.1.1. Numunenin sterol içeriğinin yaklaşık % 10'u kadarına karşılık gelecek % 0,2'lik α -kolestanol çözeltisi 500 μ L'lik enjektör kullanarak 250 mL'lik balona ilave edilir. Örneğin, 5 g numune için zeytinyağına 500 μ L, pirina yağına ise 1500 μ L % 0,2'lik α -kolestanol çözeltisi ilave edilir. Ilık su banyosunda azot gazı akımında kurutulduktan ve balon soğutulduktan sonra filtre edilmiş numuneden aynı balona $5 \pm 0,01$ g tartılır. Önemli miktarda kolesterol içeren yağlar kolestanol ile aynı çıkış zamanında pik verebilir. Böyle numunelerin sterol fraksiyonu iç standart ilave ederek ve etmeyerek ikili analiz ile belirlenir veya kolestanol yerine iç standart olarak betülinol kullanılır.

5.1.2. Balona 2 M etanollü potasyum hidroksit çözeltisinden 50 mL ilave edilir ve balon geri soğutucuya takılır. Sabunlaşmanın gerçekleşmesi için (çözelti berrak hale gelene kadar) mantolu ısıtıcıya konularak kaynayıcaya kadar ısıtılır. Berraklık oluştuğundan (yaklaşık 20 dk) sonra geri soğutucunun üzerinden 50 mL saf su ilave edilir. Geri soğutucu çıkarılır ve balon yaklaşık 30 °C sıcaklığa soğutulur.

5.1.3. Balonun içindekiler birkaç defa saf suyla çalkalanarak 500 mL'lik ayırma hunisine dikkatlice aktarılır. Yaklaşık 80 mL etil eter ayırma hunisine ilave edildikten sonra 60 saniye kadar güçlü bir şekilde çalkalanır (çalkalama esnasında gaz basıncı artacağından kapaklı ayırma hunisi ters çevrilerek musluktan havası alınmalıdır) ve faz ayrımı için bekletilir.

Alt faz ikinci bir ayırma hunisine alınır. İlk ayırma hunisinde kalan üst fazdan her seferinde 60-70 mL etil eter kullanılarak aynı şekilde iki ekstraksiyon daha yapılır ve ikinci ayırma hunisine alınır. Herhangi bir emülsiyon oluşumu az miktarda etanol ilavesiyle yok edilebilir.

5.1.4. Tek bir ayırma hunisinde toplanan üç eter ekstraktı yıkama suyu nötr bir reaksiyon verene kadar (fenoltalein 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 etil eter ile yıkanır.

5.1.5. Birkaç mL etil eter kalıncaya kadar vakumlu döner buharlaştırıcıda (30 °C sıcaklıkta) etil eter damıtılarak uzaklaştırıldıktan sonra hafif bir vakum veya azot akımı kullanılarak kuru hale getirilir. Tamamen kuruması için 103 ± 2 °C sıcaklıktaki etüvde yaklaşık 15 dakika tutulur ve desikatörde soğutulduktan sonra tartılır.

5.2. Sterol ve triterpenik dialkol fraksiyonunun ayrılması

5.2.1. Bazik plakaların hazırlanması:

Silikajel plakaları 0,2 M etanollü potasyum hidroksit çözeltisine 10 saniye süreyle tamamen daldırılır, sonra kuruması için çeker ocakta iki saat bırakılır ve son olarak 100 °C'deki etüvde 1 saat bekletilir. Etüvden çıkarılır ve kullanılmaya kadar kalsiyum klorür bulunan desikatörde bekletilir. Bu şekilde bir işleme tabi tutulan plakalar 15 gün içerisinde kullanılmalıdır. Bazik silikajel plakaları sterol ve triterpenik dialkol fraksiyonlarını ayırmak için kullanılacağı zaman sabunlaşmayan maddeleri alümina ile işleme tabi tutmaya gerek yoktur. İnce tabaka kullanıldığında tüm asidik bileşikler (yağ asitleri ve diğerleri) numunenin

ilk uygulandığı çizgide kalacak, sterollerini içeren bant da alifatik ve triterpen alkollerini içeren banttandır net bir şekilde ayrılacaktır.

5.2.2. Hareketli faz, yürütme tankı içine yaklaşık 1 cm yükseklikte olacak şekilde doldurulur. Alternatif olarak 50:50 (v/v) oranındaki n-hekzan/etil eter karışım hareketli faz olarak da kullanılabilir. Yürütme tankının kapağı kapatılır ve sıvı-buhar dengesinin oluşması için en az yarım saat kadar 15-20 °C arasındaki ortam sıcaklığında bekletilir. Yürütme tankının iç duvarına çözeltiye batırılmış filtre kâğıdı şeritleri konulabilir. Bu işlem, yürütme süresini yaklaşık üçte bir oranında azaltır ve bileşenlerin daha düzgün ve belirgin bir şekilde ayrımını sağlar. Yürütme tankının içindeki çözelti her çalışmada yenilenmelidir.

5.2.3. Sabunlaşmayan maddelerin etil asetatta yaklaşık % 5'lik çözeltisi hazırlanır. Çözeltinin 300 µL'lik kısmı 100 µL'lik enjektör kullanarak silikajel plakanın alt ucuna yaklaşık 2 cm mesafede mümkün olduğu kadar ince ve düzgün bir çizgi halinde enjekte edilir. (Damlacıkların küçük olmasına ve birbiriyle karışmayacak şekilde verilmesine dikkat edilmelidir.) Kontrol için plakanın çizgi ile aynı hizadaki bir ucuna 2-3 µL referans çözeltiler damlatılır, böylece yürütmeden sonra sterol+triterpen dialkol bandı tanımlanabilir.

5.2.4. Plaka 5.2.2.'de belirtildiği şekilde hazırlanmış olan yürütme tankına konulur. Ortam sıcaklığı 15-20 °C arasında tutulmalıdır. Yürütme tankının kapağı derhal kapatılır ve hareketli faz plakanın üst kenarının yaklaşık 1 cm altına gelinceye kadar yürütme işlemine devam edilir. İşlem sonunda tanktan çıkarılan plaka kuruması için bir süre normal ortamda ya da hafif sıcak hava akımında bekletilir. Yüksek sıcaklık ayrımı kötüleştirir.

5.2.5. Plakaya % 0,2'lik 2,7-dikloroflorosein çözeltisi homojen şekilde püskürtülür ve hafifçe kurutulur. Plaka üzerinde referans gölge esas alınarak sterol ve triterpen dialkol bandı sınırları UV ışık altında işaretlenir. (Şekil 1)

5.2.6. Metal bir kazıma spatulası kullanarak işaretlenmiş alandan silikajel kazınır. Kazınan silikajel içine süzgeç kâğıdı yerleştirilmiş huniye konulur. Darası alınmış 50 mL'lik ağzı şilifli armudi balonda süzüntü toplanacak şekilde 10 mL sıcak etil asetat spatula ile dikkatlice karıştırılarak huniye aktarılır. Süzüntü aynı balonda toplanacak şekilde hunideki kalıntı üç kez etil eterle (her sefer yaklaşık 10 mL) yıkanır. Süzüntüdeki çözücüler düşük sıcaklıktaki (40 °C'yi aşmayacak şekilde) vakumlu döner buharlaştırıcıda 4-5 mL kalıncaya kadar uçurulur. Kalan çözelti kuru hale gelene kadar hafif bir azot akımı altında uçurulur. Birkaç damla aseton ilave edilir ve kuruyana kadar tekrar hafif bir azot akımı altında uçurulur.

5.3. Trimetilsilil eterlerin hazırlanması.

5.3.1. Sterol ve triterpen dialkol fraksiyonu içeren ağzı şilifli armudi balona silillendirme reaktifinden sterol ve triterpen dialkol miktarının her miligramı için 50 µL oranında ilave edilir. Nem, analiz sonucunu olumsuz etkilemektedir. Piyasada kullanıma hazır silillendirme reaktifleri bulunmaktadır (örneğin bis-trimetilsilil, triflor asetamid + % 1 trimetil klorosilan). Bunlar eşit miktarda susuz piridin ile seyreltilerek kullanılmalıdır. Pridin yerine aynı miktardaki asetonitril de kullanılabilir.

5.3.2. Ağzı şilifli armudi balonun ağzı kapatılır, sterol ve triterpen dialkol tamamen çözünene kadar dikkatlice balon döndürülerek (ters çevirmeden) cidarlarda kalan sterollerin de silillendirilmesi sağlanır. Ortam sıcaklığında 15 dk kadar bekletilir. Berrak çözelti GC'ye enjeksiyon için hazırdır. Oluşabilecek hafif opaklık normaldir ve herhangi bir soruna yol açmaz. Askıda beyaz parçacık oluşması veya pembemsi rengin oluşması ortamda nem 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 kromatografisi cihazına 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 kademeli olarak ısıtılır ve bu sıcaklıkta en az 2 saat süre tutulur. Şartlandırma sıcaklığı kolon için belirtilen en yüksek sıcaklığın 20 °C altında olmalıdır.

Cihaz çalışma şartları ayarlanır (gaz akışı düzenlenir, ateşleme yapılır, fırın, dedektör 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.

5.4.2. Çalışma koşulları

5.4.2.1. Çalışma şartları aşağıdaki şekildedir:

- fırın sıcaklığı: 260 ± 5 °C,
- enjeksiyon sıcaklığı: 280-300 °C,
- dedektör sıcaklığı: 280-300 °C,
- taşıyıcı gazın doğrusal hızı: 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: 0,5-1 µL trimetilsilil ester çözeltisi.

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 % 20 ± 5 'i; soya yağı için (ortalama içerik % 20) tam kromatogramın % 80 ± 10 'u.
- Tüm steroller ve triterpen dialkoller mutlaka ayrılmalıdır. Piklerin ayrılmasına ek olarak aynı zamanda pikler de birbirinden tamamen ayrılmalıdır. 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 sterollerin ve triterpen dialkollerin trimetilsilil esterleri tamamen elde edilinceye kadar kayıta 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 sterol ve triterpen dialkol trimetilsilil esterlerinin alıkonma zamanlarının karşılaştırılmasıyla yapılır.

Bazı yağlar için sterol ve triterpen dialkol kompozisyonu tipik kromatogramları Şekil 2 ve 3 de gösterilmektedir.

SE-52 ve SE-54 kolonları için β -sitosterole göre göreceli alıkonma süreleri Tablo-1’de verilmiştir.:

Tablo-1 Steroller ve triterpen dialkoller için göreceli alıkonma süreleri

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

1- Şekil 2 ve 3’te kromatogramlardaki numaraları ifade etmektedir.

5.4.5. Sterol Miktarının Hesaplanması

5.4.5.1 α -kolestanol ve sterol piklerinin alanları integratör kullanılarak hesaplanır. Yukarıda listelenen steroller arasında bulunmayan bileşiklere ait pikler göz önünde bulundurulmaz. α -kolestanol için cevap 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.

5.4.6. Triterpen dialkollerin hesaplanması

Eritrodiol ve uvaol yüzdesinin hesaplanması

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

Burada:

$\sum A$ = sterollerin toplam pik alanı

E_r = eritrodiol pik alanı

U_v = uvaol pik alanı

6. Sonuçların değerlendirilmesi

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

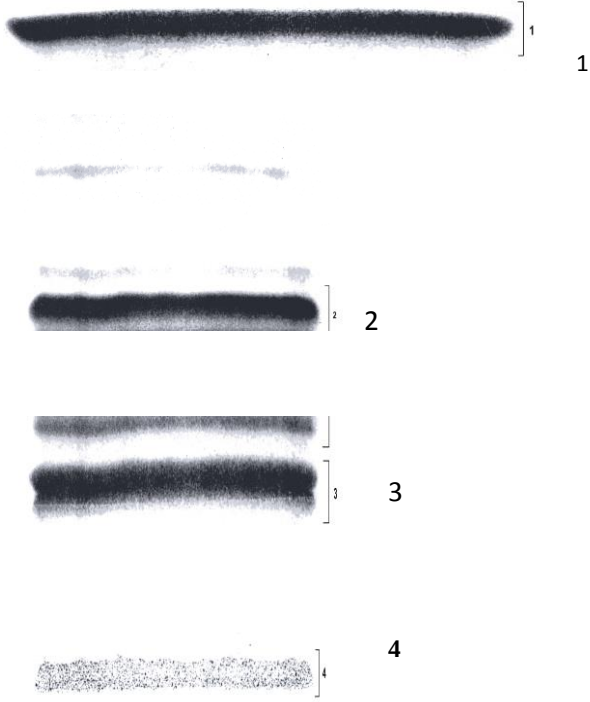
6.2. Her bir sterol yüzdesi, ilgili pik alanının sterollerin toplam pik alanına oranından hesaplanır.

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

Burada:

A_x = x'in pik alanı

$\sum A$ = sterollerin toplam pik alanı

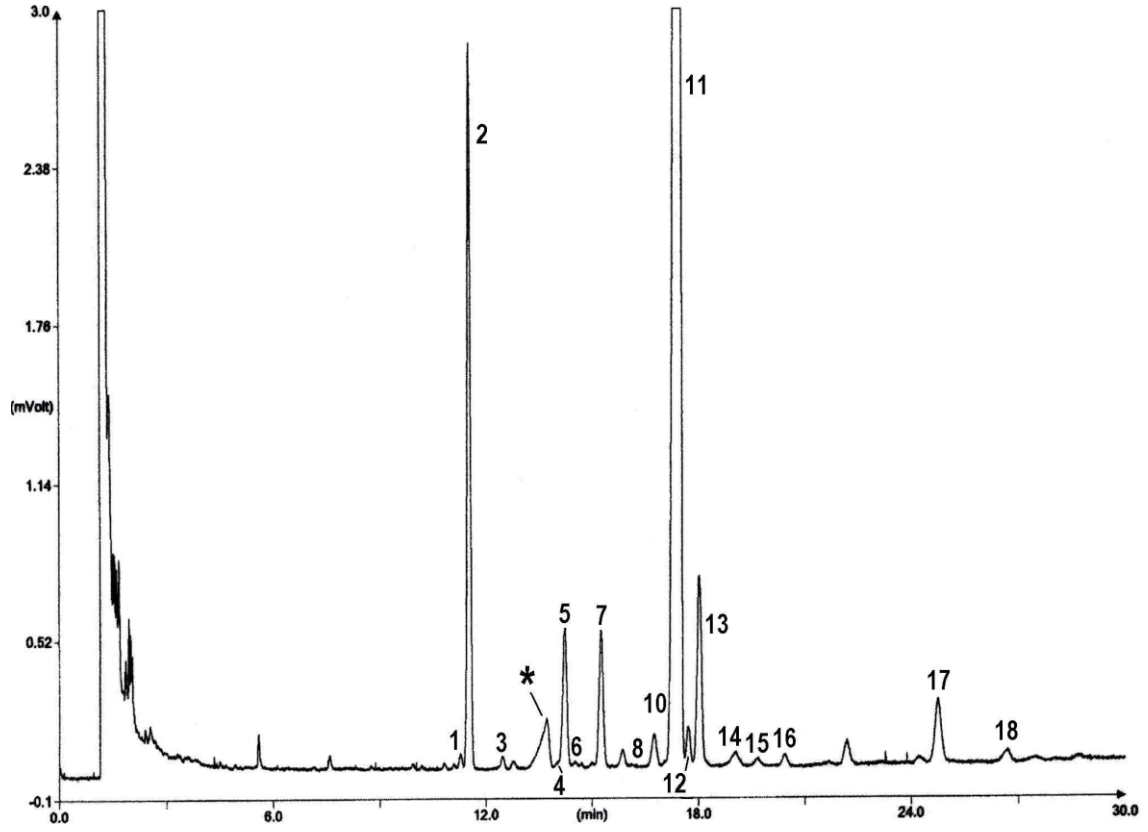


Şekil 1

Sterol ve Triterpenik dialkollerin tespiti için kazınması gereken bölgeleri gösteren pirina yağına ait ince tabaka plakası

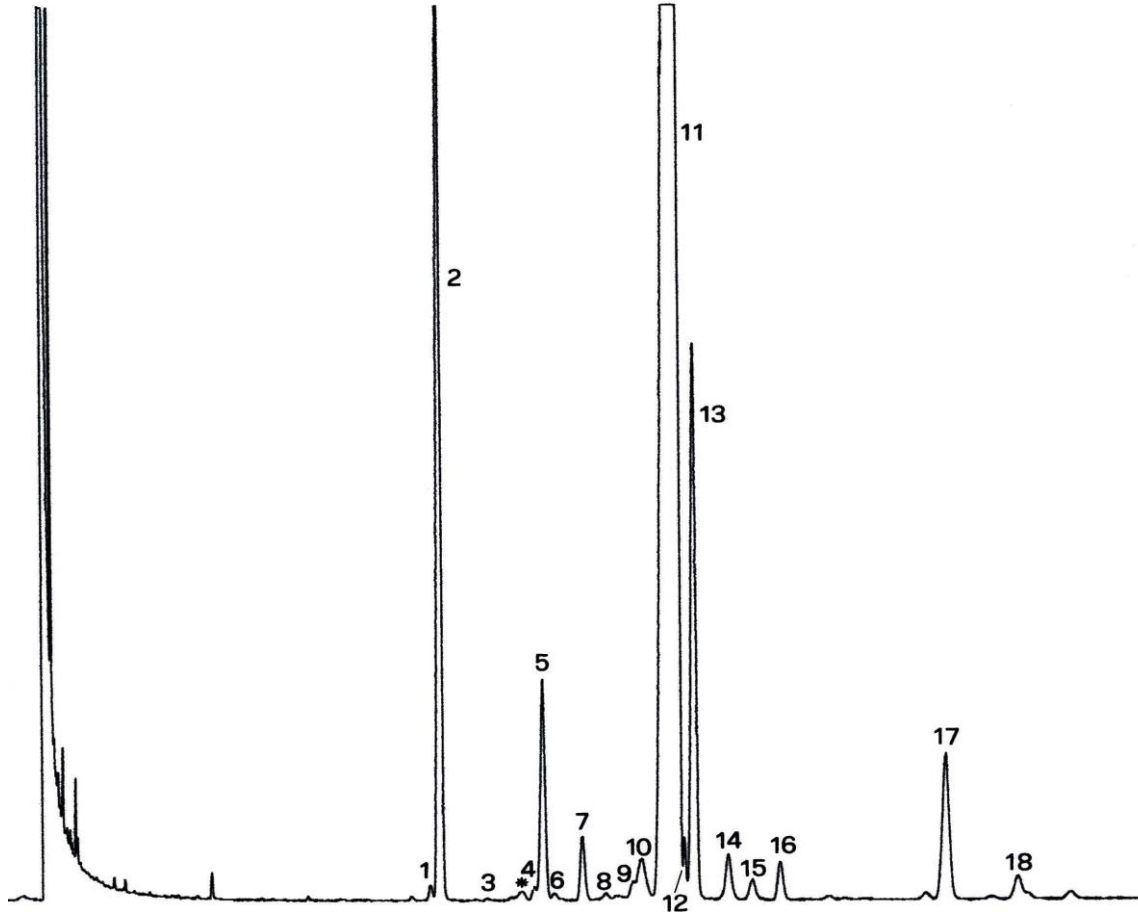
Burada;

- 1- Squalen
- 2- Triterpen ve alifatik alkol
- 3- Steroller ve Triterpenik dialkoller
- 4- Başlangıç ve serbest yağ asitleri



Şekil 2

*Ham Zeytinyağının sterol ve triterpenik dialkollerin fraksiyonunun gaz kromatogramı
(iç standart içeren)*



Şekil 3
Rafine Zeytinyağının sterol ve triterpenik dialkollerin fraksiyonunun gaz kromatogramı (iç standart içeren)

EK-6

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 kullanılan yöntemi tarif eder. Mumsu maddeler ve alkil esterler karbon atomların numaralarına göre ayrılır. Bu metot, pirina yağı ile zeytinyağını birbirinden ayırmak ve natürel sızma zeytinyağı için kalite parametresi olarak natürel sızma zeytinyağına hile amacı ile karıştırılan düşük kalitedeki bazı deodorize yağ (kolon yağı), ham zeytinyağı ve natürel birinci zeytinyağı gibi karışım yağların tespiti için kullanılır.

2. Prensip

İç standart ilave edilen numunelerin (katı veya sıvı yağ) aktif sulu silikajel içeren kolon kromatografisi ile fraksiyonlarına ayrılması ve trigliserollerden daha az polaritede fraksiyonlara ayrılmış numunenin test koşulları altında doğrudan kapiler kolonlu gaz kromatografisi cihazıyla analiz edilmesi.

3. Cihaz ve malzemeler

- 3.1. Erlen: 25 mL'lik
- 3.2. Gaz kromatografi için musluklu cam kolon:
İç çapı 15 mm ve uzunluğu 30-40 cm olan
- 3.3. Kapiler kolonla çalışmaya uygun gaz kromatografisi
Kapiler kolonla doğrudan bağlanabilen sistemle donatılmış ve aşağıdakileri ihtiva eden sistem:
 - 3.3.1. Kolonlar için sıcaklık programına sahip termostatik hazne
 - 3.3.2. Kolonun içine doğrudan giriş için soğuk enjektör
 - 3.3.3. Alev-iyonizasyon dedektörü
 - 3.3.4. PC aracılığıyla gaz kromatografi verilerini saklayabilecek bilgisayar sistemi ve yazıcı
 - 3.3.5. Cam ya da eritilmiş silisten (Fused silica) kapiler kolon:
Uzunluğu 8 -12 m, iç çapı 0,25-0,32 mm, film kalınlığı 0,10-0,30 µm olan (SE-52, SE-54 veya eşdeğeri kolon)
- 3.4. Mikroenjektör: Kolona doğrudan enjeksiyon için, 10 µL' lik
- 3.5. Elektrovibratör
- 3.6. Vakumlu döner buharlaştırıcı (rotary evaporator)
- 3.7. Kül fırını
- 3.8. Analitik terazi:
± 0,1 mg hassasiyette
- 3.9. Genel laboratuvar cam malzemeleri

4. Kimyasallar

- 4.1. Silikajel: Tane büyüklüğü 60-200 µm arasında
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 karıştırılır. Kullanmadan önce karanlık bir yerde en az 12 saat tutulur.
- 4.2. n-hekzan: Kromatografik saflıkta
- 4.3. Etil eter: Kromatografik saflıkta
- 4.4. n-heptan veya isooktan: Kromatografik saflıkta
- 4.5. % 0,05'lik (m/v) lauril araşidat standart çözeltisi (mumsu maddeler için iç standart):
n-heptan ile hazırlanır. Burada, palmitil palmitat, miristil stearat yada araşidil laurat kullanmak da mümkündür.

4.6. % 0,02'lik (m/v) metil heptadekanoat standart çözeltisi (metil ve etil esterler için iç standart):

n-heptan ile hazırlanır

4.7 Sudan I (1-fenil-azo-2-naftol): % 1 oranında, hekzanla hazırlanmış

4.8. Taşıyıcı gazlar:

Yüksek saflıkta hidrojen veya helyum

4.9. Yardımcı gazlar:

Yüksek saflıkta hidrojen ve kuru hava

5. Prosedür

5.1. Kromatografi kolonun hazırlanması:

15 g silikajel n-hekzanla bulamaç hale getirilerek cam kolona boşaltılır. Silikajelin kolona kendiliğinden yerleşmesi için beklenir. Kromatografik dolguyu daha homojen hale getirmek için elektrovibratör kullanılarak tam olarak yerleşmesi sağlanır. Safsızlıkları uzaklaştırmak için 30 mL n-hekzan kolondan geçirililerek yıkama yapılır.

25 mL'lik erlen içine tam olarak 500 mg numune tartılır ve tahmin edilen mumsu madde miktarı doğrultusunda uygun miktarda iç standart çözeltisi ilave edilir. Örneğe bağlı olarak zeytinyağı için 0,1 mg, pirina yağı için 0,25-0,50 mg arasında lauril araşidat içeren ve zeytinyağı için 0,05 mg metil heptadekanoat içeren standart çözeltisi eklenir. Süzme işlemini görsel kontrol edebilmek için süzmeye başlamadan 100 µL sudan I boyası, kolona aktarılma aşamasındaki numune çözeltisi içine eklenir. Erlen içeriğine 2 mL n-hekzan ilave edilerek karıştırılır ve karışım kromatografi kolonuna aktarılır. Erlen tekrar 2 mL n-hekzan ile yıkanarak kromatografi kolonuna aktarılır. Çözücü (n-hekzan) silikajel seviyesinin 1 mm üstünde kalacak şekilde akışa izin verilir ve cam kolonun musluğu kapatılır. Daha sonra her 10 saniyede yaklaşık 15 damla akış hızı ayarlanarak günlük hazırlanmış n-hekzan:etil eter (99:1 oranında(v/v)) karışımı ile kromatografik yıkama yapılarak 220 mL süzüntü toplanır. Bu fraksiyon mumsu maddeleri, metil ve etil esterleri içerir. Toplanan süzüntü numune oda sıcaklığında 22 ± 4 °C'de tutulmalıdır.

