



T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ZEYTİNYAĞI DİSTİLATINDAKİ BİYOAKTİF BİLEŞENLERİN MONOLİTİK KOLONLARLA İNCELENMESİ

İsmail TARHAN

DOKTORA TEZİ

Kimya Anabilim Dalı

Aralık-2018
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

DOKTORA TEZİ

ZEYTİNYAĞI DİSTİLATINDAKİ BİYOAKTİF BİLEŞENLERİN MONOLİTİK KOLONLARLA İNCELENMESİ

İsmail TARHAN

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Hüseyin KARA

2018, 281 Sayfa

Jüri
Prof. Dr. Hüseyin KARA
Prof. Dr. Adnan KENAR
Prof. Dr. Zafer YAZICIGİL
Prof. Dr. Aydan YILMAZ
Doç. Dr. Mustafa TOPKAFA

Sunulan bu çalışmada, zeytinyağının rafinasyonu esnasında deoderizasyon kademesinde elde edilen zeytinyağı deoderize distilatının (OODD), fiziksel ve kimyasal özellikleri titrimetrik, kromatografik ve spektroskopik metotlarla incelenmiş ve deoderizasyon kademesinin yüksek sıcaklık, düşük basınç ve su buharı etkisiyle yağdan uzaklaşarak deoderize distilatına geçen serbest yağ asitleri (FFA), tokotrienol, tokoferol, sterol ve skualen gibi katma değeri yüksek ve insan sağlığı açısından son derece önemli biyoaktif bileşenlerin, üstün ayırma özelliklerine sahip monolitik kolonlar kullanılarak tek bir analizle tayin edilebilmelerine imkan veren yeni metotlar geliştirilmiştir.

Çalışmanın birinci aşamasında, temin edilen OODD numunesinin fiziksel ve kimyasal özellikleri uluslararası standart metotlar kullanılarak incelenmiş ve sırasıyla nem miktarı, FFA miktarı, iyot sayısı, As_{232} ve As_{270} değeri, peroksit sayısı, anisidin sayısı ve totoks sayısı tespit edilmiştir. Ayrıca kromatografik teknikler kullanılarak yağ asidi kompoziyonu, trigliserit (TG) kompoziyonu, polar ve apolar madde tayini, polimerik madde tayini, tokoferol-tokotrienol tayini, sterol tayini ve skualen tayinin gerçekleştirilmiştir.

Çalışmanın ikinci basamağında OODD numunesinin FFA miktarının ve iyot sayısının tayini için kemometrik yöntemlerden faydalanılarak yeni IR spektroskopik metotlar geliştirilmiştir. FFA miktarının tayini için Fourier dönüşümlü yakın infrared (FT-NIR) tekniğinin; iyot sayısının tayinin için ise tekli zayıflatılmış toplam yansıma fourier dönüşümlü infrared (SB-ATR-FT-IR) tekniğinin uygun olduğu görülmüştür. Natürel sızma zeytinyağlarının (EVOO) %FFA miktarının kantitatif olarak tayini için kemometrik metotlardan ve farklı ölçüm modlarına sahip FT-IR spektroskopisi tekniğinden faydalanılmış ve bu amaçla geliştirilen 12 farklı kısmi en küçük kareler metodu (PLS) kalibrasyon modelinden en iyi kalibrasyon değerlerine sahip olanının normal spektrumun kullanıldığı transmisyon modu olduğu tespit edilmiştir. EVOO için IR spektroskopisinin kullanıldığı bir diğer çalışmada ise EVOO'nın normal zeytinyağlarından ve diğer yenilebilir yağlardan kolay ve hızlı bir şekilde ayırt edilebilmesi için PLS-diskriminant analizi (PLS-DA) kalibrasyon modellerinden faydalanılarak orta, yakın ve raman IR spektroskopik teknikleri karşılaştırılmıştır. Elde edilen dendrogram ve benzerlik haritaları verilerine göre EVOO'nın normal zeytinyağlarından ve diğer yenilebilir yağlardan ayırt edilebilmesi için en başarılı tekniğin FT-NIR tekniği olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmanın son aşamasında ise monolitik kolon kullanılarak herhangi bir ön işlem yapmadan sadece aseton içerisinde çözülmüş olan bitkisel yağların direk yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) sistemine enjeksiyonu ile sterol, FFA, tokotrienol, tokoferol, skualen, monogliserit, digliserit ve TG türlerinin tek bir analizle tayin edilebilmesine imkan veren yeni bir monolitik ayırma metodu (MA1)