Renklendirici olarak kullanılan sudan I boyası, trigliseritleri boyadığından altta kalan renksiz kısım mumsu maddeleri temsil etmektedir. Renklenen kısım kolonun alt noktasına ulaştığında süzme işlemine son verilir. Toplanan renksiz kısım mumsu maddelerdir.

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

5.2. Gaz kromatografisi ile analiz

5.2.1. Hazırlık

Kolon giriş kısmı doğrudan enjeksiyon (on-column) 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. Kademeli olarak ısıtılarak yaklaşık 4 saatte 350 °C'ye ulaşması sağlanır.

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

Negatif doğrusal sapma : Kolon bağlantılarının doğru yapılmadığını gösteririr.

Pozitif sapma : Kolonun yeterince şartlanmadığını gösterir.

5.2.2. Çalışma koşulları

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)

- Dedektör sıcaklığı: 350  C,
- Enjeksiyon miktarı: 1  L n-heptane çözeltisi (2-4 mL)
- Taşıyıcı gaz: seçilen gaz için doğrusal hızda helyum ya da hidrojen olabilir.
- Cihaz hassasiyeti: aşağıdaki şartlara uygun olmalıdır:

Çalışma koşulları, mumsu maddelerin, yağ asitleri metil ve etil esterlerinin ve lauril araşıdat i standardının çok iyi bir şekilde ayrıldığı yeterli pikler (şekil 2, 3 ve 4) elde edilebilmesi için kolon ve gaz kromatografisininzelliklerine bağlı olarak değiştirilebilir. Genelde, metil ve etil esterleri i standardı metil heptadekonat piki skalada tam olarak görüldüğünde mumsu maddelere ait en yüksek pikin de tüm skalada % 60'ınzerinde görülebilmesi gerekmektedir. Pik alanlarından istenilen doğru değerlendirmenin yapılabilmesi amacıyla pik entegrasyon parametreleri oluşturulmalıdır. En yüksek sıcaklıkta, tüm skalanın % 10'nundan fazla pozitif sapma olmamalıdır.

5.2.3. Analiz performansı

10  L'lik bir mikro enjektör yardımıyla 10  L numune çekilir. İğne enjeksiyon sisteminin içine sokularak bir-iki saniye sonra hızlıca enjekte edilir, yaklaşık beş saniye sonra yavaşça çıkarılır.

Mumsu maddeler ve sterol esterleri tamamen ayrılana kadar analize devam edilir

Baseline her zaman gereken koşulları karşılamalıdır.

5.2.4. Piklerin tanımlanması

Pik tanımlaması, alıkonma 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.

5.2.5. Mumsu madde miktarın hesaplanması

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

Esterlerin her birinin mumsu madde 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 = Her esterlin pik alanı;

A_s = İç standardın pik alanı;

m_s = Eklenen lauril araşidin miligram cinsinden miktarı;

m = Analiz numunesinin gram cinsinden miktarı

5.2.6. 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;

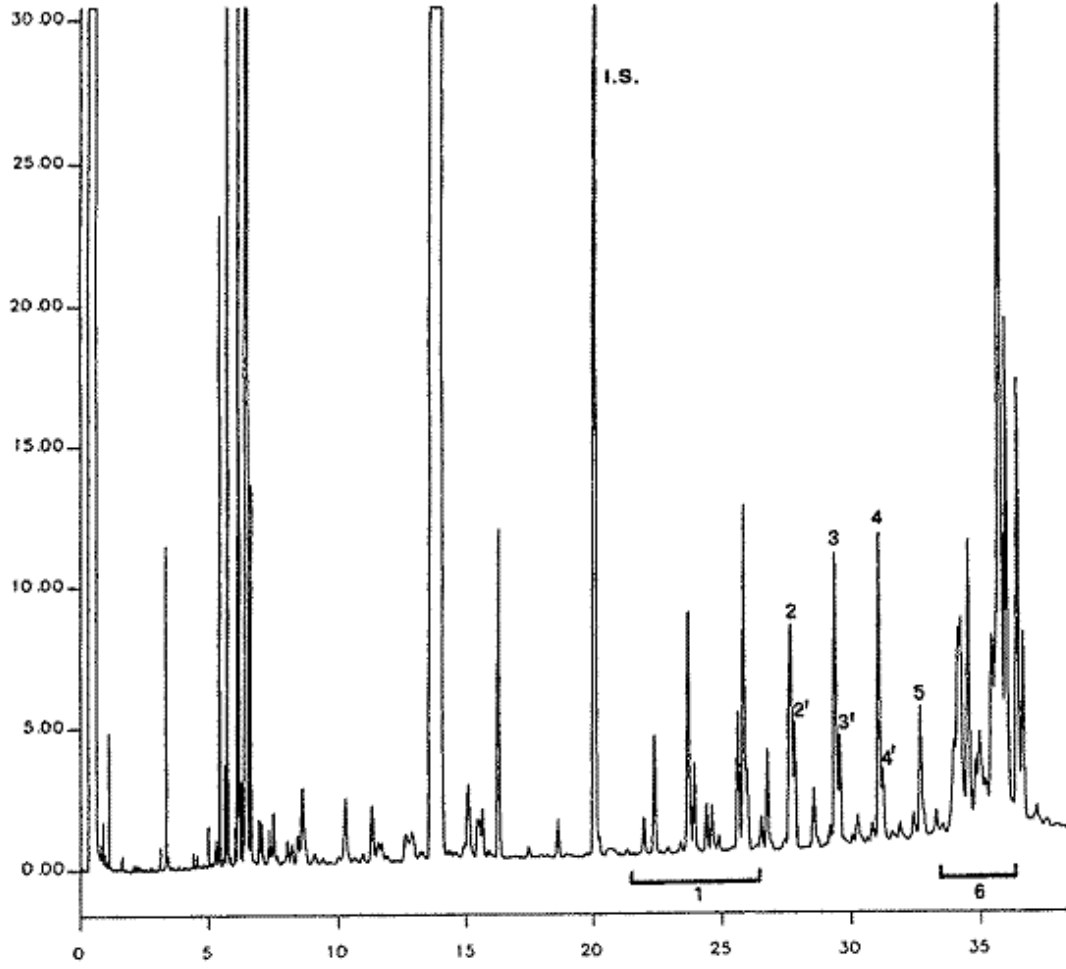
m = Analiz numunesinin gram cinsinden miktarı

6. Sonuçların ifade edilmesi

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

C16–C18 arasındaki metil ve etil esterleri içerikleri ve bu içeriklerin toplamı mg/kg (ppm) cinsinden verilir. Etil ve metil esterlere ait örnek kromatogramlar Şekil 2,3 ve 4'te verilmiştir

C40-C46 esterleri arasında karbon sayılarına göre pik bileşenlerini gösteren zeytinyağına ait örnek bir kromatogram ekteki Şekil 1'de verilmiştir. Tanımlama amacıyla, eğer C46 esteri bölünmüşse, C46 pikinin ağır bastığı pirina yağı mumsu madde analizi kuvvetle tavsiye edilir.



Şekil 1
*Zeytinyağının mumsu maddelerinin kromatogramı**

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

I.S. = Lauril araşıdat

1 = Diterpenik esterleri

2 + 2' = C40 esterleri

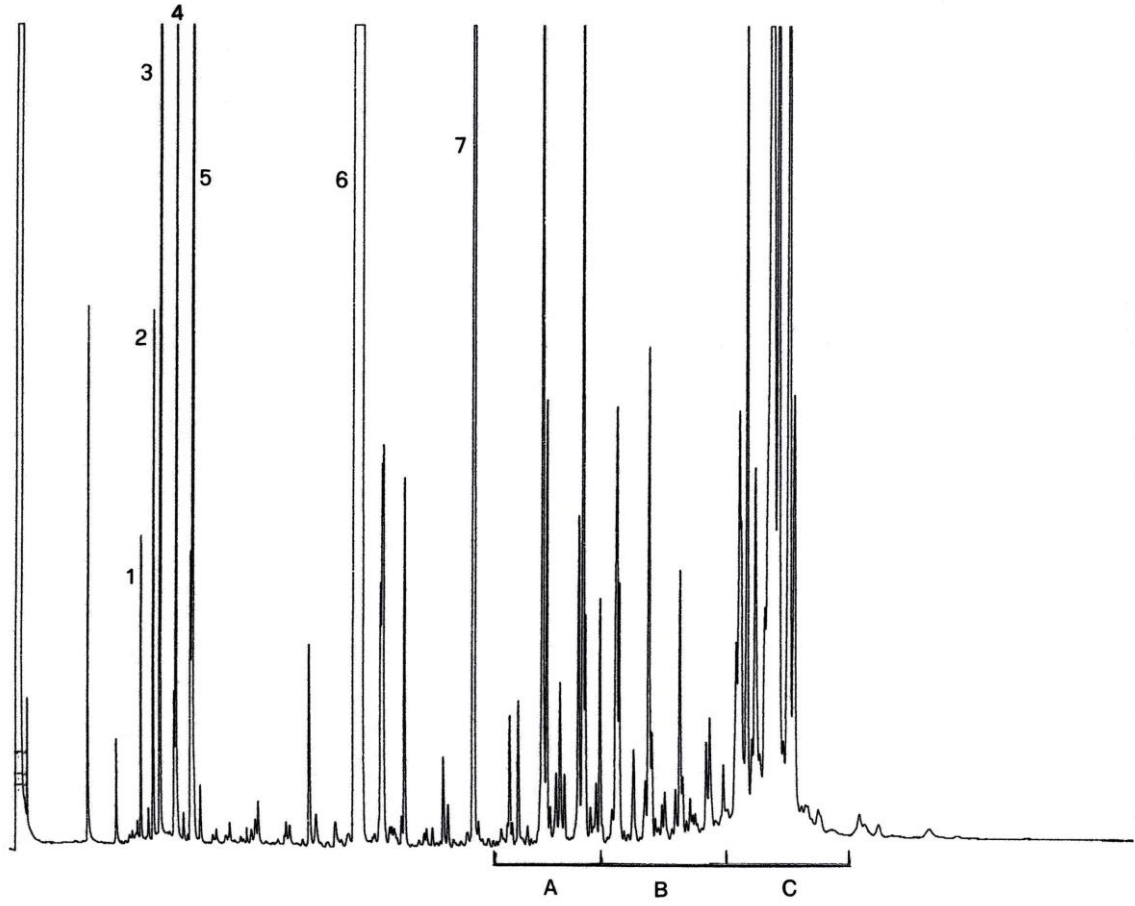
3 + 3' = C42 esterleri

4 + 4' = C44 esterleri

5 = C46 esterleri

6 = Sterol esterleri ve triterpenik alkol

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

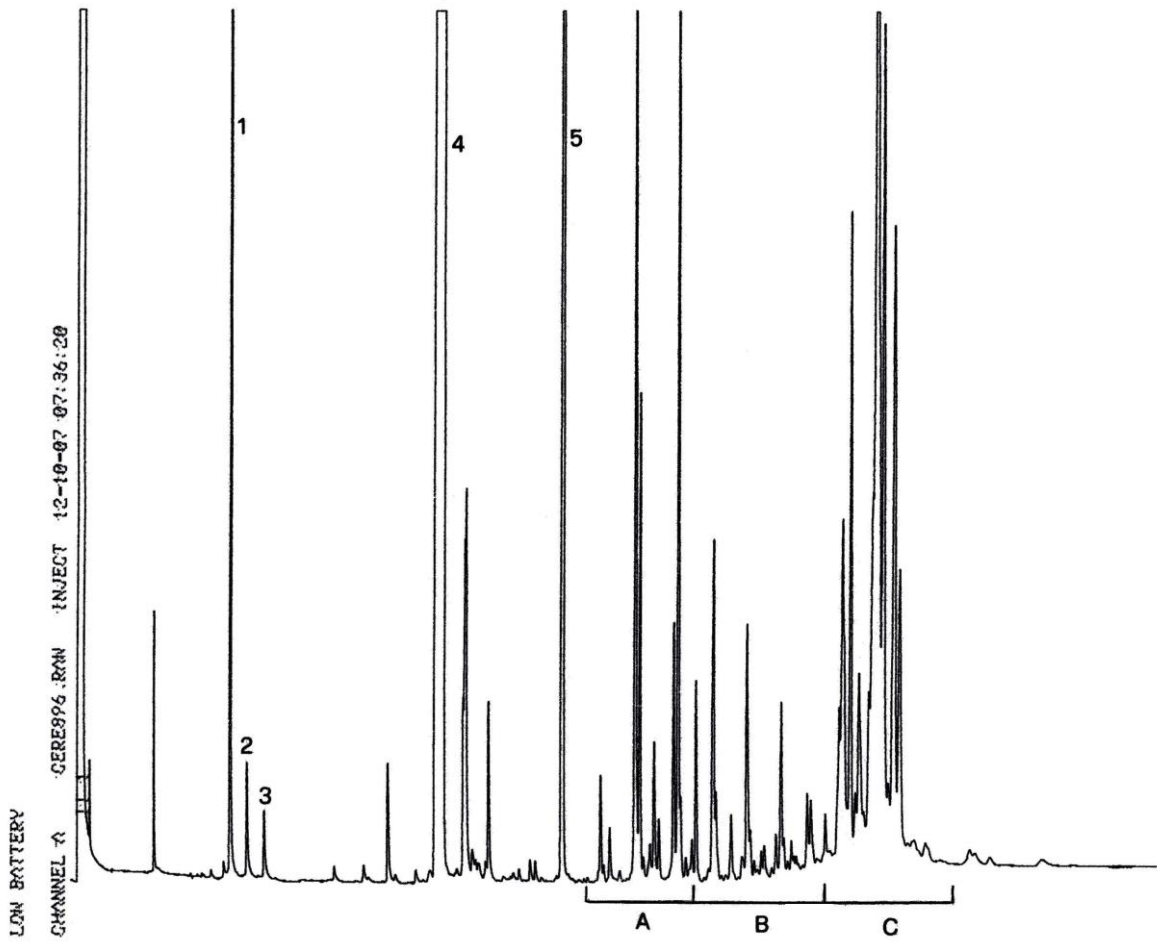


Şekil 2

Natürel Zeytinyağının Metil Esterleri, Etil Esterleri ve Mumsu Maddelerine ait kromatogram

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 Maddeleri kromatogramı

Burada:

1- Metil heptadekanoat I.S.

2- Metil C18

3- Etil C18

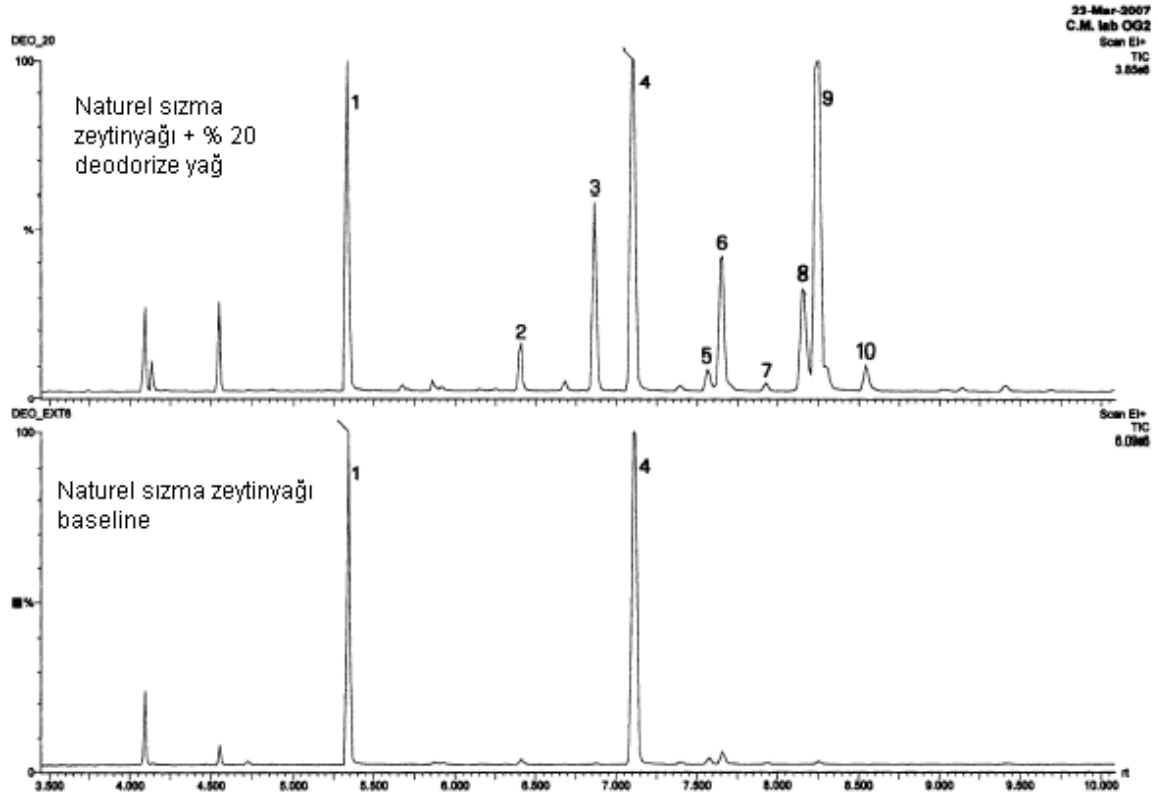
4- Squalen

5- Lauril araşidat I.S.

A- Diterpenik esterler

B- Mumsu maddeler

C- Sterol ve triterpenik esterler



Şekil 4

Natürel Sızma Zeytinyağı ve aynı yağın %20 deodorize yağ içeren 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 I.S. | 9- Etil oleat |
| 5- Metil linoleat | 10- Etil stearat |

EK-7

2-Gliseril Monopalmitat Yüzde Miktarının Tayini

1. Kapsam

Bu metot 2-gliseril monopalmitatın değerlendirilmesiyle trigliseritlerin 2-pozisyonundaki palmitik asitin yüzdesinin belirlenmesi için gerekli yöntemi tanımlar ve oda sıcaklığındaki (20 °C) sıvı bitkisel yağlara uygulanabilir

2. Prensip

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. Monogliserit fraksiyonundaki 2-gliserit monopalmitat yüzdesi silillendirilmenin ardından kapiller kolonlu GC kullanılarak belirlenir.

3. Cihaz ve malzemeler

- 3.1 Erlen: 25 mL' lik
- 3.2 Beherler: 100, 250 ve 300 mL' lik
- 3.3 Musluklu kromatografik cam kolon: İç çapı 21-23 mm, uzunluğu 400 mm olan,
- 3.4 Mezürler: 10, 50, 100 ve 200 mL' lik
- 3.5 Balonlar: 100 ve 250 mL'lik
- 3.6 Vakumlu döner buharlaştırıcı
- 3.7 Cam santrifüj tüpleri: 10 mL' lik, konik dipli, kapaklı
- 3.8 Santrifüj cihazı: 10 ve 100 mL'lik tüplere uygun
- 3.9 Su banyosu: $40 \pm 0,5$ °C'ye ayarlanabilen
- 3.10 Pipetler: 1 ve 2 mL' lik, dereceli
- 3.11 Plastik enjektör: 1 mL' lik (tıbbi enjektör)
- 3.12 Mikro enjektör: 100 µL'lik
- 3.13 Ayırma hunisi: 1000 mL' lik
- 3.14 Kapilar gaz kromatografi cihazı: On-column enjeksiyon bloğuna sahip ve ± 1 °C hassasiyetli termostat kontrollü fırın ile donanımlı, kapiler kolonla çalışmaya uygun
- 3.15 Soğuk enjeksiyon bloğu (on column): Kolonun içine direk enjeksiyon için
- 3.16 Alev-iyonizasyon dedektörü (FID)
- 3.17 Bilgisayar sistemi ve yazıcı: Gaz kromatografi verilerini kaydedebilecek
- 3.18 Kapiler kolon: 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
- 3.19 Enjektör: 10 µL'lik. En az 7,5 cm uzunluğunda sertleştirilmiş iğnesi olan ve kolonun içine direk enjeksiyon için uygun

4. Kimyasallar

- 4.1. Silikajel: Tanecik boyutu 0,063-0,200 mm olan (70/280 mesh),
Hazırlanışı; Silikajel 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. n-hekzan: Kromatografik saflıkta,
- 4.3. İzopropanol
- 4.4. İzopropanolun 1:1 lik (v/v) sulu çözeltisi
- 4.5. Pankreatik lipaz enzimi:

Lipaz aktivitesi 2,0-10 ünite/mg olan (aktivitesi 2-10 mg/ünite olan enzim ticari olarak mevcuttur),

4.6. Tampon çözelti:

1:1 (v/v) oranında seyreltilmiş HCl çözeltisi ile pH'sı 8' e ayarlanmış 1 M'lık tris (hidroksimetil)aminometanın sulu çözelti

4.7. Sodyum kolat çözeltisi:

Enzimatik saflıktaki kimyasalın sulu % 0,1'lik çözelti. Bu çözelti hazırlandıktan sonra 2 hafta içinde kullanılmalıdır.

4.8. Kalsiyum klorür çözeltisi: % 22' lik (m/v) sulu çözeltisi,

4.9. Dietil eter: Kromatografik saflıkta

4.10. Yıkama çözeltisi;

n-hekzan:dietil eter (87:13, v/v)

4.11. Sodyum hidroksit çözeltisi: % 12'lik (m/v),

4.12. Fenolftalein çözeltisi: %1'lik (m/v).

%96'lık (v/v) etanolle hazırlanır.

4.13. Taşıyıcı gazlar: Yüksek saflıkta hidrojen veya helyum

4.14. Yardımcı gazlar:

Yüksek saflıkta hidrojen

Yüksek saflıkta kuru hava

4.15. Silillendirme reaktifi:

9:3:1 (v/v/v) oranında piridin/heksametil disilazan/trimetil klorosilan karışımından hazırlanır. Piyasada kullanıma hazır silillendirme reaktifi bulunmaktadır (örneğin eşit miktarda susuz piridin ile seyreltilerek kullanılan bis-trimetilsilil triflor asetamid + % 1 trimetil klorosilan).

4.16. Referans numune:

Saf monogliseritler veya numunedeki yüzde miktara benzer miktarda olan ve yüzde bileşimi bilinen monogliserit karışımı.

5. Prosedür

5.1 Numunenin hazırlanması:

5.1.1 Numunenin serbest yağ asitliği oleik asit cinsinden % 3'ün altındaysa silikajel kolon kromatografisinden önce nötralizasyon işlemine gerek yoktur. Eğer % 3' ün üzerinde ise aşağıdaki prosedür uygulanır;

5.1.1.1 Ayırma hunisine 50 g numune tartılır ve 200 mL n-hekzan eklenerek numune çözülür. 100 mL izopropanol ve yağın serbest asitlik eşdeğerinin % 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 uzaklaştırılır. Çözünmeyen safsızlıklar da uzaklaştırılır. Hekzan fazı fenolftalein ile pembe renk vermeyinceye kadar 50-60 mL izopropanol çözeltisi (1:1) 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 25 mL'lik erlene hazırlanan yağ numunesinden tam 1g tartılır. 10 mL yıkama çözeltisi içinde çözülür. Kolon kromatografisinden önce en az 15 dk bekletilir. Eğer numune çözeltisi bulanıksa santrifüj edilerek kolon kromatografisine uygun hale getirilir (500 mg silika jel içeren hazır katı faz ekstraksiyon (SPE) kartuşları kullanılabilir.)

5.1.3 Kolonun hazırlanması:

Kolonun dibine cam pipetle bir parça cam yünü yerleştirilir. Kolona yaklaşık 30 mL yıkama çözeltisi eklenir. Kolondaki hava uzaklaştırılır.

Bir beherde 80 mL yıkama çözeltisi içinde 25 g silikajel ile süspansiyon hazırlanır. Huni yardımıyla kolona transfer edilir. Bütün silikanın kolona aktarılması için yıkama çözeltisi ile defalarca yıkanır ve kolona eklenir. Musluk açılarak çözücü seviyesi silikajelin 2 mm üstüne gelinceye kadar akıtılır.

5.1.4 Kolon kromatografisi:

Kolon kromatografisine uygun hale getirilmiş numuneli çözelti hazırlanan kolona transfer edilir. Süzüntü, tartımı alınmış 250 mL'lik balonda toplanacak şekilde musluk açılır ve numune silikajel seviyesine gelene kadar akıtıldıktan sonra akış hızı 2 mL/dk olacak şekilde 150 mL yıkama çözeltisi kolondan geçirilir. Böylece numune ortalama 60-70 dakikada kolondan geçer. Vakumlu döner buharlaştırıcıda çözücü uçurulur. Son kalıntılar da azot gazı altında uçurulur. Balon tartılır ve geri alınan miktar hesaplanır.

Eğer kullanıma hazır SPE kartuşları kullanıldıysa şu yol izlenir: 3 mL n-hekzan ile şartlandırılan kartuş üzerine 5.1.2' de hazırlanan çözeltinin 1 mL' si eklenir. Çözelti geçirildikten sonra 4 mL yıkama çözeltisi ile yıkanır. Toplanan çözelti 10 mL' lik tüpe alınarak azot gazı altında uçurulur. SPE' den önce ve sonra numunenin yağ asidi kompozisyonunun kontrol edilmesi gerekir.

5.2 Pankreatik lipaz ile hidroliz:

5.2.1 Hazırlanan numuneden santrifüj tüpüne 0,1 g tartılır. Her bir eklemeden 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 sıcaklığa getirilmiş su banyosunda tutulur.

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

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

5.3 Silil türevlerinin hazırlanması ve gaz kromatografisi:

10 mL'lik konik dipli bir tüpe mikro enjektör yardımıyla 5.2.3' te hazırlanan çözeltiden 100 µL 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 eklenerek GC için hazır hale getirilir.

5.4 Gaz kromatografisi (GC):

Çalışma koşulları:

- Enjeksiyon bloğunun sıcaklığı çözücünün kaynama noktasının (68 °C) altında olmalıdır
- 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

-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: numunenin 5 mL n-hekzandaki çözeltisinden 0,5-1 µL

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:

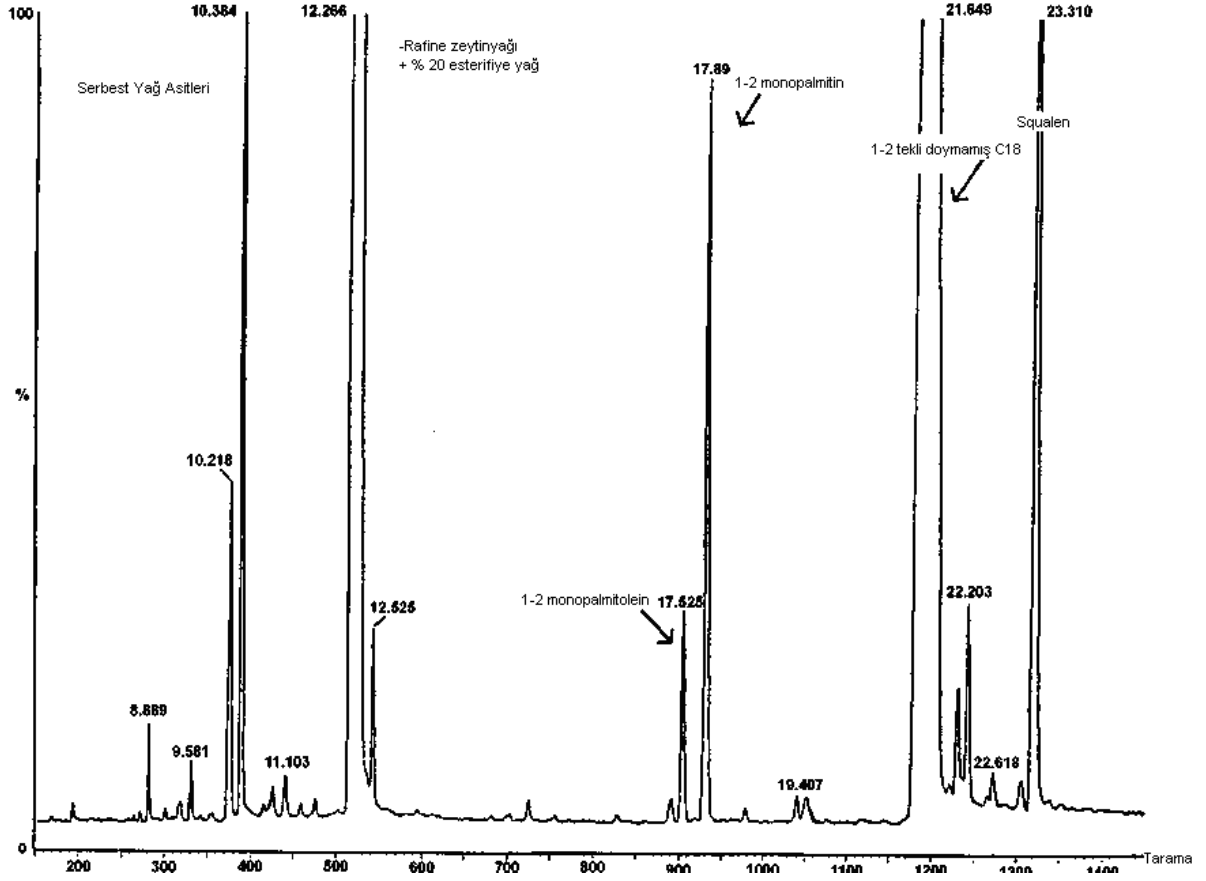
2-gliseril monopalmitatın yüzdesi ilgili pik alanının toplam pik alanına (Şekil 2) oranından aşağıdaki şekilde hesaplanır:

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

A_x: gliseril monopalmitat pikinin alanı

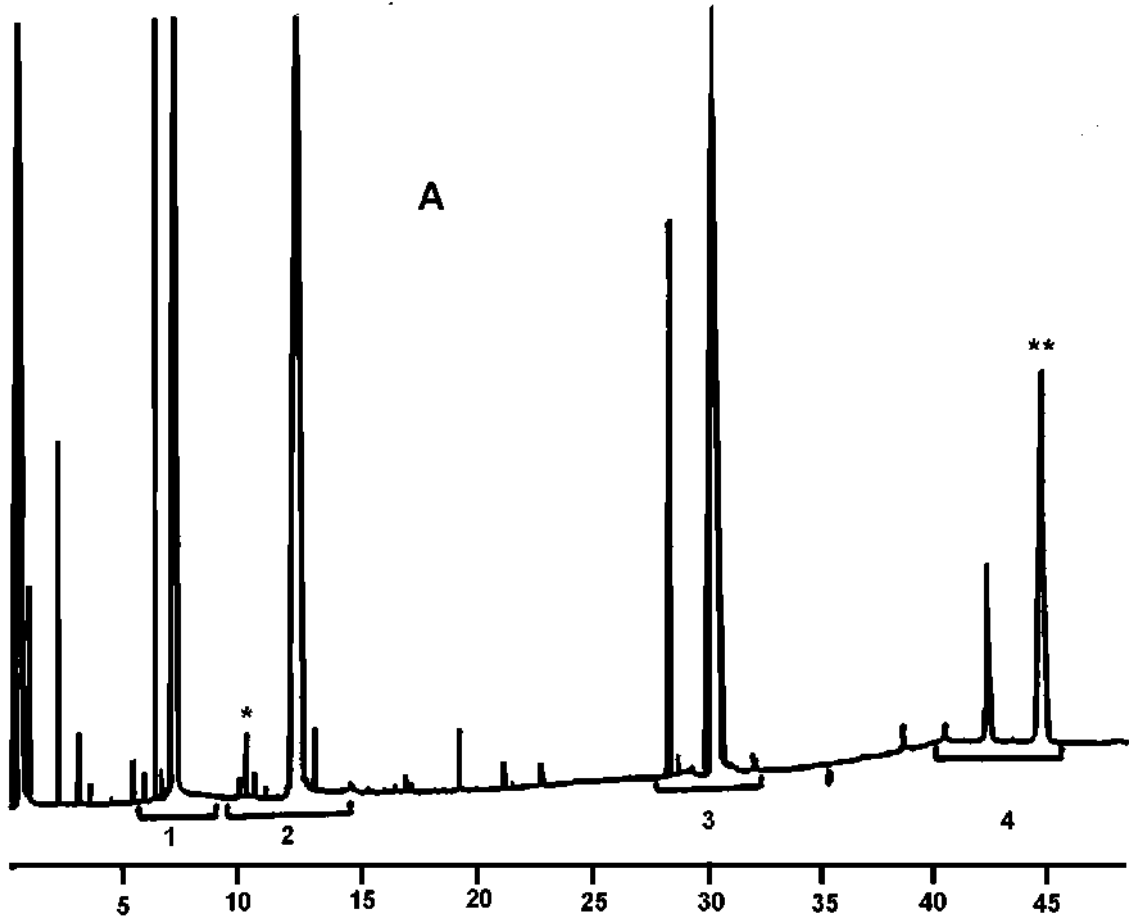
∑A : Monogliserit piklerinin toplam alanı

Sonuçlar bir ondalık olarak verilir.



Şekil 1

% 20 esterifiye yağ ve % 80 rafine zeytinyağı karışımının 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 lipaz aktivasyonundan sonra silillendirmesi ile elde edilmiştir.

Lipaz aktivasyonundan sonra trigliserid miktarı % 15'i geçmemelidir.

1 = Serbest yağ asitleri

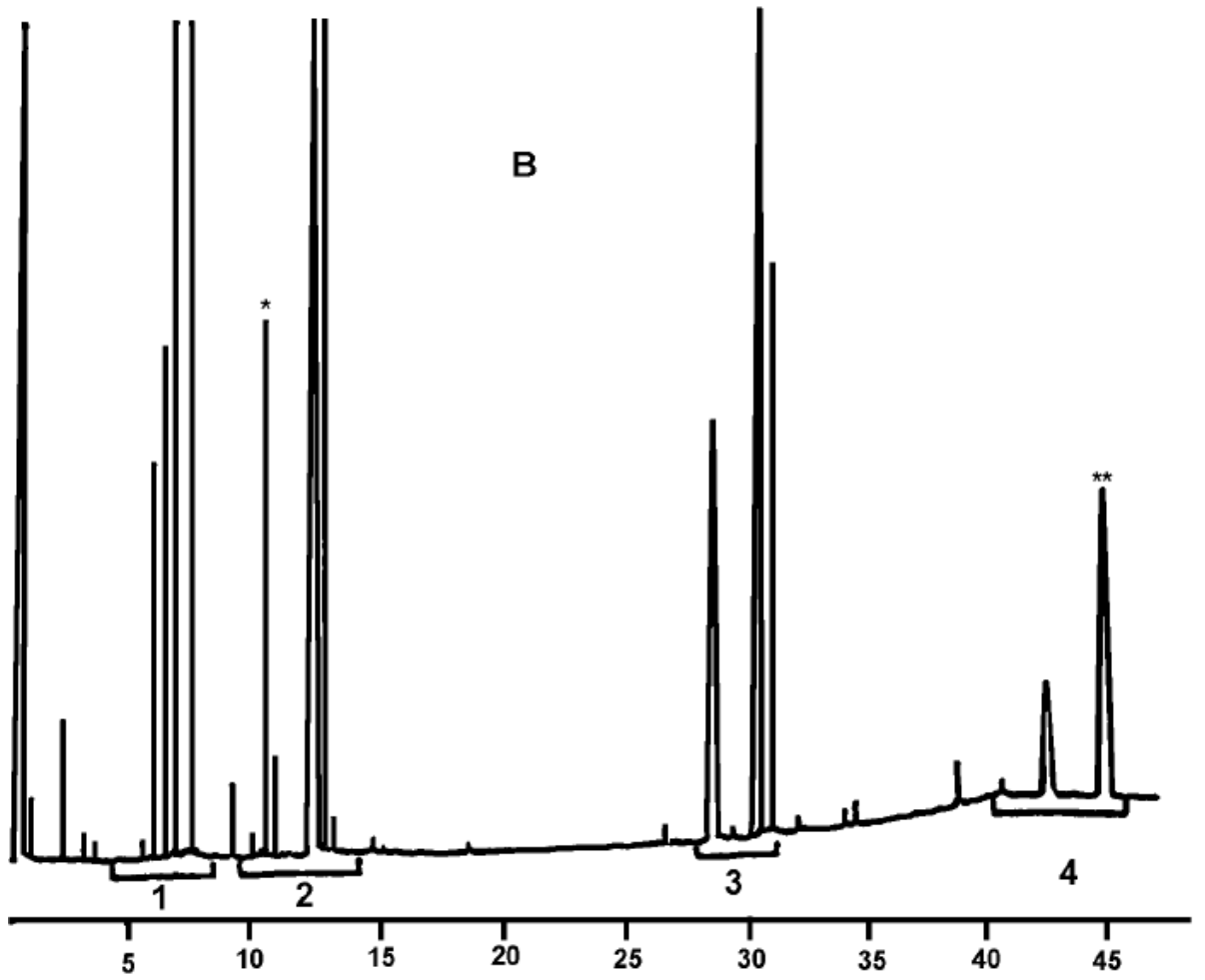
2 = Monogliseridler

3 = Digliseridler

4 = Trigliserdiler

* = 2-monopalmitin

**= Trigliserid C54



Şekil 3

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

Lipaz aktivasyonundan sonra trigliserid miktarı % 15'i geçmemelidir.

1 = Serbest yağ asitleri

2 = Monogliseridler

3 = Digliseridler

4 = Trigliserdiler

* = 2-monopalmitin

**= Trigliserid C54

7. Notlar

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

Not 2: Lipaz aktivitesinin kontrol edilmesi;

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

50 mL'lik beher bu emülsiyondan 10 mL konulur, ardından 0,2 g/mL'lik sodyum kolat çözeltilisinden 0,3 mL ve 20 mL saf su ilave edilir. Beher içeriği 37 °C'de sabit sıcaklıkta tutularak pH 8,3'e ulaşınca kadar 0,1 M sodyum hidroksit çözeltilisi damlatılır. Üzerine 0,1g/mL'lik lipaz çözeltilisinden yeteri kadar (1 mL) ilave edilir edilmez kronometre çalıştırılır ve pH tekrar 8,3 oluncaya kadar 0,1 M sodyum hidroksit çözeltilisinden damla damla eklenmeye devam edilir. Dakikada tüketilen alkali hacmi kaydedilir.

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

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

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-8

Ultraviyole Işığında Özgöl Soğurma Tayini

1. Amaç ve kapsam

Bu metot, zeytinyağı ve pirina yağının ultraviyole ışıktaki spektrofotometrik olarak incelenmesi yöntemini tanımlamaktadır. Elde edilen sonuçlar saklama ve işleme sırasında yağda meydana gelebilecek kalite değişimlerinin göstergesidir.

Bu yöntemde belirtilen özgöl dalga boylarındaki soğurma, yağlarda bulunan konjuge dien ve trien yapılarından kaynaklanmaktadır. Özgöl soğurma $E_{1cm}^{1\%}$ (% 1'lik çözeltinin 1 cm ışık yolundaki soğurması) "soğurma katsayısı" olarak bilinen K ile eşdeğerdir.

2. Prensip

Uygun bir çözücüde çözünen numunenin belirtilmiş olan dalga boylarında saf çözücüye karşı soğurmasının spektrofotometrik olarak belirlenmesidir. Tam olarak % 1'lik (w/v) konsantrasyondaki numunenin özgöl soğurması; 10 mm'lik hücrede, izo-oktan kullanılıyorsa 232 ve 268 nm'de, sikloheksan kullanılıyorsa 232 ve 270 nm'de belirlenir.

3. Cihaz ve malzemeler

3.1. Spektrofotometre: 220-360 nm arasındaki dalga boylarında okuma yapabilen

- 3.2. Kapaklı kuvartz küvetler: Su veya kromatografik saflıkta uygun başka bir çözücü ile doldurulduklarında soğurma değerleri arasındaki fark 0,01 den büyük olmayan ve 1 cm'lik ışık yoluna sahip
- 3.3. Balon jojeler: 25 mL'lik
- 3.4. Analitik terazi: 0,0001 g hassasiyette

4. Kimyasallar

Aksi belirtilmedikçe kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıkta olacaktır.

4.1. Çözücü:

- 4.1.1. İzoo-oktan (2.2.4-trimetilpentan): Spektrofotometrik saflıkta, 232 nm ve 268 nm'de ölçüm için.
- 4.1.2. Sikloheksan: 232 nm ve 270 nm'de ölçüm için
- 4.1.3. Kullanılacak çözücü 10 mm'lik hücrede distile suya karşı yapılan ölçümde 232 nm'de 0,12'den az, 250 nm'de 0,05'ten az özgül absorbansa sahip olmalıdır.

5. Prosedür

- 5.1. Numune homojen olmalı ve herhangi bir safsızlık içermemelidir. Ortam sıcaklığında sıvı olan yağlar yaklaşık 30 °C'de süzgeç kâğıdından süzülmalıdır.
- 5.2. Tam olarak 0,25 g numune hassas bir şekilde 25 mL'lik balon jojeye tartılır. Seçilen çözücü ile çözülerek, 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. Tüm dalgaboyu aralığında özgül soğurma ölçümü yapılması gerekli olmayabilir.

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 genişliği (cm)

Sonuçlar iki ondalıklı olarak ifade edilmelidir.

- 6.2. ΔK aşağıdaki formülle hesaplanır;

$$\Delta K = K_m - \frac{K_{m-4} + K_{m+4}}{2}$$

Burada;

K_m : m dalga boyunda özgül soğurma

En yüksek özgül soğurma (K_m); izo-oktan kullanılıyorsa 268 nm’de, siklo-hekzan kullanılıyorsa 270 nm’de elde edilmelidir. Bulunan ΔK sonucu ΔE olarak da verilebilir.

BİLGİ/AÇIKLAMALAR-1

Spektrofotometrenin kalibrasyonu

1. Spektrofotometre belirli aralıklarla 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. Spektrofotometrenin kontrolü aşağıdaki işlemler uygulanarak yapılır.

0,2000 g saf potasyum kromat tartılır ve 1000 mL’lik balon joje içinde 0,05 M 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-9A

Yağ Asitlerinin Metil Esterlerinin Gaz Kromatografisi İle Tayini

1. Kapsam

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

2. Kimyasallar

2.1. Taşıyıcı gaz

İnert gaz (azot, helyum, argon, hidrojen, v.b. tam olarak kurutulmuş ve oksijen içeriği 10 mg/kg’dan az.). Sadece kapiler kolonlar için taşıyıcı gazı olarak kullanılan hidrojen gazı analizin hızını iki katına çıkarabilir. Ancak tehlikeli olabileceğinden gerekli güvenlik önlemleri alınmalıdır.

2.2. Yardımcı gazlar

2.2.1. Yüksek saflıkta hidrojen: (saflık $\geq$ % 99,9) Organik bileşen içermeyen

2.2.2. Yüksek saflıkta kuru hava: Organik bileşen içermeyen

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 engellemek için önlem alınmalıdır.

3. Cihaz ve malzemeler

3.1. Gaz kromatografi cihazı;

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

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

3.1.3. Alev-iyonizasyon dedektörü (FID)

3.1.4. Gerekli bilgisayar sistemi ve bilgisayar sistemine bağlı yazıcı

3.2. Kapiler kolon: Uzunluğu en az 60 m, iç çapı 0,25–0,32 mm, film kalınlığı 0,10–0,30 μm olan, genellikle sabit fazı poliglikol (poli(etilen glikol) 20,000), polyester (bütandiol polisüksinat) veya polar polisiloksan (siyanosilikonlar) olan. Sabit fazı çapraz bağlı olanlar uygundur. 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 arttırılarak şartlanır. Şartlandırmaya, baseline herhangi bir pik olmaksızın doğrusal oluncaya kadar devam edilir, baseline sapma göstermemelidir. Baseline doğrusal olduktan sonra bir saat bu sıcaklıkta tutulmalıdır. İzotermal koşullar altında çalışmak için fırın tekrar 180 °C'ye ayarlanır.

Negatif doğrusal sapma: Kolon bağlantılarının doğru yapılmadığını gösterir.

Pozitif sapma : Kolonun yeterince şartlanmadığını gösterir.

3.3. Gaz kromatografi enjektörü: Sertleştirilmiş iğneli, 10 μL 'lik (0.1 μL taksimatlı)

4. Prosedür

4.1. Çalışma koşulları

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

- Split oranı: Çalışılan numuneye göre optimize edilir.

4.2. Numune miktarı

Ek-9B'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'lik çözeltisi hazırlanır ve bu çözeltiden 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.

Analiz sırasında 12 karbondan daha düşük yağ asitlerinin ayrılması gerektiğinde, daha düşük sıcaklıkta ve 20 karbondan daha büyük yağ asitlerinin ayrılması gerektiğinde ise daha yüksek sıcaklıkta çalışmak mümkündür. Örneğin, numune 12 karbondan daha düşük yağ asitlerini içeriyorsa enjeksiyon 100 °C'de yapılır (eğer butirik asit varsa 50 ya da 60 °C de kullanılabilir) ve hemen sıcaklık 4-8 °C/dk hızla optimum sıcaklığa artırılır. Belli durumlarda, her iki prosedür birleştirilebilir. Tüm bileşenlerin ayrımı yapıldıktan sonra sabit sıcaklıkta programa devam edilir. Eğer sıcaklık programı yapılmıyorsa 100-195 °C arasındaki iki sabit sıcaklık kullanılır.

Eğer gerekiyorsa piklerin maskelenmesi durumunda (C18:3 ve C20:0 veya konjuge C18:3 ve C18:2'nin eşzamanlı olarak bulunması gibi) numune analizinin farklı polaritede iki sabit 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 ayrıtılamayacağı 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 bağlı yüzdeleri hesaplanır.

5.2.2. Hesaplama metotları

5.2.2.1. Genel

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

$\sum A$ = Tüm yağ asidi piklerinin alanlarının toplamı

Sonuçlar 2 ondalıklı olarak verilir.

Buradaki bağıl alanlar temel alınarak yapılmış hesaplamanın sonuçlarının, kütlece yüzdeyi ifade ettiği kabul edilir. Bu varsayımın geçerli olmadığı durumlar için düzeltme faktörleri kullanılır.

5.2.2.2. Düzeltme faktörlerinin kullanılması

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

Düzeltme faktörleri, numuneyle aynı koşullar altında kompozisyonu bilinen metil esterlerinin referans karışımının analiziyle elde edilen kromatogram yardımıyla belirlenir.

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

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

Burada:

m_i = Referans karışım içindeki yağ asidi i 'nin kütlesi

$\sum m$ = 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

$\sum A$ = Tüm yağ asidi piklerinin toplam alanı

Bunu takiben düzeltme faktörü aşağıdaki gibi hesaplanır:

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

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

$$K'_i = \frac{K_i}{K_{C16}}$$

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

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

Sonuçlar 2 ondalıklı olarak verilir.

5.2.2.3. 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 15 veya 17 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.

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

Burada:

A_i = Yağ asidi i' nin pik alanı;

A_s = İç standardın pik alanı;

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

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

m = Numunenin mg cinsinden kütlesi;

m_s = İç standardın mg cinsinden kütlesi

Sonuçlar bir 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. Kapiler kolon: Uzunluğu 60 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.

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 koşulları

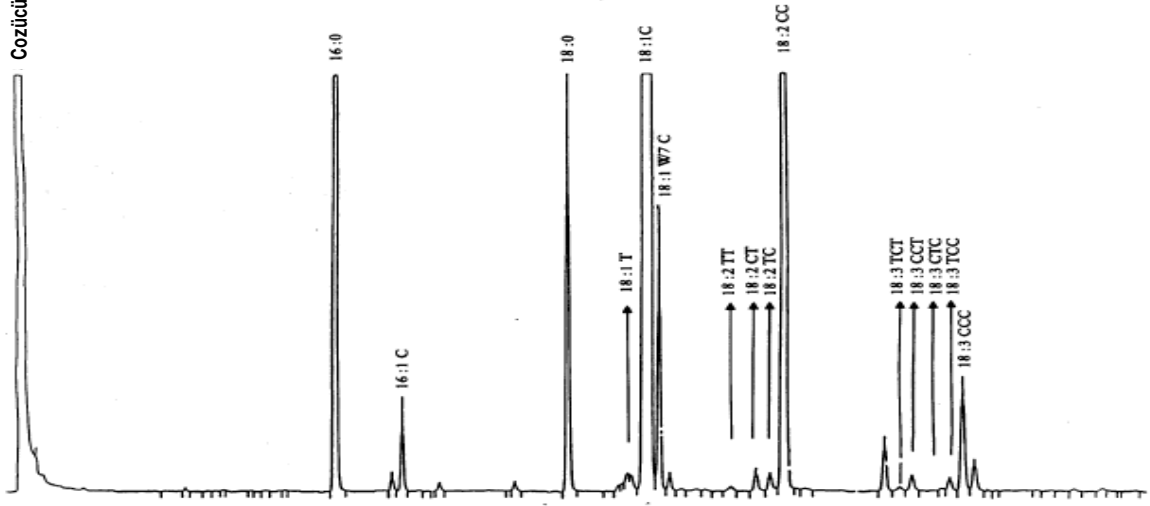
- Fırın sıcaklığı: 150 °C-230 °C (örneğin; 165 °C başlangıç sıcaklığında 15 dk bekletildikten sonra 5 °C/dk sıcaklık artışı ile 200 °C ye çıkarılır.)
- Enjeksiyon sıcaklığı:
Split/splitless sistem kullanılıyorsa 250 °C,
kolona doğrudan enjeksiyon (on-column) sistemi kullanılıyorsa kolonun başlangıç sıcaklığı;
- Dedektör sıcaklığı: 260 °C
- Taşıyıcı gaz: 1,2 mL/dk akış hızında helyum veya hidrojen

Enjekte edilen miktar, hassas şartlar altında C20 metil esteri (araşidik) 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 sürelerinin karşılaştırılmasıyla yapılır.

Trans yağ asitleri aynı yağ asidinin cis izomerinden 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 toplamaları 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 trans-trans [(TT) 18:2] ile 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].

Sonuçlar iki ondalık olarak verilir.

EK-9B

Yağ Asitlerinin Metil Esterlerinin Hazırlanması

Yağ asitleri metil esterlerini hazırlamak için aşağıdaki iki yöntemden biri kullanılır

Metot A: Potasyum hidroksitin 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 farkın (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 A 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 kolonundan geçirilerek, hekzan/dietil eterle (87:13, v/v) ile yıkanarak saflaştırılır.

Buna alternatif olarak silikajel fazlı katı-faz ekstraksiyon (SPE) kartuşları kullanılabilir. Silikajel kartuş (1 g, 6 mL) vakumlu süzme sistemine yerleştirilerek 6 mL hekzan ile şartlandırılır. Kolonun kurumasını önlemek için vakum serbest bırakılır ve bunu takiben 0,5 mL hekzan içerisinde yağ (0,12 g kadar) çözeltisi kolonun içine konulur ve vakumlanır. Kolon vakum altında 10 mL hekzan/dietil eter (87:13 v/v) çözeltisi ile yıkanır. Toplanan

süzüntü homojenize edilir ve iki eşit hacme bölünür ve vakumlu döner buharlaştırıcıda uçurulur. Bunlardan biri GC için diğeri HPLC için hazırlanır.

Yağ Asidi Metil Esterlerini Hazırlama Metotları

1. Metot A: Potasyum hidroksitin 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. Kimyasallar

Metanol: % 0.5'ten (m/m) fazla su içermeyen

Heptan: Kromatografik saflıkta.

Metanollü potasyum hidroksit çözeltisi: 2 M

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 M 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 gaz kromatografisine enjeksiyon için hazırdır. Heptan çözeltisi kromatografik analize kadar buzdolabında saklanmalıdır. Çözelti 12 saat içinde kullanılmalıdır.

2. Metot B: Metanollü sodyum metilat katalizörü eşliğinde 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. Kimyasallar

– Heptan: Kromatografik saflıkta

– Metanol: Su içeriği % 0.05'ten (m/m) az olan

- Metanolü sodyum metilat çözeltisi: 0.2 M
- Fenolftalein çözeltisi: % 0.2 lik metanollü
- Metanollü sülfürik asit çözeltisi: 0,5 M (100 mL metanole 3 mL % 96'lık sülfürik asit eklenir)
- Doygun sodyum klorür çözeltisi

2.4. Malzemeler

- Şilifli balonjoje: 50 mL'lik
- Geri soğutucu
- Kaynama taşları
- Cam huni

2.5. Prosedür

0,25 g yağ numunesi 50 mL'lik balon jojeye tartılır, bir huni yardımıyla 10 mL 0,2 M 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 0,5 M metanollü sülfürik asit ilave edildikten sonra üzerine 1 mL fazlası eklenir. Soğutucu takılır ve 20 dakika tekrar kaynatılır. Isıtıcıdan alınır ve balonjoje akan su altında soğutulur. Soğutucu çıkarılır ve 20 mL doymuş sodyum klorür çözeltisi ilave edilir ve çalkalanır. 5 mL heptan ilave edilir, balonjojenin 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.

Metot B ile metillendirme mutlaka bir çeker ocak içinde yapılmalıdır.

2.6. Metot B ile metillendirme işlemine 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

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

2.6.1.3. Kimyasallar

Hidroklorik asitin % 2'lik metanollü çözeltisi: Çözelti, gaz halindeki hidroklorik asit ve susuz metanolden hazırlanır.

Hekzan: Kromatografik saflıkta

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 vial 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

- Deney tüpü: Ortalama 1 m uzunluğunda hava soğutmalı yoğuşturucuya bağlanabilen, cam bağlantı yeri olan 20 mL’lik
- Pipet: 5 mL’lik.
- Ayırma hunisi: 50 mL’lik
- Beher: 10 mL’lik ve 25 mL’lik
- Konik tabanlı deney tüpü: 15 mL’lik

2.6.2.3. Kimyasallar

- Metillendirme reaktifi: 75:25:1 (v/v/v) oranında susuz metanol–hekzan–konsantre sülfürik asit ($d = 1.84 \text{ g/cm}^3$)
- Petrol eteri
- Susuz sodyum sülfat

2.6.2.4. Prosedür

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

Geri soğutucuya yerleştirilir ve kaynayan su banyosunda 30 dakika ısıtılır. Kaynamayı kontrol etmek için, deney tüpünün içerisine cam baget konulur ve su banyosunun sıcaklığı 90 °C’de tutulur.

Miktarı bilinen karışım, 10 mL saf su ve 10 mL petrol eterinin yardımıyla 50 mL’lik ayırma hunisine konulur. 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.

Çözelti su banyosunda azot gazıyla uçurulur.

3. Metillendirme yöntemlerinin kesinlik parametreleri

A ve B yöntemlerinin kesinliğinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi Uluslararası Zeytin Konseyi tarafından COI/T.20/DOC.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 çözeltisinin kromatografik analizleri ISO-5508 standardına uygun olarak ve kapiler kolon kullanılarak (uzunluğu 60 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 ΔECN42’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 ω9 ve ω7 izomerlerine karşılık gelen tüm piklerin alanlarının toplamı.

Heptadekanoik / Margarik (C17:0)

Heptadesenoik / Margoleik (C17:1)

Stearik (C18:0)

Oleik (C18:1) Metil ester ω9 ve ω7 izomerleri, etil ester, metil esterlerin trans-izomerlerine karşılık gelen tüm piklerin alanlarının toplamı.

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

Araşidik (C20:0).

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

Eikosenoik (C20:1).

Behenik (C22:0).

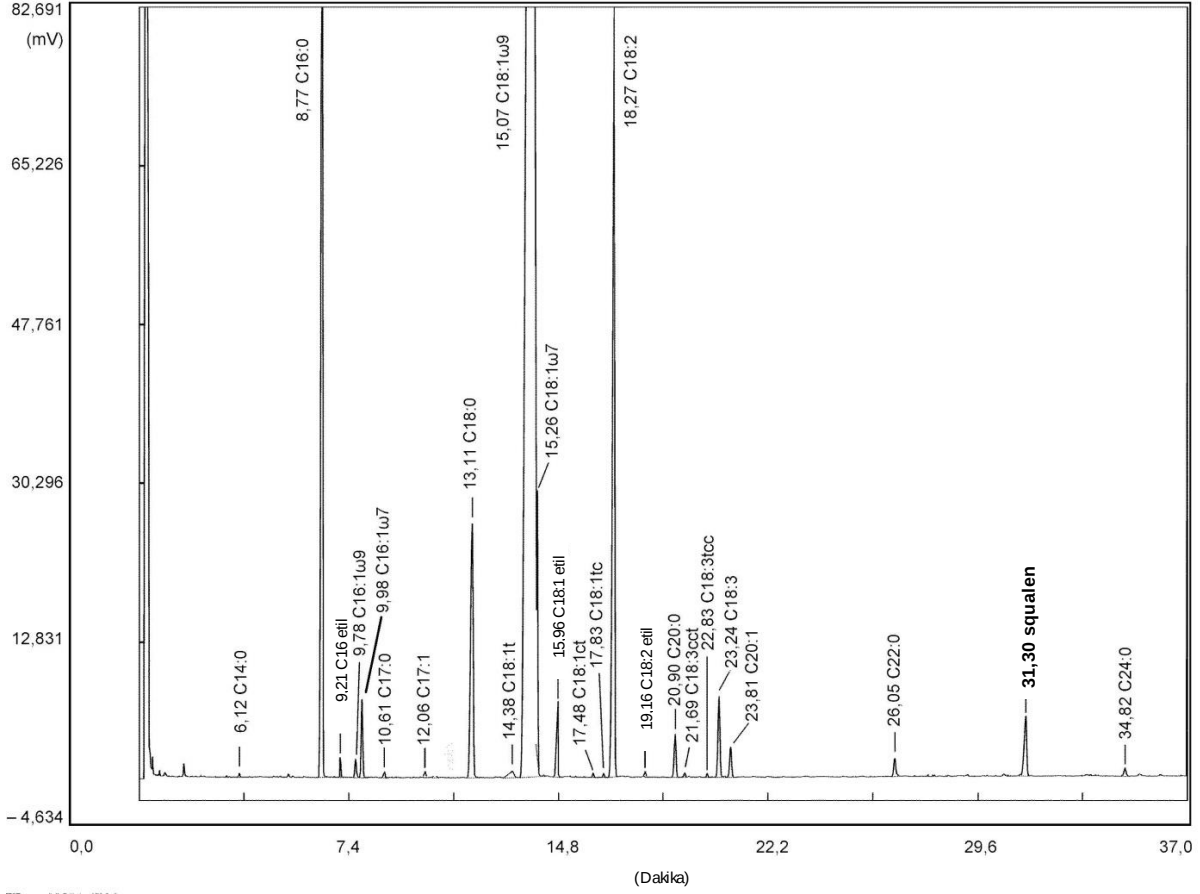
Lignoserik (C24:0).

Toplam alanın hesaplanmasında squalen alanı dikkate alınmamalıdır.

2.2. Trans-C18:1 yüzdelerinin 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-10

Uçucu Halojenli Çözücülerin Tayini

1. Metot

Metodun prensibi çözücüyle ekstrakte edilen yağlarda tetrakloroetilen miktarının tespitine dayanır. Aynı metotla 1,1,1 trikloroetan, dibromoklorometan ve bromoform da tespit edilebilir.

2. Cihaz ve malzemeler:

- 2.1. Gaz kromatografi cihazı: Elektron yakalama dedektörlü (ECD)
- 2.2. Head space (HS) 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 veya hidrojen

- 2.5. 10-15 mL'lik cam balon ya da 20 mL'lik HS vialleri, teflon kaplanmış ve enjektör girişine uygun alüminyum tıpa (HS vial kapağı)
- 2.6. Hermetik kapatma aleti
- 2.7. Gaz şırıngası: 0,5-2 mL'lik
- 2.8. Şırınga: 1µL ve 5µL'lik
- 2.9. Pipet veya şırınga: 40 µL'lik

3. Kimyasallar

Standart; Gaz kromatografiye uygun saflıkta halojenli çözücüler.

4. Prosedür

4.1. Cam balona yaklaşık 3 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:

-Enjeksiyon sıcaklığı: 150 °C

-Fırın sıcaklığı : 70-80 °C

-Dedektör sıcaklığı: 200-250 °C

Sıcaklıklar, elde edilen sonuçlara göre ayarlanabilir.

4.2. Standart çözelti: Kalıntı bulunmayan rafine zeytinyağı kullanılarak 0,05-1 ppm aralığında (numunede beklenen miktara göre değişebilir) hazırlanır. Gerekliyse halojen standartlar pentan ile seyreltilebilir.

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 edilmelidir. Madde içeriği her bir enjeksiyondan elde edilen sonuçların ortalaması alınarak verilmelidir.

4.4. Sonuçların verilmesi: Halojenli çözücülerin toplamı ppm (mg/kg) olarak ifade edilir. Bu metodun tespit limiti; 0,01mg/kg'dır.

EK-11

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

Tarif edilen metot sadece naturel zeytinyağlarına ve bu tür yağların bir panel olarak seçilen, eğitilen ve gözlemlenen bir grup tadımcı tarafından yağdaki kusurlarının şiddetine, aromasına (meyvemsilik) ve diğer pozitif özelliklerine göre sınıflandırılmasında ya da etiketlenmesinde kullanılabilir. Ayrıca isteğe bağlı etiketleme için bulgular sağlar.

Bu prosedürde atıf yapılan UZK standartlarının güncel versiyonları uygulanır.

3. Duyusal analiz için genel terimler

IOC/T.20/Doc. No 4 'duyusal analiz: genel terimler' standardındaki terimlerdir.

4. Özel terimler

4.1. Pozitif özellikler

- *Meyvemsi*: Zeytinin çeşidine bağlı olarak sağlıklı, taze, yeşil ya da olgun meyveden elde edilen yağın algılanan karakteristik meyvemsi aroması. Bu koku direk olarak ve/veya burunun arkasında algılanır.

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

- *Yakıcılık*: Yağın duysal karakteristiği olan yakma hissidir. Çoğunlukla hasat zamanının başlangıcında hala yeşil olan zeytinlerden üretilen yağlarda hissedilir. Bu his, tüm ağız boşluğunda algılanabilir, özellikle boğazda hissedilir.

4.2. Negatif özellikler

- *Kızışma-çamurumsu tortu*:

Kızışma; yığın olarak saklanan veya depolanan zeytinlerden üretilen yağların, anaerobik fermantasyonunun ileri safhalarındaki zeytinlerden üretilen yağların karakteristik tat ve kokusunu tanımlar,

Çamurumsu tortu; depolama tanklarının ya da fiçilerin dibinde biriken tortuyla temasta bırakılan yağlarda anaerobik fermantasyon sonucu oluşan karakteristik tat ve kokuyu tanımlar

- *Küflü-rutubetli-topraksı*: Nemli koşullarda uzun süreli depolama sonucunda çok sayıda küf ve mayanın gelişmiş olduğu meyvelerden üretilen ya da yerden (topraktan, çamurdan) toplanan meyvelerin yıkanmadan üretime katılması ile elde edilen yağların karakteristik tat ve kokusu.

- *Şarabımsı-sirkemsi/asidik-ekşimsi*: Bazı yağların şarap veya sirkeyi hatırlatan karakteristik tat ve kokusu. Bu tat ve koku zeytinlerin veya zeytin hamurunun preslenmesinde iyi temizlenmemiş hasırlar kullanılması nedeni ile aerobik fermantasyonunun başlaması ve sonucunda asetik asit, etil asetat ve etanol oluşmasından kaynaklanır.

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

- *Islak odun(don vuruğu)*: Don zararına uğramış zeytinlerden elde edilmiş yağın tadı.

4.3. Diğer negatif özellikler

- *Isıtılmış veya yanmış*: Üretim sırasında ısıtma işleminin yüksek sıcaklıkta ve/veya uzun süreli uygulanması sonucu oluşan karakteristik tat ve kokudur. 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.

- *Metalik*: Zeytinin ezme, karıştırma, presleme veya yağın depolanması esnasında metalik yüzeylerle uzun süreli temasta bulunmasından kaynaklanan tat.

- *Hasırımıslı*: Yeni tasiriye torbalarıyla preslenmiş zeytinlerden elde edilen yağın karakteristik tadı. Bu tat, tasiriye torbalarının yeşil veya kurutulmuş ottan yapılmış olmasına bağlı olarak değişebilir.

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

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

4.4. Etiketleme için isteğe bağlı terminoloji

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

Pozitif özellik (meyvemsi-yeşil ya da olgun-yakıcı-acı) algılanan yoğunluğa göre:

(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.

Meyvemsi: Zeytinin çeşidine bağlı olarak sağlıklı, taze, yeşil ya da olgun meyveden elde edilen yağın algılanan karakteristik meyvemsi aromasıdır. Bu koku direk olarak ve/veya burnun arkasında algılanır.

Yeşil Meyvemsi: Taze, sağlıklı yeşil meyveden elde edilen yağların algılanan karakteristik meyvemsi aromasıdır. Taze ve yeşil zeytinden gelen duyuşal özellik zeytin çeşidine bağlıdır. Direk olarak ve/veya burnun arkasında hissedilir.

Olgun Meyvemsi: Taze, sağlıklı olgun meyveden elde edilen yağların karakteristik aromasıdır. Taze zeytinden gelen duyuşal özellik zeytinin çeşidine bağlıdır. Direk olarak ve/veya burnun arkasında hissedilir.

Dengeli: Yağın verdiği koku, tat ve his özellikleri bakımından acı ve/veya yakıcı özelliğinin medyan değeri meyvemsi özelliğinin medyan değerinin 2 puan üstünde olan yağlardır.

Yumuşak Yağ: Acı ve yakıcılık özellikleri meydanlarının 2 veya daha az olan yağlar

5. Tadım bardakları

IOC/T.20/Doc. No 5, "Tadım Bardakları" standardına uygun bardaklar.

6. Tadım Odası

IOC/T.20/Doc. No 6 "Tadım Odalarının Hazırlanması" standardına uygun olmalıdır.

7. Ekipmanlar

Tadımcının, görevini gerektiği gibi yerine getirebilmesi için gerekli aşağıdaki aksesuarlar, her bir tadım kabiniinde temin edilmiş ve kolayca erişilebilir durumda olmalıdır.

- Numuneyi içeren, numaralandırılmış, ağzı saat camı ile kapatılmış ve $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ de tutulmuş tadım bardakları;
- Duyusal değerlendirme formu (Şekil 1)
- Tükenmez veya silinmeyen kalem
- Elma dilimleri ve/veya su, karbonatlı su ve/veya galeta içeren tabak
- Oda sıcaklığında su

- Genel kuralları içeren liste (bkz madde 9.3 ve 10.1)
- Tükürme kabı

8. Panel lideri ve tadımcılar

8.1. Panel lideri

Panel lideri; yağ çeşitleri konusunda uygun eğitimi almış bir uzman olmalıdır. Panelde kilit pozisyonadadır ve panelin organizasyonundan ve işleyişinden sorumludur.

Panel liderinin görevi, temel eğitimde duyuşal analiz ortamının hazırlanması, titiz davranması, duyuşal yeteneğe sahip olması, testlerin organize edilmesi, testleri planlanması konusunda yeteneğe ve sabıra sahip olması, bilimsel yolla testleri gerçekleştirmesidir.

Panel lideri, tadımcıların yeteneklerini tespit etmek amacı ile onları seçme, eğitme ve izlenmesinden sorumlu tek kişidir. Onlar testleri ve kesin kabul ve reddetme kriterleri ile ilgili prosedürleri oluşturmaktan ve her zaman objektif olarak tadımcıları değerlendirmekten sorumludurlar. IOC/T.20/Doc.No 14 ‘tadım panelistlerinin seçimi, eğitimi, performanslarının takibi’ standardı rehber alınır.

Panel lideri güvenilir ve objektif kanıtlarla panelin performansından ve ayrıca gelişiminden sorumludur. Her koşulda metot ve tadımcıların kontrol altında olduklarını her zaman kanıtlamalıdır. Panelin periyodik kalibrasyonu önerilir. (IOC/T.20/Doc. No 14, §5)

Panel lideri panelin kayıtlarını tutmakla yükümlüdürler. Bu kayıtlar izlenebilir olmalıdır. Uluslararası duyuşal analiz standartlarının kalite gereksinimlerini sağlamalı ve numunelerin gizliliğini her zaman güvence altına almalıdırlar.

Bu yöntemin özelliklerine uygun alet ve ekipmanların test koşullarına uygun olarak temizlenmesi, bakımı ve bunların kanıtlanabilir kayıtlarının tutulmasından, envanterinden sorumludurlar.

Analizden sonra numunelerin saklanması yanı sıra laboratuvara gelişine kadar numunelerin kabulü ve saklanması ile görevlidir. Bunu yaparken, prosesin izlenebilirliği ve garanti altına alınabilirliğinin sağlanması için yazılmış prosedürler oluşturulması amacı ile numunelerin gizli tutulmasından ve tam anlamıyla saklandığından emin olmalılar.

Bununla birlikte, tadımcılar tarafından oluşturulan verilerin birleştirilmesi ve istatistiksel olarak işlenmesi ile beraber önceden oluşturulmuş protokollerle belirlenmiş uygun deneysel tasarıma göre tadımcılara örnekleri hazırlamak, kodlamak ve sunmaktan sorumludur.

Bu standardı tamamlamak ve panel işlevlerini tam anlamıyla sağlamak için gerekli olabilecek diğer prosedürlerin taslak haline getirilmesi ve geliştirilmesi ile görevlidir.

Panelin tam anlamı ile çalışıp çalışmadığından emin olmak için panelin sonuçlarını, natürel zeytinyağının analizleri ile çalışan diğer panellerden elde edilen sonuçlarla karşılaştırmak için yollar aramalıdır.

Panel lideri panel üyelerini cesaretlendirici ve onların arasındaki merak ve yarışma ruhunu teşvik edici olmalıdır. Bunun için panel liderinin, yaptıkları iş ve elde edilen sonuçlar hakkında panel üyelerini bilgilendirmek suretiyle iki yönlü bilgi akışı sağlandığından emin olmaları şiddetle önerilmektedir. İlave olarak kendi fikirleri gizli olmalı ve panelistler arasında kendi kriterlerini diğer tadımcılara kabul ettirecek olası liderlerin oluşmasını önlemelidir.

Tadımcıları yeterli sayıda toplamalı ve testlerin performansı hakkında soruları cevaplamalı, ancak numune hakkında herhangi öneri yapmaktan kaçınmalıdır.

8.2. Tadımcılar

Zeytinyağında yapılan duysal testleri tadımcı olarak yapan kişiler herhangi bir mecburiyet hissetmeden ve parasal ödeme olmadan gönüllü yapmalıdırlar. Adaylara yazılı bir başvuru yapmaları tavsiye edilir. Adaylar, benzer örnekleri ayırtabilme becerilerine göre panel lideri tarafından seçilmeli, eğitilmeli ve izlenmelidirler. Panelistlerin tutarlılıklarının eğitimle arttırılabilceği unutulmamalıdır.

Tadımcılar gerçek duysal inceleyicileri gibi kendi kişisel hislerini bir kenara koymalı ve algıladıkları duyuları raporlayacak şekilde hareket etmelidir. Bunu yapmak için her zaman sessiz, sakin, acele etmeden, tattıkları numuneye duysal ilgilerini tamamıyla vererek çalışmalırlar.

Her test için 8 ile 12 tadımcı gerekmektedir. Ancak bazı kayıplar olacağı düşünülerek fazladan deneyimli tadımcıların bulunması uygun olabilir.

9. Tadım koşulları

9.1. Numunenin sunumu

Tadımı yapılacak örnek ilgili dökümanda (COI/T.20/Doc No:5) belirtilen standart tadım bardağı ile sunulmalıdır.

Bardağa 12,8-14,6 g veya 14-16 ml yağ örneği konulur ve ağzı saat camı ile kapatılır. Bardakların üzeri her bir örnek için rakamlar veya rakam-harf kombinasyonu kullanılarak rastgele kodlanmış olmalıdır. Kodlama yapılan kalem koku içermemelidir.

9.2. Tadım koşulları, numune sıcaklığı ve tadım zamanı

Örnekler koyulduktan sonra tadım bardaklarının üzeri saat camı ile kapatılarak $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'ye ayarlı ısıtıcılarda tadımcılara sunulmalıdır. Bu sıcaklık tat ve koku veren bileşenlerin en iyi algılanabildiği sıcaklık olması nedeniyle önemlidir. Çünkü, düşük sıcaklıkta aroma maddelerinin uçuculuğu daha düşük iken (IOC/T,20/Doc. No 5) yüksek sıcaklıklar ısıtılmış yağlara özgü uçucu bileşiklerin oluşumunu yol açmaktadır. Tadım yapılacak ortam sıcaklığı $20-25^{\circ}\text{C}$ arasında olmalıdır. (IOC/T20/Doc. No6)

Sabahları test için en uygun zamandır. Gün içinde tatma ve koklama periyotlarının optimum algılandığı zamanlar olduğu ispatlanmıştır. Koklama ve tat alma duyuları yemekten önce yükselirken, daha sonra düşüşe geçer. Her ne kadar bu kriterlerde açlığın tadımcının dikkatini dağıtabileceği olasılığı çok ciddiye alınmasa da tadımcının ayırt etme kapasitesini düşürebilir. Bu nedenle tadım zamanının sabah 10:00 ile öğlen 12:00 arasında olması tavsiye edilmektedir.

9.3. Tadımcının uyması gereken kurallar

- Tadımdan en az 30 dakika öncesine kadar sigara veya kahve içmemelidir.
- Tadım saatine kadar kokusu kaybolmayacak herhangi bir parfüm, kozmetik ürünü veya sabun kullanmamalıdır.
- Tadımdan bir saat öncesine kadar hiçbir şey yiyip içmemelidir.
- Eğer kendini fiziksel olarak iyi hissetmiyorsa ve bilhassa koklama veya tatma duygusu bundan etkilenmişse, ya da işine konsantre olmasını engelleyen herhangi bir psikolojik etki altındaysa, tadımcı testten çekilmesi görüşüyle veya panelin geri kalanı için ortalama değerlerden olası sapmayı düşünerek yerinde kararların alınması için panel liderini bilgilendirmelidir.

- Tadımcı duyuşal değerlendirme formunda verilen bilgileri dikkatlice okumalı, kendisini görevini rahat ve sakin bir şekilde yapmak üzere hazır hissedinceye kadar teste başlamamalıdır, eğer herhangi bir şüphe duyarsa panel liderine danışmalıdır.
- Tadım sırasında tadımcı sessiz kalmalıdır.
- Tadımcı sıra kendine geldiğinde ona tahsis edilen bölümde bulunmalı ve işi bittiğinde düzenli ve sessiz bir şekilde ayrılmalıdır.
- Tadım sırasında konsantrasyonu bozacak davranışlardan uzak durulmalı ve sessiz ortam sağlanmalıdır.

10. Duyusal değerlendirme ve naturel sızma zeytinyağının sınıflandırılması prosedürü

10.1. Tadımın yapılması

Tadımcı, bardağı saat camıyla kapalı tutarak eline alır ve nazikçe eğer; sonra bardağın cidarını mümkün olduğu kadar çok ıslatmak için bardağı bu pozisyonda hafifçe alkalar. Bu aşama tamamlanır tamamlanmaz, saat camını açar ve yağı değerlendirmek için yavaş ve derin nefesler alarak koklar. Koklama 30 saniyeyi aşmamalıdır. Eğer bu süre zarfında hiçbir sonuca varılmamışsa, tekrar denemeden önce kısa bir süre dinlenmelidir.

Koklama testi bittiğinde, tadımcı lezzet testini uygulamaya geçer (kapsamlı koklama-tatma-dokunma hissi). Lezzet testi için yaklaşık 3 mL yağ içeren ufak bir yudum alınır. Yağı, ağzın ve dilin n kısmından kenarlar boyunca arka kısıma, damağa ve gırtlաęa doğru gönderir. Yağı ağiz boşluğunun tümüne dağıtmak çok önemlidir. Çünkü dört esas tadın (tatlı, tuzlu, asitli-ekşi ve acı) algılanma yoğunluğunun, dil, damak ve gırtlաęın alanına bağlı olarak farklılık gösterdiği bilinen bir gerçektir. Tadımcının acı ve yakıcı tatlara konsantre olup, tadını alabilmesi için, yeterli miktarda yağın, dilin arkası üzerinden, damak ve gırtlաęa çok yavaş yayılması, esas olarak çok önemlidir; bu böyle olmadığı takdirde, bazı yağlarda her iki uyarı da dikkatlerden kaar veya acılık, yakıcılık tarafından gölgelenebilir.

Kısa ve ard ardına alınan nefes ile havanın ağza doğru itilmesi, tadımcının sadece numunenin tüm ağiz boşluğuna yayılmasını değil aynı zamanda tadımcının, bu hava kanallarını zorlanması sonucu burnun arka kısmında aromatik kokuları algılamasını da sağlar.

Yakıcılığın algılanmasında elle tutulur bir algılamamanın dikkate alınması gerekir. Bu amaçla, yağın yutulması tavsiye edilebilir.

Bir gün içerisinde en fazla üç panel (oturum) düzenlenmesi ve her panelde en fazla dört tadım yapılması önerilmektedir.

Ardı ardına yapılan tadımların duyularda yorgunluğa veya kayba sebep olacağı için bir önceki tadımdan kalan yağın ağızdan uzaklaştırılması için bir ürün kullanılması gerekmektedir. Bunun için bir dilim elmanın çiğnenmesi ve tükürük kabına atılması önerilir. Daha sonra ağiz oda sıcaklığındaki az bir miktar su durulanır. İki oturum arasındaki süre en az 15 dk olmalıdır.

10.2. Duyusal değerlendirme formunun tadımcılar tarafından kullanımı

Tadımcılar tarafından kullanılacak olan duyuşal değerlendirme formu 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 duyuşal değerlendirme formundaki 10 cm’lik skalaya işaretler.

(1) Tadımcı yağı kokladığında aşırı derecede yoğun bir kusur tespit ederse tadıma devam etmeyebilir ancak bunu duyuşal değerlendirme formuna not etmelidir.

Tadımcı meyvemsiliği yeşil veya olgun olarak algıladığında, duyuşal değerdendirme formunaki ilgili kutucuğu işaretder.

Eğer tadımcı, 4. bölümde yer almayan herhangi bir negatif özellik algılayacak olursa, bunları “diğerleri” başlığı altına, özellikleri en doğru tarif eden terim veya terimleri kullanarak kaydeder.

10.3. Verilerin panel lideri tarafından değerdendirilmesi

- Panel lideri, her bir tadımcı tarafından doldurulan duyuşal değerdendirme formunu toplar ve kaydedilen yoğunlukları gözden geçirir. Herhangi bir anormallik gözlemlediğinde, tadımcıyı duyuşal değerdendirme formunu revize etmeye ve eğer gerekliyse, testi tekrar etmeye davet eder.

- Panel lideri her bir tadımcının verilerini, bilgi/açıklama bölümünde belirtilen hesaplamaları yapmak amacıyla IOC/T20/Doc. No 15 dekine benzer bir bilgisayar programına kaydeder. Belirli bir numune hakkındaki veriler kullanılarak, 9 duyuşal özelliği 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 lideri negatif özelliğin medyanını hesaplar ve karşılık gelen sınıflandırmayı belirler.

- Duyuşal değerdendirmesi yapılan yağın meyvemsi özelliğinin yeşil veya olgun olarak panel lideri tarafından onaylanması için tadımcıların en az %50 si tarafından tespit edilmesi gereklidir.

- Normal koşullarda duyuşal analizin bir defa yapılması yeterlidir ancak, çelişkili değerdendirmeler olduğu takdirde veya yağın sınıfını belirleyen güçlü değışkenlik katsayısının %20’nin üzerinde olduğu durumlarda panel lideri duyuşal analizi tekrarlatmalıdır. Çelişkili değerdendirmeyi doğrulamak için üçüncü kez duyuşal analiz yapılmalıdır. Tekrarlanan testler farklı oturumlarda yapılmalıdır.

- Çelişkili durumlarla sıkça karşılaşılıyorsa panel lideri tadımcılara ilave eğitim vermelidir (IOC/T.20/Doc. No 14, § 5) ve tekrar edilebilirlik indeksi ve sapma indeksi kullanılarak panel performansı kontrol edilir (IOC/T.20/Doc. No 14, § 6).

10.4. Yağın Sınıflandırılması

Yağ, kusurların medyanı ve meyvemsiliğin medyanı ile birlikte aşğıdaki gibi sınıflandırılır. En yoğun şekilde hissedilen kusurun medyanı, kusurların medyanı olarak belirlenir. Kusurların ve meyvemsiliğin medyanı bir ondalık sayı şeklinde verilir.

Yağ, kusurların medyanı ve meyvemsiliğin medyanları Tablo 1’de verilen değerdeler dikkate alınarak karşılaştırılarak sınıflandırılır. Bu aralıkların limitleri belirlenirken metot hatası hesaplamaya alınmalıdır. İstatistiksel bir tablo veya bir grafik kullanılan bilgisayar programları sınıflandırmanın görsel hale gelmesini sağlar.

Tablo 1

	Kusurların Ortancası/Medyanı (Md)	Meyvemsi Özellik Ortancası/Medyanı (Mf)
Natürel Sızma Zeytinyağı	Md=0	Mf >0
Natürel Birinci Zeytinyağı	0 < Md ≤ 3,5	Mf >0
Ham zeytinyağı*	Md > 3,5	

*Meyvemsi özellik ortancası 0’a eşit olduğuunda kusurların ortancası 3,5’ a eşit ya da 3,5’ dan küçük olsa bile ham zeytinyağı olarak kabul edilir.

10.5. Özel durum

Eğer meyvemsilik dışındaki diğer pozitif özelliklerin medyanı 5' den büyükse, panel lideri bu değeri analiz sertifikasında belirtmelidir.

Duyusal Değerlendirme Formu	
KUSURLARIN ALGILANMA YOĞUNLUĞU:	
Kızışma/Çamurumsu tortu *	_____
Küflü/rutubetli /Topraksı *	_____
Şarabımsı/sirkemsi/asidik-ekşimsi *	_____
Islak odun (Don vuruğu)	_____
Ransid	_____
Diğer Negatif Özellikler	
Tanımlar	Metalik ☐ Samansı/odunsu ☐ Kurtlu ☐ Kaba ☐
	Salamura ☐ Isıtılmış/yanmış ☐ Kara su ☐ Hasırımı ☐
	Salatalık ☐ Makine yağı ☐
(*) seçilmeyen kusurun üzerine çiziniz	
POZİTİF ÖZELLİKLERİN ALGILANMA YOĞUNLUĞU:	
Meyvemsi	_____
	yeşil ☐ olgun ☐
Acılık	_____
Yakıcılık	_____
<u>Tadımcının adı:</u>	<u>tadımcının kodu:</u>
<u>Numune kodu:</u>	
<u>Tarih/İmza:</u>	
<u>Yorumlar:</u>	

Şekil 1- Duyusal değerlendirme formu

BİLGİ/AÇIKLAMALAR

Medyanın ve Güven Aralıklarının Hesaplanma Yöntemi

Medyan

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

Xm medyan gerçek sayısı olarak tanımlanır. Xm; 0.5'ten daha az olmayan Xm sayısının üzerinde olmayan X dağılım değerlerinin eş zamanlı olasılığı (P) ve 0.5'ten daha fazla olmayan Xm 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 değişkenliği güvenilir bir şekilde tahmin edebilmek için, Stuart ve Kendall'a göre tahmin edilen güçlü standart sapmayı referans göstermek gereklidir. Formül, N'in gözlemlerin sayısı olduğu yerde, asimptotik güçlü standart sapmayı verir, IQR interkuartil aralık ya da incelenmekte olan verilerin değişkenliğinin güçlü tahminidir ve belirli bir olasılık dağılımındaki vakalarının tam %50'sini kapsar. İnterkuartil enterval, % 75nci ve % 25inci arasındaki fark büyüklüğünü hesaplamak suretiyle 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.

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

Pratikte, yüzdelik, dağılım veya yoğunluk eğrisinden iki ucu birleştirilen spesifik bir alana tekabül eden dağılım değeridir. Örneğin, 25inci yüzde birlik, 0.25 veya 25/100'e eşit bir alana tekabül eden dağılım değerini temsil eder.

Güçlü değişkenlik katsayısı (%)

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

% CVr, 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 (ilk çeşidin hata değeri 0,05 veya % 5'e eşittir), şayet bir deneyi sonsuz kereler tekrar etmek mümkün olsaydı, medyan değerinin değişebileceği aralığı temsil eder. Pratikte bu aralık, testin birçok kez tekrar edilebildiği varsayımına dayanarak seçilen çalışma koşullarında testin değişebilirlik aralığını belirtir. % rCV'de olduğu gibi aralık, testin güvenilirliğini değerlendirmeye yardımcı olur.

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

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

Burada 0.95 güven aralığı için $C=1.96$ 'dır.

EK-12

Pirinada Yağ Miktarı Tayini

1. Cihaz ve malzemeler

- 1.1. Ekstraksiyon ekipmanı: 200, 250 mL'lik yuvarlak dipli ağzı şilifli balona uygun
- 1.2. Elektrikli ısıtıcı banyo (kum banyosu, su banyosu) veya ısıtıcı tabla,
- 1.3. Analitik terazi,
- 1.4. Etüv: Maksimum 80 °C'ye ayarlanabilen,
- 1.5. Etüv: 103±2 °C'ye ayarlanabilen sıcaklık kontrollü hava akımında veya düşük basınçta çalışabilen,
- 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 hekzanda çözünen madde bulunmayan pamuk
- 1.8. Desikatör
- 1.9. Elek: 1 mm çapında gözenek büyüklüğüne sahip,
- 1.10. Sünger taşı: Küçük parçalar halinde önceden kurutulmuş

2. Kimyasallar

n-Hekzan: Tam buharlaşma sonrası kalıntı miktarı 0,002g/100mL olan teknik saflıkta

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

3.3. Ekstraksiyon kartuşunun hazırlanması

Tartılan numune kartuşa konulur ve cam pamuğu ile kapatılır. Eğer filtre kâğıdı kullanılıyorsa analiz numunesi konulduktan sonra sarılarak iyice kapatılır. Nem ve uçucu madde miktarını azaltmak için kartuş içeriği ile birlikte 80 °C'yi geçmeyen bir etüvde uygun bir süre tutulur.

3.4. Yuvarlak dipli balonun hazırlanması

Balonun içerisine bir veya iki tane sünger taşı konulur ve 103±2 °C'ye ayarlanmış etüvde kurutulur. Desikatörde en az bir saat tutulduktan sonra 0,001 g hassasiyetle tartılır.

3.5. Birinci ekstraksiyon

İçerisinde analiz numunesi bulunan ekstraksiyon kartuşu veya süzgeç kâğıdı ekstraksiyon cihazına konur. Balona yeteri miktarda (yaklaşık 1,5 sifon) hekzan ilave edilir. Balon ekstraksiyon cihazına takılır. Ekstraksiyon hızı saniyede en az 3 damla olacak şekilde ısıtma işlemleri çok şiddetli olmayacak şekilde ayarlanır.

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

3.6. 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 kâğıdı kullanılarak çözelti, tartımı alınmış başka bir ekstraksiyon balonuna szlr ve filtre kâğıdı hekzan ile çok iyi şekilde yıkanır.

3.7. Çözücünün uçurulması ve kalıntının tartımı

Çözücünün büyük bir kısmı elektrikli ısıtıcı banyoda distilasyonla uzaklaştırılır. Kalan iz miktardaki zc 103 ±2 °C sıcaklığa ayarlanmış etüvde 20 dk süreyle ısıtılarak uzaklaştırılır. Bu işlemleri kolaylaştırmak için hava akımı (tercihen inert gaz) veya düşük basınç kullanılabılır.

Balon bir desikatörde en az bir saat tutularak oda sıcaklığına tekrar getirilir ve 0,001 g duyarlılıkla tartılır. Isıtma işlemleri 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 gemeyinceye kadar 10'ar dakikalık sürelerle ısıtma işlemleri 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 ağırlıkça yüzdesi olarak aşığıdaki formülden hesaplanır:

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

Burada ;

S : Alınan rn ekstraktının ağırlıkça yüzdesi

m₀ : Analiz numunesinin ağırlığı, g

m₁ : Ekstraksiyon balonunun en son tartımındaki ekstraktın miktarı, g

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

Sonuçlar bir ondalık olarak verilir.

a) 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. Tekrar edilebilirlik

Aynı analizci tarafından peş peşe veya iki analizci 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-13

Stigmastadienlerin Tayini

1. Amaç

Natürel zeytinyağı ve ham pirina yağında düşük konsantrasyonlarda bulunan stigmastadienlerin miktarının belirlenmesidir.

2. Kapsam

Bu metot hidrokarbon içeriği 0,01- 4,0 mg/kg arasında bulunan 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. Ayırma hunileri: 500 mL'lik kapasiteye sahip.
- 4.3. Şifli balon: 100 mL'lik yuvarlak dipli
- 4.4. Vakumlu döner buharlaştırıcı.
- 4.5. Cam kromatografi kolonu: 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

- 4.6. Gaz kromatografi cihazı: Alev iyonizasyon dedektörüne sahip kapiller kolonlu, split – splitless veya doğrudan kolona enjeksiyon sistemli ve ± 1 °C hassasiyetiyle çalışabilen fırınlı.
- 4.7. Kapiler kolon: Uzunluğu 25 m, iç çapı 0,25–0,32 mm, film kalınlığı 0,25 μ m olan, camdan ya da eritilmiş silisten, % 5 fenil metilpolisiloksan ile kaplanmış. Benzer veya daha düşük polariteye sahip farklı kolonlar da kullanılabilir.
- 4.8. Gaz kromatografi enjektörü: Sertleştirilmiş iğneli, 10 μ L’lik
- 4.9. Mantolu ısıtıcı veya elektrikli ısıtıcı
- 4.10. Bilgisayar sistemi ve yazıcı:

5. Kimyasallar

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

- 5.1. Hekzan: Kromatografik saflıkta. (Aynı saflıkta heptan yada izooktan kullanılabilir)
 - 5.2. Etil alkol: % 96’lık (v/v)
 - 5.3. Susuz sodyum sülfat: Analitik saflıkta,
 - 5.4. Etanollü potasyum hidroksit çözeltisi: % 10’luk
50 g potasyum hidroksite 10 mL su ilave edilir, karıştırılır ve karışımı 500 mL etanol içerisinde çözülür. Etanollü potasyum hidroksit çözeltisi beklediği takdirde kahverengine döner. Günlük hazırlanmalı ve ağzı sıkıca kapatılmış koyu cam şişelerde muhafaza edilmelidir.
 - 5.5. Silikajel:
Kolon kromatografisi için 70-230 mesh. Genelde silikajel doğrudan kullanılabilir. Ancak bazı silikajel partileri düşük aktivite göstererek kötü kromatografik ayırma 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 şilifli balona aktarılır. % 2’si kadar su ilave edilir ve içerisinde topaklaşma olmayıncaya kadar çalkalanır. Buna alternatif olarak ekstra saf silikajel kullanılabilir.
 - 5.6. Stok çözelti (200 ppm):
% 99 saflıkta 10 mg kolesta-3.5-dien 50 mL hekzan içerisinde çözülerek hazırlanır.
 - 5.7. Standart çözelti (20 ppm):
Stok çözeltiden hekzanla seyreltilerek hazırlanan kolesta-3.5-dien. Stok ve standart çözelti 4 °C’den daha düşük sıcaklıkta muhafaza edildikleri takdirde en az dört ay boyunca stabil kalır.
 - 5.8. n-nonakosan çözeltisi (100 ppm): Hekzan içerisinde hazırlanır.
 - 5.9. Taşıyıcı gazlar: Yüksek saflıkta hidrojen veya helyum
 - 5.10. Yardımcı gazlar: Yüksek saflıkta hidrojen ve kuru hava
- ## 6. Prosedür
- 6.1. Sabunlaşmayan maddenin hazırlanması

6.1.1. 250 mL'lik şilifli balona $20 \pm 0,1$ g yağ tartılır, 1 mL standart kolesta-3.5-dien ($20\mu\text{g}$) çözeltisi ve 75 mL % 10'luk etanollü potasyum hidroksit çözeltisi ilave edilir. Balon çalkalanarak geri soğutucuya bağlanır ve hafif ısıda 30 dk boyunca kaynatılır. Numunenin bulunduğu balon ısıtıcıdan indirilir ve soğuması beklenir (Numune dibe çökeceğinden dolayı tamamen soğumasına izin verilmez). Balona 100 mL su ilave edilir ve 100 mL hekzan yardımıyla balon içeriği ayırma hunisine aktarılır. Karışım 30 s boyunca kuvvetlice çalkalanır ve faz ayrımı beklenir. Herhangi bir emülsiyon oluşumu az miktarda etil veya metil alkol ilavesiyle yok edilebilir.

6.1.2 İkinci bir ayırma hunisine alt fazı alınır. Kalan üst fazdan 100 ml hekzan kullanılarak aynı şekilde bir ekstraksiyon daha yapılır. Hekzan ekstraktları tek bir ayırma hunisinde toplanır ve yıkama suyu nötr bir reaksiyon verene kadar (fenolftalein indikatörlüğünde) en az üç kez 100 ml etanol/saf su (1:1) ile yıkanır.

6.1.3 Hekzan ekstraktı yaklaşık 50 g susuz sodyum sülfattan geçirilir, huni 20 mL hekzanla yıkanır ve $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ve düşük basınç altında kuruyana kadar vakumlu döner buharlaştırıcıda uçurulur.

6.2. Steroidal hidrokarbon fraksiyonlarının ayrılması

6.2.1. Cam kromatografi kolonun hazırlanması: 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. Çökelmeyi tamamlamak için elektrovibratör kullanılır. Yaklaşık 0,5 cm'lik bir yüksekliğe kadar susuz sodyum sülfat ilave edilir ve son olarak fazla hekzan süzülür.

6.2.2. Hazırlanan numune 1 mL hekzan ile kromatografik kolona aktarılır. Balondaki kalıntı tekrar 1 mL hekzan ile yıkanarak kromatografik kolona aktarılır. Kolondan hekzan akış hızı 1 mL/dk olacak şekilde ve sodyum sülfat seviyesinin 1 mm üstüne gelinceye kadar izin verilerek hekzan geçirilmeye başlanır. Süzüntünün yaklaşık ilk 25-30 mL'si (birinci fraksiyon) atılır, sonraki 40 mL'lik süzüntü (ikinci fraksiyon) toplanır ve 100 mL'lik yuvarlak dipli şilifli balona aktarılır. 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.

6.2.3. İkinci fraksiyon $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ve düşük basınç altında kuruyuncaya kadar vakumlu döner buharlaştırıcıda uçurulur ve hızlıca 0,2 mL hekzan (on-column kullanılıyorsa 1-2 mL) içerisinde çözülür. Analiz edilene kadar çözelti buzdolabında saklanır. (6.1.3 ve 6.2.3'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:

6.3.1.1. Split/splitless

- Enjeksiyon sıcaklığı: 300 °C,
- Dedektör sıcaklığı: 320 °C,
- Enjeksiyon hacmi: 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

6.3.1.2. On-column

- Fırın sıcaklığı:
80 °C başlangıç sıcaklığında 1 dk bekletildikten sonra 20 °C/dk sıcaklık artışı ile 220 °C ye çıkarılır. 3,5 °C/dk sıcaklık artışı ile 260 °C ye çıkarılır ve bu sıcaklıkta 10 dk bekletilir.

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.

Stigmastadienlerin daha iyi tanımlanabilmesi için, rafine bitkisel yağ veya rafine prina yağı analiz edilir. Böylece stigmastadienler belirgin ve kolaylıkla teşhis edilebilir.

6.3.3. Miktarın hesaplanması

Stigmastadienlerin içeriği aşağıdaki formüle göre hesaplanır:

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

Burada:

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

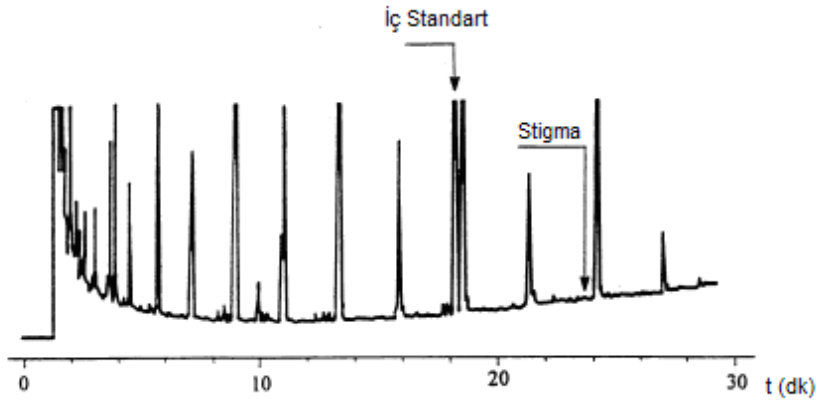
A_c = iç standart pik alanı (kolesta-3.5-dien),

M_c = eklenen standart miktarı, (μ g)

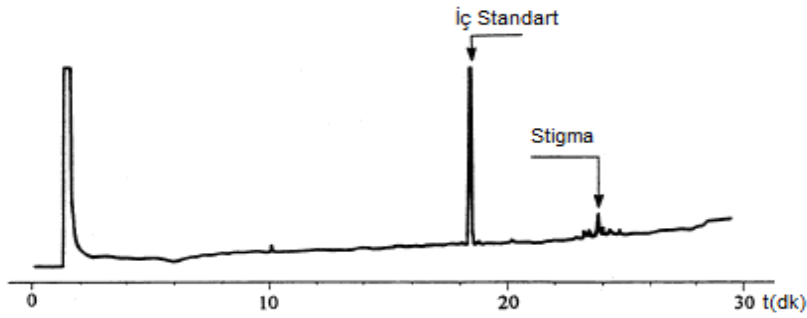
M_o = numune miktarı, (g).

Tespit limiti: yaklaşık 0,01 mg/kg

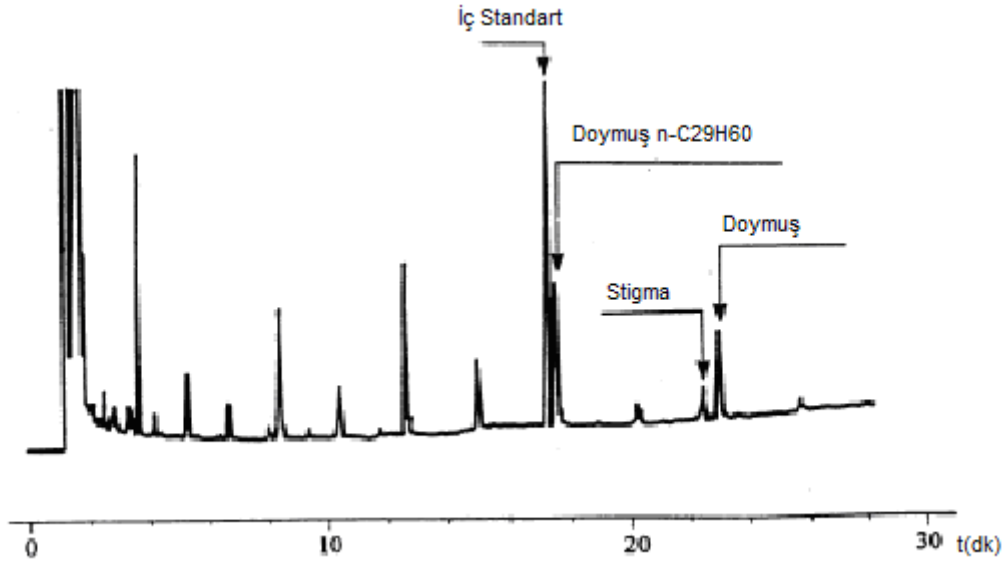
Zeytinyağı numunelerinden elde edilen kromatogramlar



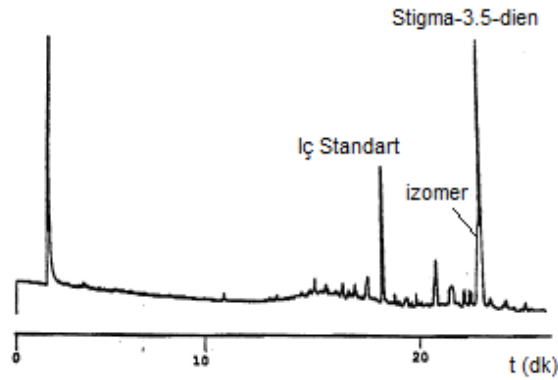
Şekil 1a *İç standartla birlikte natürel zeytinyağından elde edilen birinci fraksiyonun (30 mL) kromatogramı*



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 – 14

Gerçek ve Teorik ECN 42 Trigliserid İçeriği Arasındaki Maksimum Farkın Tayini

1. Kapsam

Zeytinyağı bileşimindeki eşdeğer karbon sayısı 42 olan triaçilgliserollerin (TAGs) yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile elde edilen deneysel değeri (ECN42HPLC) ile yağ asidi kompozisyonundan hesaplanan teorik değeri (ECN42Teorik) arasındaki mutlak farkın belirlenmesini kapsar.

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 triaçilgliserollerin HPLC ile belirlenen deneysel ECN değeri ve GC ile tespit edilen yağ asidi kompozisyonundan hesaplanan teorik ECN değeri arasındaki farkın saf zeytinyağlarında belirli bir sınırdan olması prensibine dayanır. TKG-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 triaçilgliserollerin 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 triaçilgliserollerin teorik miktarının hesaplanması
- ECN 42 olan triaçilgliserollerin HPLC ile tayini.

4.1. Cihaz ve malzemeler

- 4.1.1. Cam balon: 250 ve 500 mL'lik
- 4.1.2. Beher: 100 mL'lik
- 4.1.3. Musluklu cam kromatografi kolonu: Uzunluğu 450 mm, iç çapı 21 mm olan
- 4.1.4. Ayırma hunisi: 250 mL'lik
- 4.1.5. Baget: 600 mm uzunlukta
- 4.1.6. Cam huni: 80 mm çapında
- 4.1.7. Balon joje: 50 mL'lik
- 4.1.8. Balon joje: 20 mL'lik
- 4.1.9. Vakumlu döner buharlaştırıcı.
- 4.1.10. HPLC cihazı: Kolon sıcaklığı ayarlanabilen termostat kontrollü
- 4.1.11. Enjeksiyon bloğu: 10 µL'lik enjeksiyon için
- 4.1.12. Refraktif indeks 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 oktadesilsilan şeklinde, 5 µm partikül çapında silika ile doldurulmuş paslanmaz çelik kolon
- 4.1.14. Bilgisayar sistemi ve yazıcısı: HPLC verilerini kaydedebilecek

4.2. Kimyasallar

HPLC'de kullanılan hareketli fazın gazları giderilmiş olmalıdır. Net ayırım görüldüğü sürece hareketli faz kullanılmaya devam edilir.

- 4.2.1. Petrol eteri veya hekzan: Kromatografik saflıkta
- 4.2.2. Etil eter: Yeni distile edilmiş peroksitten arındırılmış
- 4.2.3. Yıkama çözücüsü: Kolon kromatografisinde kullanılan petrol eteri/dietil eter karışımı 87:13 (v/v).

- 4.2.4. Silikajel: Su içeriği % 5 olacak şekilde standardize edilmiş 70-230 mesh tane büyüklüğünde
- 4.2.5. Cam yünü
- 4.2.6. Aseton: HPLC saflıkta
- 4.2.7. Asetonitril veya propionitril: HPLC saflıkta
- 4.2.8. Hareketli faz: asetonitril + aseton (oranlar arzu edilen ayrılmayı sağlamak amacıyla; 50:50 (v/v) oranından başlanarak ayarlanır).
- 4.2.9. Çözücü: aseton
- 4.2.10. Standart trigliseridler: Piyasada bulunan triaçilgliseridler (tripalmitin, triolein, vs.) Standardizasyon amacıyla kullanılabilir ve alıkonma süreleri karışıt gelen karbon sayılarına göre belirlenebilir veya buna alternatif olarak soya yağından (30:70 soya yağı:zeytinyağı karışımı) ve saf zeytinyağından referans triaçilgliserid kromatogramı elde edilebilir (Şekil 1,2,3,4 ve 5).
- 4.2.11. Katı faz ekstraksiyon (SPE) kartuşu: 1 g silika fazlı ve 6 mL hazneli

4.3. Numunenin hazırlanması

Bazı girişim yapan maddeler yanlış yüksek sonuçlara sebep olacağından, numune kızartma yağlarındaki polar maddelerin saptanması için kullanılan IUPAC 2.507 yöntemine uygun olarak saflaştırılmalıdır.

4.3.1. Kromatografik kolonun hazırlanması

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

100 mL'lik bir behere sırasıyla 80 mL yıkama çözücüsü, 25 g silikajel ilave edilir. Hazırlanan karışım bir cam huniyle cam kolon içerisine boşaltılır. Beher içinde kalan silikajelin tamamı yıkama çözücüsü ile yıkanarak kolon içine alınır. Cam kolonun musluğu açılır ve yıkama çözücüsü seviyesi silikajelin yaklaşık 1 cm üstünde kalacak şekilde akıtılır.

4.3.2. Kolon kromatografisi

50 mL'lik balon joje içerisine; daha önceden süzölmüş ve homojenize edilmiş susuz yağ numunesinden $2,5 \pm 0,1$ g tartılır ve 20 mL yıkama çözücüsü ilave edilerek çözölür. Gerektiğinde çözme işlemini kolaylaştırmak için hafifçe ısıtılır. Oda sıcaklığında soğutulur ve hacmi yıkama çözücüsü ile 50 mL'ye tamamlanır. Daha önceden sabit tartıma getirilmiş 250 mL'lik, cam balonda süzöntünün toplanması sağlanacak şekilde; tamamlanan karışımından bir pipet ile 20 mL alınarak hazırlanan kolon içerisine boşaltılır ve musluk açılır. Sıvı karışım silikajel seviyesine yaklaştığında toplam 150 mL yıkama çözücüsü parça parça kolona ilave edilir. Süzöntünün musluktan akış hızı yaklaşık 2 mL/dk'ya ayarlanır (150 mL yıkama çözücüsü kolondan 60-70 dakikada geçmelidir.).

250 mL'lik cam balonda toplanan süzöntüdeki çözücü vakumlu döner buharlaştırıcıda uçurulur. Balonda kalan ve HPLC analizi ve metil esterlerin hazırlanmasında kullanılacak olan bu kalıntı tartılır. Kalıntı miktarı; natürel sızma, natürel birinci, rafine ve riviera zeytinyağları kategorileri için başlangıçta kolona ilave edilen numune miktarı üzerinden en az % 90'ı, ham zeytinyağı ve pirina yağları için ise en az % 80'i olmalıdır.

4.3.3. SPE Kartuşu ile Saflaştırma

Vakum altında 6mL hekzan SPE kartuşunun kurumasına izin vermeden geçirilerek aktive edilir. 2mL'lik vial 0,12 g numune (0,001 g duyarlılıkla) tartılır ve 0,5 mL hekzan ilave

edilerek çözülür. Hekzanda çözölmüş numune 10 mL hekzan-dietil eter (87:13 v/v) içeren çözelti ile SPE kartuşa ilave edilerek süzölür. Toplanan fraksiyondaki çözöcöler düşük basınç ve oda sıcaklığında vakumlu döner buharlaştıricıda uzaklaştıılır. Kalıntı, TAG analizleri için 2 mL asetonda çözölür.

4.4. HPLC analizi

4.4.1. Kromatografik analiz için numunelerin hazırlanması

- SPE kartuşla saflaştıırılmış numune kullanılacaksa; hazırlanan numune HPLC'ye belirtilen oranda enjekte edilir.

- Kolon kromatografisi ile hazırlanan numune kullanılacaksa; Numunenin % 5'lik çözeltisi; 10 mL'lik balon joje içine $0,5 \pm 0,001$ g numune tartılarak ve aseton ile çözölerek 10 mL'ye tamamlanması ile hazırlanır.

4.4.2. Prosedür

Tüm sistemi temizlemek için hareketli faz 1,5 mL/dk hızla akacak şekilde pompa ayarlanır. Doğrusal baseline elde edinceye kadar beklenir.

Hazırlanan numuneden 10 µL enjekte edilir.

4.4.3. Sonuçların hesaplanması ve açıklanması

Alan normalleştirme yöntemi kullanılır (ECN42'den ECN52'ye kadar olan TAG'lere karşılık gelen pik alanları toplamalarının % 100'e eşit olduğu kabul edilir). Her triaçilgliseridin bağıl yüzdesi aşğıdaki formöl kullanılarak hesaplanır:

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

Sonuçlar 2 ondalık olarak verilmelidir.

4.4.4 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_l ve n_{ln} sayıları sırasıyla oleik, linoleik ve linolenik asitlerin bileşiminde bulunan çift bağlar ise, eşdeğer karbon sayısı aşğıdaki formöldeki ilişkiyle hesaplanabilir:

$$ECN = CN - d_o n_o - d_l n_l - d_{ln} n_{ln}$$

Burada d_o , d_l ve d_{ln} katsayıları referans triaçilgliseridler yardımıyla hesaplanır. Bu metotta belirtilen koşullar altında elde edilen bağıntı aşğıdaki formöl uygulanarak elde edilene yakın olacaktır.

$$ECN = CN - [2,60 n_o] - [2,35 n_l] - [2,17 n_{ln}]$$

4.4.5 Çeşitli triaçilgliserid referansının ayrışmasını triolein yardımıyla hesaplamak mümkündür.

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

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

f'ye karşı (çift bağların sayısı) log α grafiği yardımıyla referans triağılgliceridlerde bulunan yağ asitlerinin tüm triağılgliceridlerinin alıkonma sürelerinin belirlenmesi mümkündür (Şekil 1).

4.4.6. Kolon, trilinolein pikinin diğer triağılglicerid piklerinden net bir şekilde ayrılmasını sağlamalıdır. Ayrıma ECN 52 piki görülene kadar devam edilir.

4.5. Yağ asiti kompozisyonu verilerinden (% pik alanı) triağılglicerol kompozisyonunun (%mol) 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

$$\left. \begin{array}{l}
 \text{mol P} = \frac{\text{P Alan \%}}{\text{MAP}} \quad \text{mol S} = \frac{\text{S Alan \%}}{\text{MAS}} \quad \text{mol Po} = \frac{\text{Po Alan \%}}{\text{MA Po}} \\
 \text{mol O} = \frac{\text{O Alan \%}}{\text{MAO}} \quad \text{mol L} = \frac{\text{L Alan \%}}{\text{MAL}} \quad \text{mol Ln} = \frac{\text{Ln \% Alan}}{\text{MALn}}
 \end{array} \right\} (1)$$

4.5.4. Yağ asitlerinin % 100'e normalleştirilmesi

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

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:

$$\left. \begin{aligned} \% \text{ mol SFA} &= \% \text{ mol P} + \% \text{ mol S} \\ \% \text{ mol UFA} &= 100 - \% \text{ mol SFA} \end{aligned} \right\} (3)$$

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)]

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

4.5.5.2. 2-pozisyonadaki 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)]:

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

4.5.6. Trigliseridlerin (Triaçilgliserol) 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)

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

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

$$\left. \begin{aligned} \%molABC &= \frac{\%molA(1,3) \times \%molB(2) \times \%molC(1,3) \times 2}{10000} \\ \%molBCA &= \frac{\%molB(1,3) \times \%molC(2) \times \%molA(1,3) \times 2}{10000} \\ \%molCAB &= \frac{\%molC(1,3) \times \%molA(2) \times \%molB(1,3) \times 2}{10000} \end{aligned} \right\} (9)$$

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:

6.5.1. GC 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

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

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

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

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

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

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

$$\text{mol Ln} = \frac{1}{278,4} = 0,00359 \text{ mol Ln} \quad \text{Bkz. formül (1)}$$

$$\text{Toplam} = 0,35821 \text{ mol TAG'lar}$$

6.5.3. Yağ asitlerinin % 100 normalleştirilmesi

$$\% \text{ mol P (1,2,3)} = \frac{0,03900 \text{ mol P} \times 100}{0,35821} = \%10,887 \quad \text{Bkz. formül (2)}$$

$$\% \text{ mol S (1,2,3)} = \frac{0,01054 \text{ mol S} \times 100}{0,35821} = \%2,942 \quad \text{Bkz. formül (2)}$$

$$\% \text{ mol Po (1,2,3)} = \frac{0,00393 \text{ mol Po} \times 100}{0,35821} = \%1,097 \quad \text{Bkz. formül (2)}$$

$$\% \text{ mol O (1,2,3)} = \frac{0,26549 \text{ mol O} \times 100}{0,35821} = \%74,116 \quad \text{Bkz. formül (2)}$$

$$\% \text{ mol L (1,2,3)} = \frac{0,03566 \text{ mol L} \times 100}{0,35821} = \%9,955 \quad \text{Bkz. formül (2)}$$

$$\% \text{ mol Ln(1,2,3)} = \frac{0,00359 \text{ mol Ln} \times 100}{0,35821} = \%1,002 \quad \text{Bkz. formül (2)}$$

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

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

$$\% \text{ mol SFA} = \%10,887 + \%2,942 = \%13,829 \quad \text{Bkz. formül (3)}$$

$$\% \text{ mol UFA} = \%100,000 - \%13,829 = \%86,171 \quad \text{Bkz. formül (3)}$$

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

6.5.4.1. 2- pozisyonunda doymuş yağ asitleri [P(2) ve S(2)]

$$\% \text{ mol P(2)} = \%10,887 \times 0,06 = \%0,653\text{mol} \quad \text{Bkz. formül (4)}$$

$$\% \text{ mol S(2)} = \%2,942 \times 0,06 = \%0,177\text{mol} \quad \text{Bkz. formül (4)}$$

6.5.4.2. 1.3-pozisyonlarında doymamış yağ asitleri [Po(1,3), O(1,3), L(1,3) ve Ln(1,3)]

$$\% \text{ mol Po (2)} = \frac{\%1,097}{\%86,171} \times (100 - 0,653 - 0,177) = \%1,262\text{mol} \quad \text{Bkz. formül (5)}$$

$$\% \text{ mol O (2)} = \frac{\%74,116}{\%86,171} \times (100 - 0,653 - 0,177) = \%85,296\text{mol} \quad \text{Bkz. formül (5)}$$

$$\% \text{ mol L (2)} = \frac{\%9,955}{\%86,171} \times (100 - 0,653 - 0,177) = \%11,457\text{mol} \quad \text{Bkz. formül (5)}$$

$$\% \text{ mol Ln (2)} = \frac{\%1,002}{\%86,171} \times (100 - 0,653 - 0,177) = \%1,153\text{mol} \quad \text{Bkz. formül (5)}$$

6.5.4.3. 1.3- pozisyonlarında yağ asitleri [P(1,3), S(1,3), Po(1,3), O(1,3), L(1,3) ve Ln(1,3)]

$$\% \text{ mol P(1,3)} = \frac{10,887 - 0,653}{2} + 10,887 = \%16,004\text{mol} \quad \text{Bkz. formül (6)}$$

$$\% \text{ mol S(1,3)} = \frac{2,942 - 0,177}{2} + 2,942 = \%4,325\text{mol} \quad \text{Bkz. formül (6).}$$

$$\% \text{ mol Po(1,3)} = \frac{1,097 - 1,262}{2} + 1,097 = \%1,015\text{mol} \quad \text{Bkz. formül (6).}$$

$$\% \text{ mol O(1,3)} = \frac{74,116 - 85,296}{2} + 74,116 = \%68,526\text{mol} \quad \text{Bkz. formül (6).}$$

$$\% \text{ mol L}(1,3) = \frac{9,955 - 11,457}{2} + 9,955 = \%9,204 \text{ mol}$$

Bkz. formül (6).

$$\% \text{ mol Ln}(1,3) = \frac{1,002 - 1,153}{2} + 1,002 = \%0,927 \text{ mol}$$

Bkz. formül (6).

6.5.5. Trigliseridlerin hesaplanması

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

Yağ Asitleri	1,3-poz.	2-poz.
P	% 16,004	% 0,653
S	% 4,325	% 0,177
Po	% 1,015	% 1,262
O	% 68,526	% 85,296
L	% 9,204	% 11,457
Ln	% 0,927	% 1,153
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

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

Bkz. formül (7)

$$\% \text{ mol PoPoPo} = \frac{\%1,015 \times \%1,262 \times \%1,015}{10000} = 0,00013 \text{ mol PoPoPo}$$

$$\% \text{ mol LLL} = \frac{\%9,204 \times \%11,457 \times \%9,204}{10000} = 0,09706 \text{ mol LLL}$$

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

Bkz. formül (8)

$$\% \text{ mol PoLL} + \text{LLPo} = \frac{\%1,015 \times \%11,457 \times \%9,204 \times 2}{10000} = 0,02141$$

$$\% \text{ mol LPoL} = \frac{\%9,204 \times \%1,262 \times \%9,204}{10000} = 0,01069$$

$$= 0,03210 \text{ mol PoLL}$$

$$\% \text{ mol SLnLn} + \text{LnLnS} = \frac{\%4,325 \times \%1,153 \times \%0,927 \times 2}{10000} = 0,00092$$

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

$$= 0,00094 \text{ mol SLnLn}$$

$$\% \text{ mol PoPoL} + \text{LPoPo} = \frac{\%1,015 \times \%1,262 \times \%9,204 \times 2}{10000} = 0,00236$$

$$\% \text{ mol PoLPo} = \frac{\%1,015 \times \%11,457 \times \%1,015}{10000} = 0,00118$$

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

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

Bkz. formül (9)

$$\% \text{ mol PPLn} = \frac{\%16,004 \times \%1,262 \times \%0,927 \times 2}{10000} = 0,00374$$

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

$$\% \text{ mol PoLnP} = \frac{\%1,015 \times \%1,153 \times \%16,004 \times 2}{10000} = 0,00375$$

$$= 0,00761 \text{ mol PPLn}$$

$$\% \text{ mol OLLn} = \frac{\%68,526 \times \%11,457 \times \%0,927 \times 2}{10000} = 0,14556$$

$$\% \text{ mol LnOL} = \frac{\%0,927 \times \%85,296 \times \%9,204 \times 2}{10000} = 0,14555$$

$$\% \text{ mol LLnO} = \frac{\%9,204 \times \%1,153 \times \%68,526 \times 2}{10000} = 0,14544$$

$$= 0,43655 \text{ mol OLLn}$$

$$\% \text{ mol PLLn} = \frac{\%16,004 \times \%11,457 \times \%0,927 \times 2}{10000} = 0,03399$$

$$\% \text{ mol LnPL} = \frac{\%0,927 \times \%0,653 \times \%9,204 \times 2}{10000} = 0,00111$$

$$\% \text{ mol LLnP} = \frac{\%9,204 \times \%1,153 \times \%16,004 \times 2}{10000} = 0,03397$$

$$0,06907 \text{ mol PLLn}$$

$$\% \text{ mol PoOLn} = \frac{\%1,015 \times \%85,296 \times \%0,927 \times 2}{10000} = 0,01605$$

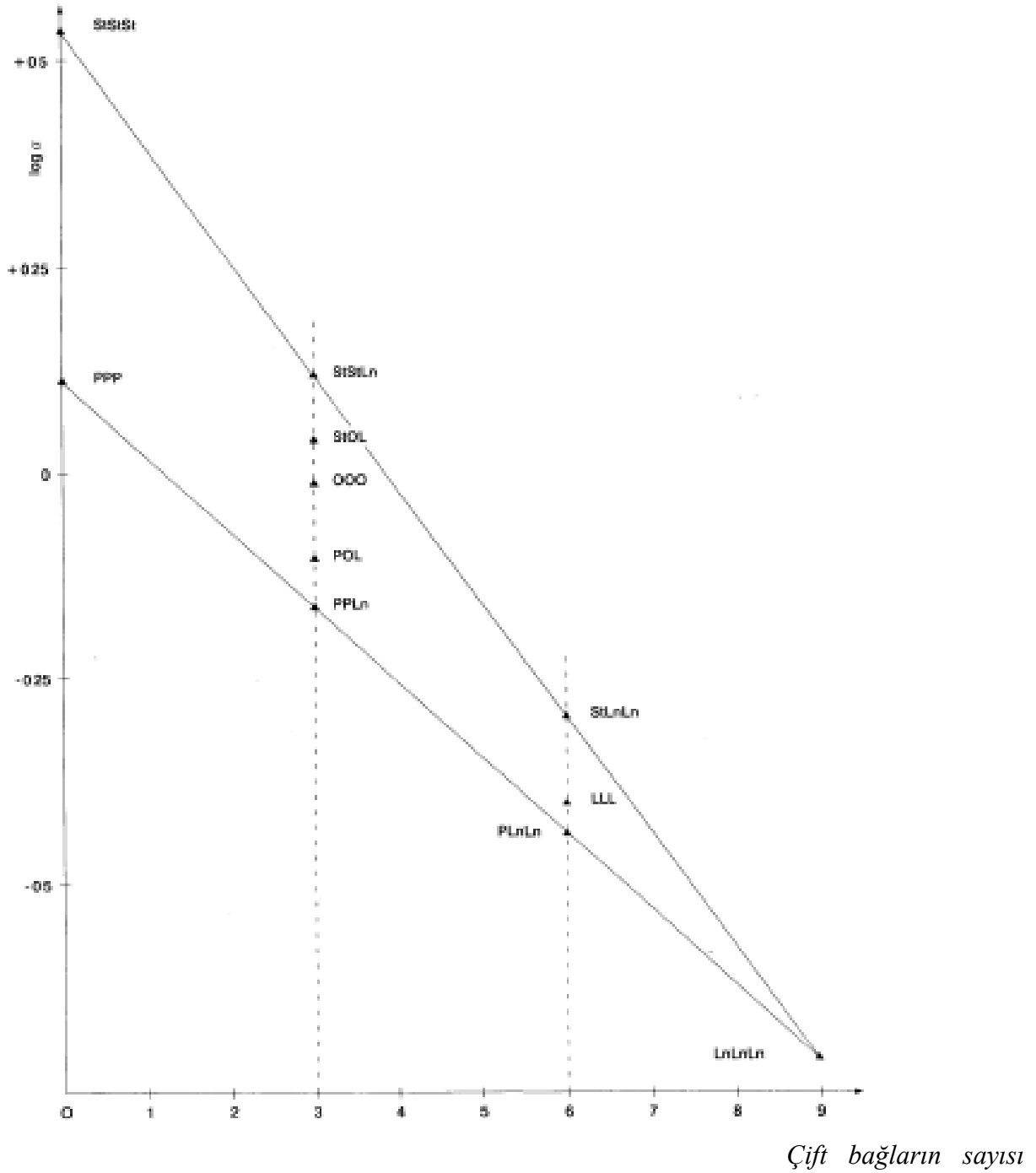
$$\% \text{ mol LnPoO} = \frac{\%0,927 \times \%1,262 \times \%68,526 \times 2}{10000} = 0,01603$$

$$\% \text{ mol OLnPo} = \frac{\%68,526 \times \%1,153 \times \%1,015 \times 2}{10000} = 0,01604$$

$$0,04812 \text{ mol PoOLn}$$

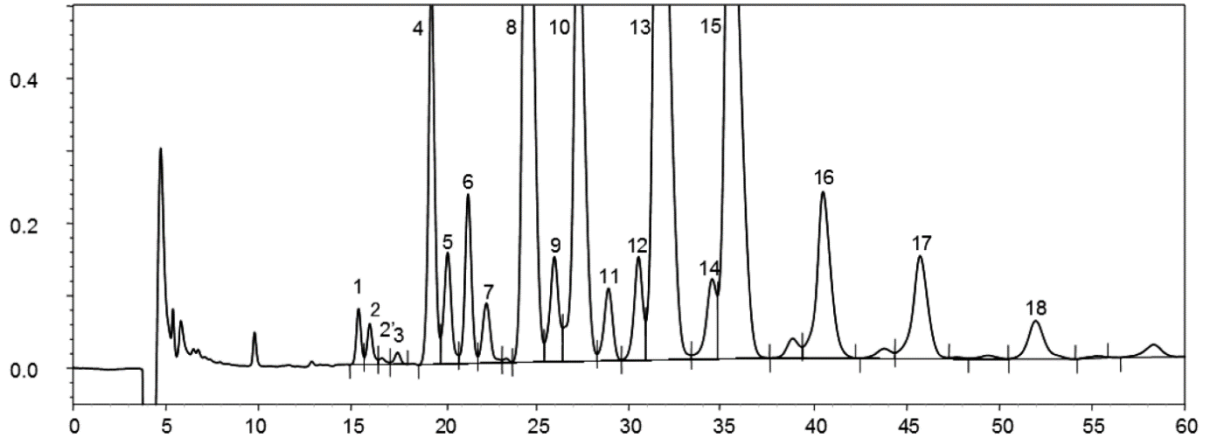
$$ECN 42 = 0,69512 \text{ mol TAGler}$$

Not: Hesaplamalar pratik olarak bilgisayar programı yardımıyla yapılabilir.
(www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/224-testingmethods)



Şekil 1
f'ye (çift bağların sayısı) karşı log α grafiği

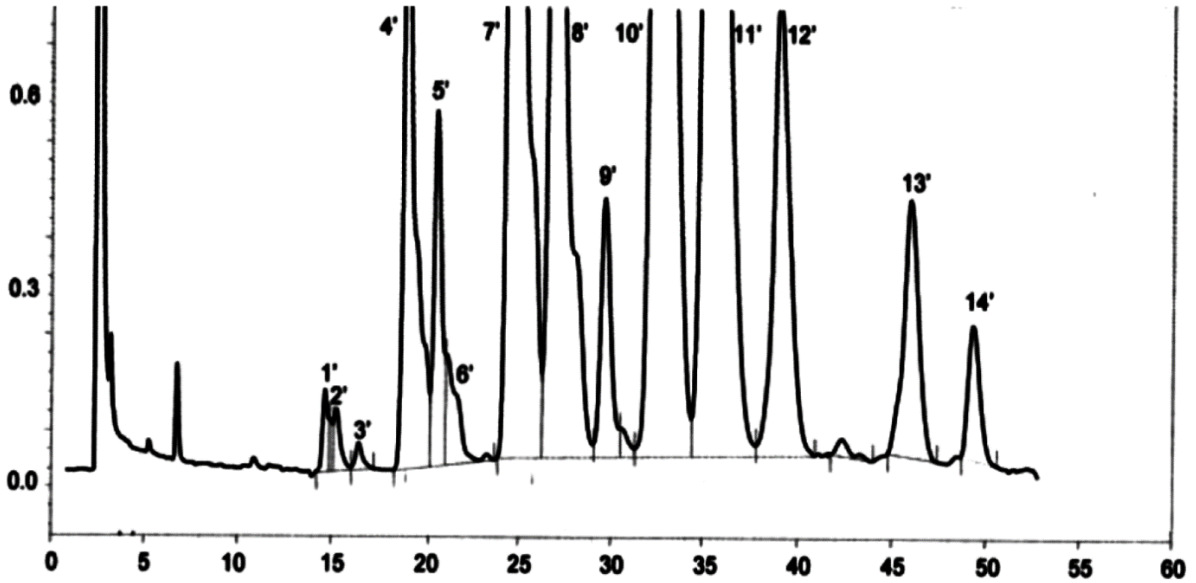
Not: La = laurik asit; My = miristik asit; P = palmitik asit; St = stearik asit; O = oleik asit; L = linoleik asit; Ln = linolenik asit.



Şekil 2

Yüksek linoleik asit içeren zeytinyağı (Hareketli Faz: Propionitril)

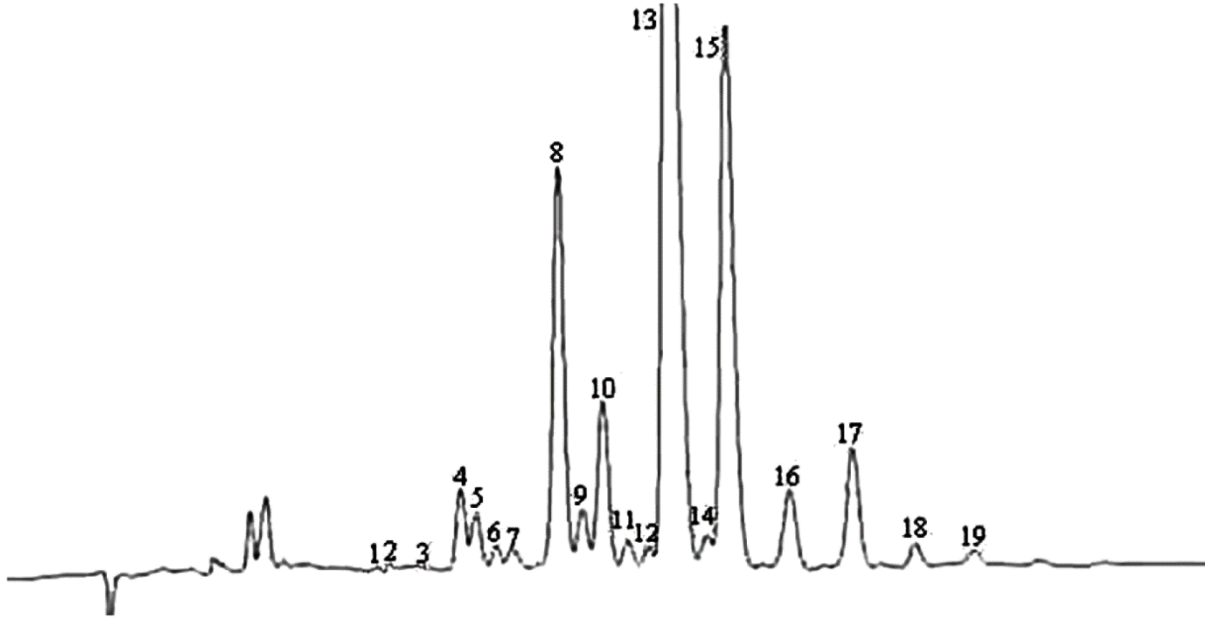
Kromotogram açıklaması: ECN42: (1) LLL; (2 + 2') OLLn + PoLL; (3) PLLn; ECN44: (4) OLL; (5) OOLn + PoOL; (6) PLL + PoPoO; (7) POLn + PPoPo + PPoL; ECN46: (8) OOL + LnPP; (9) PoOO; (10) SLL + PLO; (11) PoOP + SPoL + SOLn + SPoPo; ECN48: (12) PLP; (13) OOO + PoPP; (14) SOL; (15) POO; (16) POP; ECN50: (17) SOO; (18) POS + SLS; ECN52: (19) AOO



Şekil 3

Yüksek linoleik asit içeren zeytinyağı (Hareketli Faz: Aseton:Asetonitril/50:50)

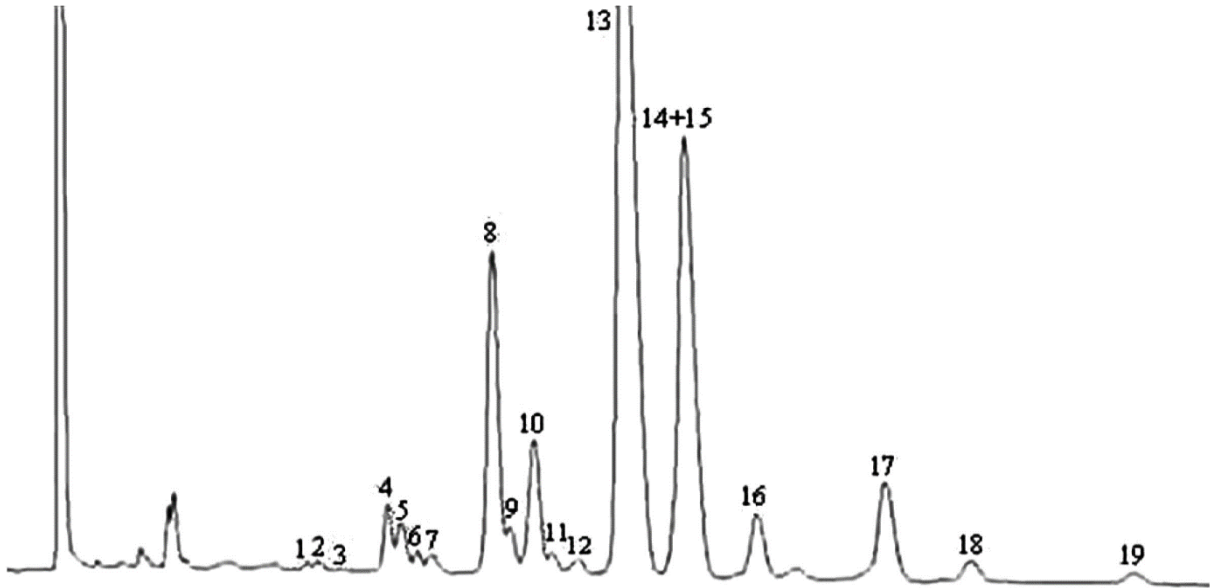
Kromotogram açıklaması: ECN42: (1') LLL + PoLL; (2') OLLn + PoOLn; (3') PLLn; ECN44: (4') OLL + PoOL; (5') OOLn + PLL; (6') POLn + PPoPo; ECN46: (7') OOL + PoOO; (8') PLO + SLL + PoOP; (9') PLP + PoPP; ECN48: (10') OOO; (11') POO + SLL + PPoO; (12') POP + PLS; ECN50: (13') SOO; (14') POS + SLS



Şekil 4

Düşük linoleik asit içeren zeytinyağı (Hareketli Faz: Propionitril)

Kromotogram açıklaması: ECN42: (1) LLL; (2) OLLn + PoLL; (3) PLLn; ECN44: (4) OLL; (5) OOLn + PoOL; (6) PLL + PoPoO; (7) POLn + PPoPo + PPoL; ECN46: (8) OOL + LnPP; (9) PoOO; (10) SLL + PLO; (11) PoOP + SPoL + SOLn + SPoPo; (12) PLP; ECN48: (13) OOO + PoPP; (14) SOL; (15) POO; (16) POP; ECN50: (17) SOO; (18) POS + SLS



Şekil 5

Düşük linoleik asit içeren zeytinyağı (Hareketli Faz: Aseton/Asetonitril)

Kromotogram açıklaması: ECN42: (1) LLL + PoLL; (2) OLLn + PoOLn; (3) PLLn; ECN44: (4) OLL + PoOL; (5) OOLn + PLL; (6) POLn + PPoPo; (7) OOL + PoOO; ECN46: (8) OOL + LnPP; (9) PoOO; (10) SLL + PLO; (11) PoOP + SPoL + SOLn + SPoPo; (12) PLP; ECN48: (13) OOO + PoPP; (14 + 15) SOL + POO; (16) POP; ECN50: (17) SOO; (18) POS + SLS.

Kapiler Gaz Kromatografisi ile Alifatik Alkol Miktarının Tayini

1. Kapsam

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

2. Prensip

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. Şilifli geri soğutucu: 250 mL'lik balona uygun
 - 3.2. Ayırma hunileri: 500 mL'lik
 - 3.3. Şilifli balon: 250 mL'lik
 - 3.4. 20 x 20 cm cam plaka ince-tabaka kromatografisi için gerekli olan malzemeler
 - 3.5. UV lamba: 366 veya 254 nm dalga boyu olan.
 - 3.6. Enjektörler: 100 µL ve 500 µL'lik.
 - 3.7. Huni ve siyah bant süzgeç kâğıdı
 - 3.8. Ağzı şilifli armudi balon: 50 mL'lik
 - 3.9. Deney tüpü: Konik dipli ve contalı kapağı olan 10 mL'lik.
 - 3.10. Gaz kromatografi cihazı: Kapiler Kolonlu Split/Splitless enjeksiyon sistemi ile aşağıdaki parçaları bulunan
 - 3.10.1. Kolonlar için termostat kontrollü, $\pm 1^\circ \text{C}$ hassasiyetle çalışabilen fırın.
 - 3.10.2. Split sisteme uygun liner içeren ve sıcaklığı ayarlanabilen enjeksiyon bloğu
 - 3.10.3. Alev-iyonizasyon dedektörü
 - 3.10.4. Gerekli bilgisayar sistemi ve bilgisayar sistemine bağlı yazıcı
 - 3.11. Kapiler kolon: Uzunluğu 20-30 m, iç çapı 0,25–0,32 mm, %5 difenil-%95 dimetilpolisiloksan içeren ve film kalınlığı 0,10–0,30 µm olan, camdan ya da eritilmiş silisten (SE-52 , SE-54 veya eşdeğeri kolon)
 - 3.12. Gaz kromatografi enjektörü: Sertleştirilmiş iğneli 10 µL'lik.
 - 3.13. Analitik terazi: 0,1 mg hassasiyetli
 - 3.14. Desikatör
- ### 4. Kimyasallar
- 4.2. 2 M Etanollü potasyum hidroksit çözeltisi:
130 g potasyum hidroksit (en az % 85 saflıkta) 200 mL saf su içinde soğutulularak çözülür ve etanolle bir litreye tamamlanır.
 - 4.3. Dietil eter: Analitik saflıkta

- 4.4. 0,2 M etanollü potasyum hidroksit çözeltisi:
13 g potasyum hidroksit 20 mL saf su içinde çözülür ve etanolle 1 litreye tamamlanır.
- 4.5. Susuz sodyum sülfat: Analitik saflıkta
- 4.6. Cam plakalar:
Silikajel ile kaplanmış, floresan özelliği olmayan, 0,25 mm kalınlıkta. (Kullanıma hazır olarak bulunmaktadır.)
- 4.7. Benzen: Kromatografik saflıkta
- 4.8. Aseton: Kromatografik saflıkta
- 4.9. n-hekzan: Kromatografik saflıkta
- 4.10. Dietil eter: Kromatografik saflıkta
- 4.11. Kloroform: Analitik saflıkta
- 4.12. İnce-tabaka kromatografisi için referans çözelti:
Kolesterol veya fitosterollerin kloroform içindeki % 5'lik çözeltisi .
- 4.13. % 0,2 lik etanollü 2,7-dikloroflorosein çözeltisi:
Birkaç damla 2 M etanollü potasyum hidroksit çözeltisi ilave edilerek hafifçe bazik hale getirilir.
- 4.14. Susuz piridin: Kromatografik saflıkta
- 4.15. Heksametil disilazan
- 4.16. Trimetilklorosilan
- 4.17. 20-28 karbonlu alifatik alkol trimetilsilil eterlerinin referans çözeltileri (bunları içeren yağlardan elde edilen saf alkol ya da alkol karışımları günlük hazırlanır.)
- 4.18. Kloroformda hazırlanmış % 0,1'lik (m/v) 1-eikosanol çözeltisi, (iç standart)
- 4.19. Taşıyıcı gazlar: Yüksek saflıkta hidrojen veya helyum
- 4.20. Yardımcı gazlar: Yüksek saflıkta hidrojen
Yüksek saflıkta kuru hava

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'lik 1-eikosanol çözeltisi ilave edilir ve çözücü azot gazı altında uçurulur. Nemi alınmış, filtre edilmiş numuneden balona tam 5 g tartılır.

5.1.2. Balona 2 M etanolik potasyum hidroksit çözeltisinden 50 mL ilave edilir ve balon geri soğutucuya takılır. Sabunlaşmanın gerçekleşmesi için (çözelti berrak hale gelene kadar) mantolu ısıtıcıya konularak kaynayıcaya kadar ısıtılır. Berraklık oluşuktan (yaklaşık 20 dk) sonra geri soğutucunun üzerinden 50 mL saf su ilave edilir. Geri soğutucu çıkarılır ve balon yaklaşık 30 °C sıcaklığa soğutulur.

5.1.3. Balonun içindekiler birkaç defa saf suyla çalkalanarak 500 mL'lik ayırma hunisine dikkatlice aktarılır. Yaklaşık 80 mL dietil eter ayırma hunisine ilave edildikten sonra 30

saniye kadar güçlü bir şekilde çalkalanır (çalkalama esnasında gaz basıncı artacağından kapaklı ayırma hunisi ters çevrilerek musluktan havası alınmalıdır) ve faz ayrımı için bekletilir. Alt faz ikinci bir ayırma hunisine alınır. İlk ayırma hunisinde kalan üst fazdan her seferinde 60-70 mL dietil eter kullanılarak aynı şekilde iki ekstraksiyon daha yapılır ve ikinci ayırma hunisine alınır. Herhangi bir emülsiyon oluşumu az miktarda etil veya metil alkol ilavesiyle yok edilebilir.

5.1.4. Tek bir ayırma hunisinde toplanan üç eter ekstraktı yıkama suyu nötr bir reaksiyon verene kadar (fenolftalein 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 dietil eter damıtılarak uzaklaştırıldıktan sonra hafif bir vakum veya azot akımı kullanılarak kuru hale getirilir. Tamamen kuruması için 100 ± 2 °C sıcaklıktaki etüvde yaklaşık 1 saat tutulur ve desikatörde soğutulduktan sonra tartılır.

5.2. Alifatik alkol fraksiyonlarının ayrılması

5.2.1. Silikajel plakaları 0,2 M etanolü potasyum hidroksit çözeltisine 10 saniye süreyle tamamen daldırılır, sonra kuruması için çeker ocakta iki saat bırakılır ve son olarak 100 °C'deki etüvde 1 saat bekletilir. Etüvden çıkarılır ve kullanılıncaya kadar kalsiyum klorür bulunan desikatörde bekletilir. Bu şekilde bir işleme tabi tutulan plakalar 15 gün içerisinde kullanılmalıdır. Bazik silikajel plakaları alifatik alkol fraksiyonlarını ayırmak için kullanılacağına sabunlaşmayan maddeleri alümina ile işleme tabi tutmaya gerek yoktur. İnce tabaka kullanıldığında tüm asidik bileşikler (yağ asitleri ve diğerleri) numunenin ilk uygulandığı çizgide kalacak, alifatik ve triterpen alkollerini içeren bant sterollerini içeren bantdan net bir şekilde ayrılacaktır.

5.2.2. Benzen/aseton karışımı 95:5 (v/v) yürütme tankı içine yaklaşık 1 cm yükseklikte doldurulur. Alternatif olarak 65:35 (v/v) oranındaki hekzan/dietil eter karışımı da kullanılabilir. Yürütme tankının kapağı kapatılır ve sıvı-buhar dengesi oluşması için en az yarım saat kadar 15-20 °C arasında bekletilir. Yürütme tankının iç duvarına çözeltiye batırılmış filtre kâğıdı şeritleri konulabilir. Bu işlem, yürütme süresini yaklaşık üçte bir oranında azaltır ve bileşenlerin daha düzgün ve belirgin bir şekilde ayrımını sağlar. Yürütme tankının içindeki çözelti her çalışmada yenilenmelidir.

5.2.3. Sabunlaşmayan maddelerin kloroformda yaklaşık % 5'lik çözeltisi hazırlanır. Çözelti, 100 iL'lik enjektör kullanarak 300 iL'lik kısmi 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 iL referans çözeltisi damlatılır, böylece alifatik alkol bandı taşınmadan sonra tanımlanabilir.

5.2.4. Plaka 5.2.2.'de belirtildiği şekilde hazırlanmış olan yürütme tankına konulur. 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.

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 işaretlenmiş alandan silikajel kazınır. Kazınan silikajel içine süzgeç kağıdı yerleştirilmiş huniye konulur. Darası alınmış 50 mL'lik ağzı şilifli armudi balonda süzüntü toplanacak şekilde 10 mL sıcak kloroform spatula ile dikkatlice karıştırılarak huniye aktarılır. Süzüntü aynı balonda toplanacak şekilde hunideki kalıntı üç kez dietil eterle (her sefer yaklaşık 10 mL) yıkanır. Süzüntüdeki çözücüler düşük sıcaklıktaki (40 °C'yi aşmayacak şekilde) dönerli vakum buharlaştırıcıda 4-5 mL kalıncaya kadar uçurulur. Kalan çözelti kuru hale gelene kadar hafif bir azot akımı altında uçurulur. Birkaç damla aseton ilave edilir ve kuruyana kadar tekrar hafif bir azot akımı altında uçurulur. 105 °C'deki etüvde 10 dakika bekletilir ve desikatörde soğutulduktan sonra ağzı şilifli armudi balon içeriği ile birlikte tartılır.

5.3. Trimetilsilil eterlerin hazırlanması.

5.3.1. Alifatik alkol fraksiyonu içeren ağzı şilifli armudi balona 9:3:1 (v/v/v) oranında piridin/hekzametil disilazan/trimetil klorosilan karışımından oluşan silillendirme reaktifinden alifatik alkol miktarının her miligramı için 50 µL oranında ilave edilir. Nem, analiz sonucunu olumsuz etkilemektedir. Piyasada kullanıma hazır silillendirme reaktifi bulunmaktadır (örneğin bis-trimetilsilil, triflor asetamid + % 1 trimetil klorosilan). Bunlar eşit miktarda susuz piridin ile seyreltilerek kullanılmalıdır.

5.3.2. Ağzı şilifli armudi balonun ağzı kapatılır, alifatik alkol tamamen çözünene kadar dikkatlice balon döndürülerek (ters çevirmeden) cidarlarda kalan alifatik alkollerin de silillendirilmesi sağlanır. Ortam sıcaklığında 15 dk kadar bekletilir. Berrak çözelti GC'ye enjeksiyon için hazırdır. Oluşabilecek hafif opaklık normaldir ve herhangi bir soruna yol açmaz. Beyaz askıda bir parçacığın oluşması 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 kromatografisi cihazına 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 kademeli olarak ısıtılır ve bu sıcaklıkta en az 2 saat süre tutulur. Şartlandırma sıcaklığı kolon için belirtilen en yüksek sıcaklığın 20 °C altında olmalıdır.

Cihaz çalışma şartları ayarlanır (gaz akışı düzenlenir, ateşleme yapılır, fırın, dedektör 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.

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: 280-300 °C,
- dedektör sıcaklığı: 280-300 °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 iL'si.

Aşağıdaki gerekliliklere uygun bir kromatogram almak için bu koşullar değiştirilebilir:

- Alkol C26 için alıkonma zamanı 18 ± 5 dk ,
- Alkol C22 piki zeytinyağı için tam kromatogramın % 80 ± 20 'i; tohum yağı için tam kromatogramın % 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 trimetilsilil esterleri 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/kg örnek cinsinden ifade edilen her bir alifatik alkol miktarı aşağıdaki şekilde hesaplanır:

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

Burada:

A_x = Alkol x'in pik alanı;

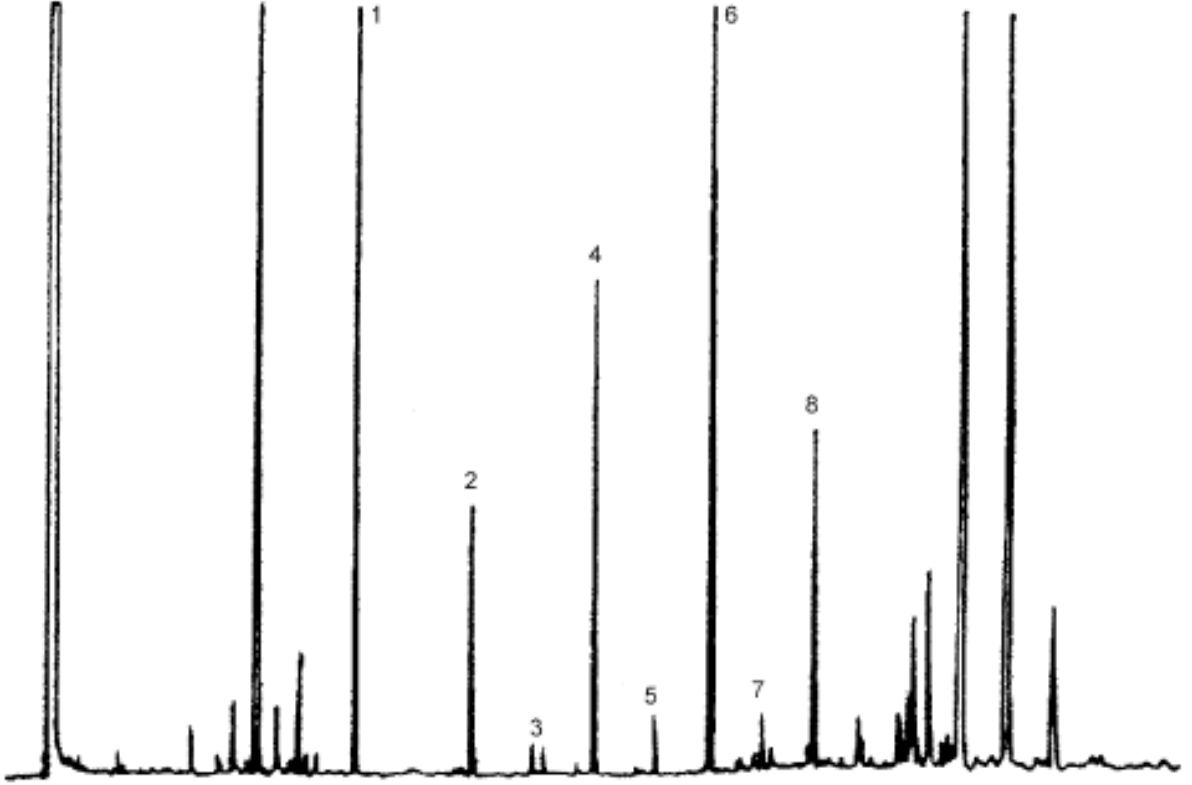
A_s = 1-eikosanol pik alanı

m_s = mg cinsinden eklenen 1-eikosanol kütlesi;

m = g cinsinden saptama için alınan numunenin kütlesi.

6. Sonuçların değerlendirilmesi

6.1. Her bir alifatik alkol miktarı örneğin mg/kg cinsinden ve toplamaları da "toplam alifatik alkol" olarak kaydedilir.



Şekil 1

Natürel zeytinyağının alkol fraksiyonunun kromatogramı

- 1 = Eikosanol
- 2 = Dekosanol
- 3 = Trikosanol
- 4 = Tetrakosanol
- 5 = Pentakosanol
- 6 = Heksakosanol
- 7 = Heptakosanol
- 8 = Oktakosanol

EK-16

Zeytinyağında Yabancı Yağın Tespiti

1. Kapsam

Bu metod zeytinyağındaki diğer bitkisel yağların varlığını tespit etmek için kullanılır. Linoleik asit değeri yüksek olan bitkisel yağlar (soya yağı, kanola yağı, ayçiçeği yağı vb.) ve fındık yağı, yüksek oleik asitli ayçiçeği yağı, pirina yağı gibi oleik asit değeri yüksek olan bazı bitkisel yağlar tespit edilebilir. Tespit limiti, karıştırılan yabancı yağın cinsine ve zeytinin çeşidine bağlıdır. Fındık yağı için tespit limiti genellikle %5-15 arasındadır. Bu metod zeytinyağına katılan yabancı yağın cinsini belirlemek için kullanılamaz. Sadece zeytinyağının saf olup olmadığını belirlemek için kullanılır.

2. Prensiptir

Yağ silikajel kartuşlu katı faz ekstraksiyonu (SPE) ile saflaştırılır. Triaçilgliserol (TAG) kompozisyonu propiyonitril mobil fazı kullanılarak, refraktif indeks dedektörlü, ters faz HPLC ile belirlenir. Yağ asidi metil esterleri, saflaştırılmış yağdan soğuk metanollü KOH (Ek-9B) ile metillendirilerek hazırlanır ve esterler yüksek polaritede kolon kullanılarak gaz kromatografi ile analiz edilir (Ek-9A). Teorik triaçilgliserol kompozisyonu, yağ asitleri kompozisyonu üzerinden, triaçilgliserollerdeki yağ asitlerinin, 2 pozisyonundaki doymuş yağ asitleri hariç, 1,3 ve 2 pozisyonlarının rastgele dağılımını tahminleyen bilgisayar programı yardımı ile hesaplanır. Hesaplama programı Ek-14'de tarif edilen prosedürün modifiye edilmiş halidir. Teorik ve deneysel (HPLC) olarak bulunan triaçilgliserol kompozisyonundan hesaplanmış birkaç matematiksel algoritma ve sonuç değerler ile saf zeytinyağından elde edilen veriler karşılaştırılır.

3. Materyal ve Kimyasallar

3.1. Yağın Saflaştırılması

3.1.1. Erlen: 25 ml'lik

3.1.2. Vial: 5 ml'lik

3.1.3. Silikajel kartuş: 1 g (6 ml). Katı faz ekstraksiyonu için

3.1.4. n-hekzan: Analitik saflıkta

3.1.5. Hekzan/dietileter karışımı: 87:13 (v/v)

3.1.6. N- heptan: Analitik saflıkta

3.1.7. Aseton: Analitik saflıkta

3.2. Triaçilgliserollerin HPLC ile Analizi

3.2.1. Mikro enjektör

3.2.2. Propiyonitril/ HPLC süper saflıkta

3.2.3. HPLC kolonu: 25 cm uzunluğunda ve 4 mm iç çapında. RP 18 (4 µm partikül boyutlu)

3.3. Yağ asidi metil esterlerinin hazırlanması (Ek-9B)

3.3.1. Metanol: %0,5 ten az su içeren

3.3.2. Heptan: Analitik saflıkta

3.3.3. 2 M metanollü KOH çözeltisi: 1,1 g KOH 10 ml metanolde çözülür.

3.3.4. Kapaklı vial: 5 ml'lik

3.4 Yağ Asidi Metil Esterlerinin GC ile Analizi (Ek-9A)

3.4.1. Mikro enjektör: 5 µL'lik

3.4.2. Taşıyıcı gaz: Yüksek saflıkta hidrojen veya helyum

3.4.3. FID dedektör için: Yüksek saflıkta hidrojen veya oksijen

3.4.4. Yardımcı gaz: Yüksek saflıkta azot veya helyum

3.4.5. Kapiler kolon: 50–60 m uzunluğunda, 0,25–0,30 mm iç çapında, sianopropilpolisiohegzan veya sianopropilfenilsilogzan,(SP-2380 veya eşdeğeri) 0,20-0,25 µm film kalınlığında.

4 Malzemeler

4.1. Vakum sistemi: Katı faz ekstraksiyonu için

4.2. Döner buharlaştırıcı

4.3. HPLC Donanımı

4.3.1. Gaz giderici: Mobil faz için

4.3.2. Enjeksiyon valfi: 10 µl'lik

4.3.3. Yüksek basınç pompası

4.3.4. Termostatik fırın sistemi

4.3.5. Refraktif indeks dedektörü (RID)

4.3.6. Bilgisayarlı İntegrasyon sağlayan veri toplayan sistem

4.4. GC Donanımı

4.4.1. Split enjeksiyon sistemi

4.4.2. Alev iyonizasyon dedektörü (FID)

4.4.3. Programlanabilir fırın

4.4.4. Bilgisayarlı İntegrasyon sağlayan veri toplayan sistem

4.4.5. Excel yüklü bilgisayar

5 Analiz prosedürü

5.1. Yağın Saflaştırılması

SPE kartuş vakum altında 6mL hekzan ile yıkanır. Kartuşun kurumasını önlemek için vakum kaldırılır ve kartuş altına erlen konulur. 0,5 ml hekzan içerisinde çözülmüş yaklaşık 0,12 g numune kartuşa verilir Hekzanda çözülmüş numune SPE kartuşa ilave edilerek 10 mL hekzan-dietil eter (87:13 v/v) içeren çözelti ile yıkanarak vakum altında süzülür. Toplanan fraksiyon homojenize edilip yarısı başka bir erlene aktarılır. Her iki erlendeki çözgen karışımı düşük basınç altında ve oda sıcaklığında vakumlu döner buharlaştırıcıda

uzaklaştırılır. Kalıntılardan biri TAG analizleri için 1 mL asetonda çözülür ve 5 ml lik vial e alınır. Kalıntılardan ikincisi yağ asitleri kompozisyonu analizi için 1 ml heptanda çözülerek 5 ml lik vial e alınır.

Yağın saflaştırılması IUPAC method 2.507’de tarif edildiği şekilde silikajel kolon kullanılarak yapılabilir.

5.2. HPLC ile Trigliseritlerin Analizi

HPLC çalışma koşulları,

kolon sıcaklığı: 20 °C,

mobil faz: propionitril

akış hızı: 0,6 ml/dk

olacak şekilde ayarlanır. Baseline stabil olduğunda solvent enjeksiyonu yapılır. Eğer baselinda 12-25 dakikaları arasında sapma olursa, örneği çözmek için farklı tipte aseton veya aseton/propiyonitril (25:75) karışımı kullanılır. Bazı tip asetonlar, baselineda bahsedilen dakikalarda sapmaya sebep olur.

Saflaştırılmış yağın aseton içerisindeki çözeltisinden (%5) 10 µl enjeksiyon yapılır. Analiz yaklaşık 60 dakika sürer. Trilinolein piki 15,5 dakikada gelecek ve LLL/OLLn ile OLL/OOLn pikleri arasında ayırım iyi olacak şekilde, Şekil 1 ‘de verilen kromatograma benzer bir kromatogram elde edilene kadar fırın sıcaklığı ve akış hızı ayarlanmalıdır. Pik 2’nin (OLLn+PoLL) yüksekliği tam skalanın en az %3’üne ulaşmalıdır.

5.3. Yağ Asidi Metil Esterlerinin Hazırlanması

1 ml n-heptan içerisinde çözünmüş saflaştırılmış yağ örneğine, 0,1 ml 2N metanollü KOH çözeltisi eklenir ve tüpün ağzı sıkıca kapatılır. Tüp 15 saniye boyunca hızla çalkalanır ve üst faz berraklaşana kadar beklenir (5 dakika). Heptan fazı gaz kromatografiye enjeksiyon için hazırdır. Bu çözelti oda sıcaklığında en fazla 12 saat bekletilebilir.

5.4. Yağ Asidi Metil Esterlerinin GC ile Analizi

Trans doymamış yağ asitlerinin belirlenmesi için Ek-9A’da tarif edilen metot kullanılmalıdır.

GC çalışma şartları;

Fırın sıcaklığı: 165 °C’de 10 dk beklendikten sonra dakikada 1,5 °C’lik artışla 200 °C’ye çıkarılmalıdır. Enjeksiyon bloğu için tavsiye edilen sıcaklık trans yağ asidi oluşumunu minimize etmek için 220-250 °C’dir (bkz. Ek-9A).

Dedektör sıcaklığı 250 °C’dir.

Kolon başlangıç basıncı yaklaşık 130 kPa’ da taşıyıcı gaz olarak Helyum veya Hidrojen kullanılmalıdır.

Split modunda 1 µL nejeksiyon yapılır.

Şekil 2’de verilen kromatograma benzer bir kromatogram elde edilmelidir. C18:3 ve C20:1 piklerinin ayrılmasına özellikle dikkat edilmelidir (C18:3 piki C20:1 pikinden önce gelmelidir). Bu şartların sağlanması için sıcaklık ve/veya kolon basıncı optimize edilmelidir. Palmitik asit ve palmitoleik asit farkının minimize edilmesi için enjeksiyon koşulları (sıcaklık, split oranı ve enjeksiyon hacmi) ayarlanır. C20:0 pikinin yüksekliği belirlenen trans izomer tam skalasının yaklaşık %20’si kadar olmalıdır. Eğer C18:0 piki düzgün gelmezse örnek miktarı azaltılır.

6. Piklerin Tanımlanması

6.1. HPLC Kromatogramı

Şekil 1’de saf zeytinyağına ait tipik trigliserit kromatogramı görülmektedir. Piklerin integrasyonu için 3 baseline yolu izlenmelidir: İlki 1 nolu pikin başlangıcı ile 3 nolu pikin bitimi arasında; İkincisi 4 nolu pikin başlangıcı ile 8 nolu pikten önceki çukurun arasında; üçüncüsü 8 nolu pikten önceki çukurluk ile 18 nolu pik bitiminin arasında. Toplam alan 1 nolu pikten 18 nolu pike kadar tüm piklerin (belirlenmiş ve belirlenmemiş) alanlarının toplamıdır. Her bir pik yüzdesi aşağıdaki formülle hesaplanır.

$$\text{TAG x (\%)} = 100 (A_x + A_T)$$

Yüzdeler 2 ondalık olarak verilmelidir.

6.2. GC Kromatogramı

Şekil 2’de saf zeytinyağına ait yağ asidi alkil esterleri kromatogramı görülmektedir. Aşağıda verilen yağ asitlerine ait yüzdelere hesaplanmalıdır.

Palmitik; P (C16:0) = metilesterler + etil esterler

Stearik; S (C18:0) = methyl ester

Palmitoleik; Po (C16:1) = iki cis izomerin metil esterleri toplamı

Oleik; O (C18:1) = iki cis izomerin metil esterleri toplamı + etil ester + *trans*-izomerler

Linoleik; L (C18:2) = metil esterler+ etil esterler + *trans*-izomerler

Linolenik; Ln (C18:3) = metil esterler + *trans*-izomerler

Araşidik; A (C20:0) = metil ester

Eicosenoik (gadoleik); G (C20:1) = metil ester

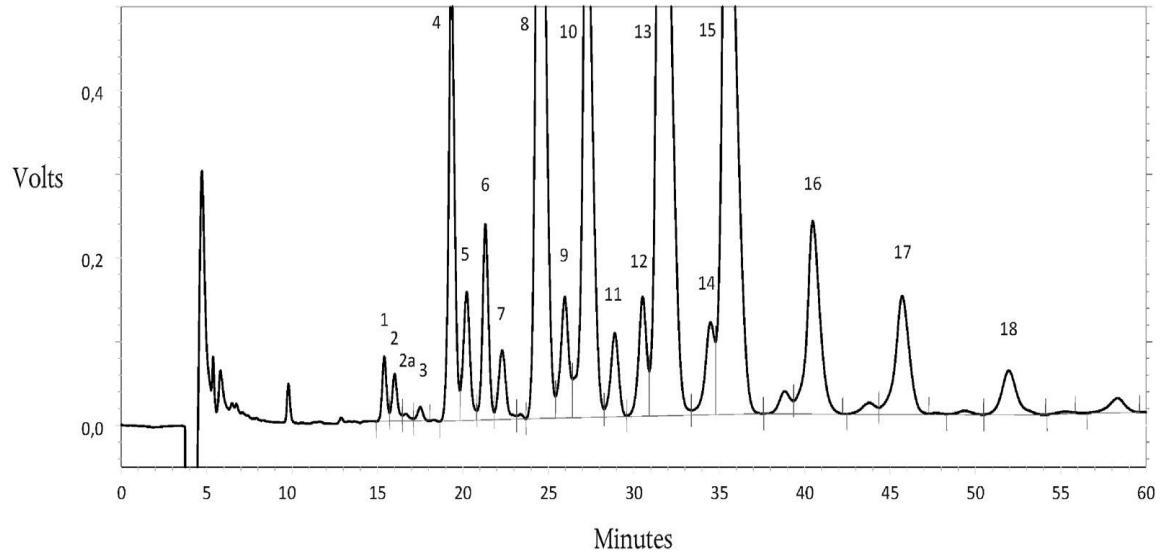
Etil ve *trans*-izomerlerin esterleri GC kromatogramında bulunmayabilir.

Toplam alan C14:0 den C:24:0 e kadar squalen hariç görünen tüm piklerin toplamıdır. Her bir pik yüzdesi aşağıdaki şekilde hesaplanır:

$$\text{FA x (\%)} = 100 (A_x + A_T)$$

Sonuçlar 2 ondalık olarak verilmelidir.

Bilgisayar programı ile hesaplamada 100’e tamamlama otomatik olarak yapıldığından bu işleme gerek yoktur.



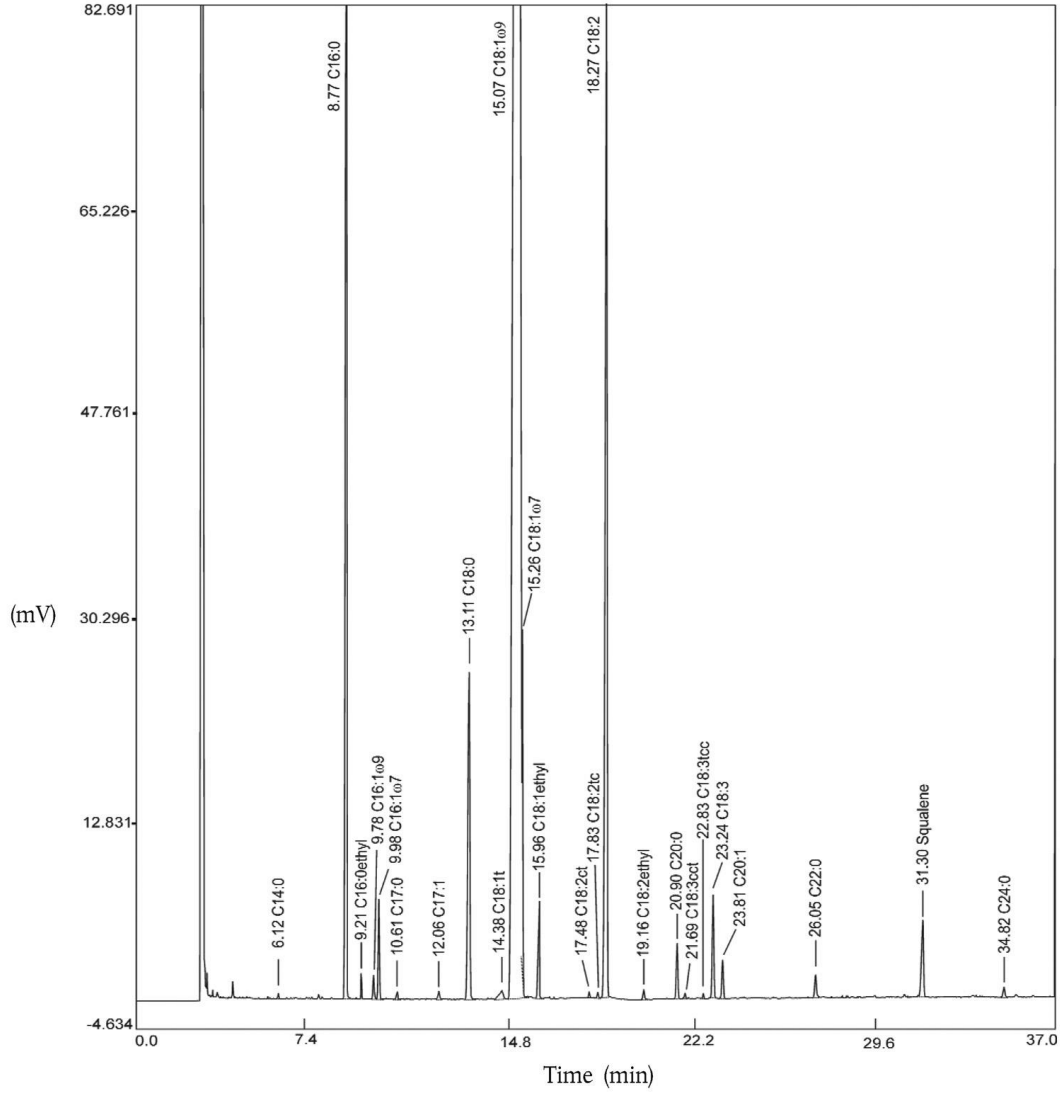
Şekil 1. “Chamlali” zeytinyağına ait TAG lerin HPLC Kromatogramı. Kromatografik piklerin ana bileşenleri.

- (1) LLL; (2) OLLn+PoLL; (3) PLLn; (4) OLL; (5) OOLn+PoOL;
(6) PLL+PoPoO; (7) POLn+PPoPo+PPoL; (8) OOL+LnPP; (9) PoOO;
(10) SLL+PLO; (11) PoOP+SPoL+SOLn+SPoPo; (12) PLP;
(13) OOO+PoPP; (14) SOL; (15) POO; (16) POP; (17) SOO;
(18) POS+SLS.

Tablo 1. 20 °C kolon sıcaklığında mobil faz olarak propiyonitril kullanılarak HPLC’ de natürel zeytinyağının TAG lerin belirlenmesine ait tekrar edilebilirlik verileri.

EC N	HPLC Pikleri	TAGs	Örnek 1		Örnek 2		Örnek 3		Örnek 4		Örnek 5	
			Ortalama (%)	RSDr (%)	Ortalama (%)	RSDr (%)	Ortalama (%)	RSDr (%)	Ortalama (%)	RSDr (%)	Ortalama (%)	RSDr (%)
42	1	LLL	0,020	7,23	0,066	5,18	0,095	4,10	0,113	0,95	0,34	1,05
	2	OLLn+PoLL	0,085	7,44	0,24	1,78	0,26	2,25	0,35	2,02	0,50	2,83
	3	PLLn	0,023	15,74	0,039	5,51	0,057	5,62	0,082	4,35	0,12	6,15
44	4	OLL	0,47	1,52	1,53	0,42	2,62	0,98	3,35	1,05	4,37	1,13
	5	OOLn+PoOL	1,07	2,01	1,54	0,46	1,61	0,71	1,72	1,07	1,77	2,40
	6	PLL+PoPoO	0,11	12,86	0,24	4,37	0,65	1,32	1,35	0,73	2,28	1,24
	7	POLn+PPoPo + PPoL	0,42	5,11	0,49	2,89	0,55	2,01	0,85	1,83	1,09	1,96
46	8	OOL+LnPP	6,72	0,63	8,79	0,31	11,21	0,42	13,25	0,33	15,24	0,23
	9	PoOO	1,24	2,86	1,49	0,95	1,63	0,85	2,12	0,45	2,52	0,56
	10	SLL+PLO	2,70	0,65	4,05	0,70	6,02	0,65	9,86	0,53	11,53	0,31
	11	PoOP+SPoL+ SOLn+SPoPo	0,64	4,42	0,69	3,02	0,79	1,23	1,53	0,89	1,70	1,66
48	12+13	OOO+PLP+ PoPP	49,60	0,07	48,15	0,06	42,93	0,06	33,25	0,10	24,16	0,06
	14	SOL	0,82	1,72	0,92	1,56	1,05	1,32	1,25	1,05	1,60	1,77
	15	POO	22,75	0,25	21,80	0,20	21,05	0,30	20,36	0,35	20,17	0,14
50	16	POP	3,05	0,46	4,56	0,42	4,98	0,52	5,26	0,41	5,57	0,38
	17	SOO	6,87	0,21	5,56	0,33	4,86	0,43	4,12	0,72	3,09	0,69
	18	POS+SLS	1,73	1,23	1,65	1,10	1,54	0,99	1,49	1,10	1,41	1,00

n= 3
RSDr= Tekrar edilebilirliğin bağıl standart sapması



Şekil 2. Pirina yağının soğuk metanollü KOH ile transesterifikasyonundan elde edilen yağ asidi alkil esterleri GC kromatogramı.

7. Zeytinyağında Yabancı Yağ Tespiti

Saf zeytinyağından elde edilen verilere dayalı matematiksel algoritmaların karşılaştırılması yöntemi yoluyla zeytinyağında yabancı yağ tespitinin hesaplaması metodu IOC/T.20/Doc. No 25 standartının Ek-1'inde düzenlenmiştir.