önerilmiştir. Geliştirilen MA1 metodu ile herhangi bir yenilebilir yağ ya da distilatının TG kompoziyonu yüzdeleri tespit edilmiştir. MA1 metodunun kromatografik parametreleri sırasıyla hareketli faz bileşimi için %40-60 aseton-asetonitril; hareketli faz akış hızı için 2.00 mL/dk ve kolon fırını sıcaklığı için ise 30.00 ºC olarak belirlenmiştir. Monolitik kolon kullanılarak ilk kez geliştirilen ikinci ve en önemli metot monolitik ayırma2 (MA2) ile de her biri ayrı bir standart metotla tayin edilen sterol, tokotrienol, tokoferol ve skualen türleri, tek bir analiz metoduyla tayin edilebilmiştir. İlgili metodun kromatografik parametreleri kemometrik yöntemlerden faydalanılarak optimize edilmiş ve optimum değerler sırasıyla hareketli faz akış hızı için 2.50 mL/dk ve kolon fırını sıcaklığı için ise 38.41 ºC olarak tespit edilmiştir. Hareketli faz olarak farklı oranlarda metanol-su karışımı kullanılmış ve bu şekilde analiz esnasında hareketli fazın polaritesi değiştirilebilmiştir. Geliştirilen MA2 metodunun validasyonu ise OODD numunesi ile yapılmış ve MA2 metodunun sabunlaştırılmış bir deoderize distilat numunesinde bulunan tüm biyoaktif türleri başarılı bir şekilde, tek bir analizle, kısa bir zamanda ve yüksek bir doğrulukla tespit edebildiği görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Deoderize distilat, IR, kemometri, kromatografi, monolitik kolon, skualen, sterol, tokoferol, zeytinyağı.

ABSTRACT

Ph.D THESIS

THE INVESTIGATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS IN OLIVE OIL DISTILLATE USING MONOLITHIC COLUMNS

İsmail TARHAN

The Graduate School of Natural and Applied Science of Selçuk University
The Degree of Doctor of Philosophy
In Chemistry

Advisor: Prof. Dr. Hüseyin KARA

2018, 281 Pages

Jury
Prof. Dr. Hüseyin KARA
Prof. Dr. Adnan KENAR
Prof. Dr. Zafer YAZICIGİL
Prof. Dr. Aydan YILMAZ
Assoc. Prof. Dr. Mustafa TOPKAFA

In this study, physical and chemical properties of olive oil deodorized distillate (OODD) obtained in deoderization stage during refining of olive oil have been examined using titrimetric, chromatographic and spectroscopic methods and new methods that allow to determine with a single analysis of high value-added bioactive components such as free fatty acids (FFA), tocotrienol-tocopherol, sterol, and squalene, which move away from oil due to conditions such as high temperature, low pressure and water vapor of deodorisation stage have been developed using monolithic columns with superior separation properties.

In the first stage of the study, the physical and chemical properties of OODD sample obtained have been examined using international standard methods and the moisture content, the amount of FFA, iodine number, the value of A_{S232} and A_{S270}, peroxide number, the number of anisidine, and the number of totox of OODD have been determined. In addition, determination of fatty acid composition, triglyceride (TG) composition, polar and nonpolar substance, polymeric substance, tocopherol-tocotrienol, sterol and squalene have been performed using chromatographic techniques.

In the second stage of the study, new IR spectroscopic methods have been developed by using chemometric methods for the determination of FFA amount and the iodine number of OODD sample. It was seen that the single bounce attenuated total reflectance fourier transform infrared (SB-ATR-FT-IR) technique was suitable for the determination of the iodine number while the fourier transform near infrared (FT-NIR) technique was suitable for the determination of FFA amount of OODD. For quantitative determination of %FFA content of extra virgin olive oils (EVOO), FT-IR spectroscopy technique with different measurement modes and chemometric methods has been used and it was determined that the method which have the best calibration values from 12 different calibration models of partial least squares method (PLS) developed for this purpose is transmission mode using the normal spectrum. In another study using IR spectroscopy for EVOO, medium, near and raman IR spectroscopic techniques have been compared using calibration models of PLS-discriminant analysis (PLS-DA) in order to distinguish extra virgin olive oils from normal olive oils and other edible oils easily and quickly. According to the data obtained from dendrogram and similarity maps, it was determined that FT-NIR technique was the most successful technique in order to distinguish extra virgin olive oils from normal olive oils and other edible oils.

In the last stage of the study, monolithic separation1 (MA1) method have been proposed which allows the determination of sterols, FFA, tocotrienols, tocopherols, squalene, monoglycerides, diglycerides,

and TG structures of edible oils dissolved in acetone by injection into directly the high performance liquid chromatography (HPLC) system without any pretreatment using monolithic column. With the developed MA1 method, TG composition percentages of any edible oil or distillate have been determined. The compound of mobile phase, the flow rate of mobile phase, and the temperature of the column oven of MA1 method have been determined as %40-60 acetone-acetonitrile; 2.00 mL/minute and 30.00 ^{o}C, respectively. Sterol, tocotrienol, tocopherol and squalene species determined by standard methods separately have been determined with thanks to monolithic separation2 (MA2) the second and most important method developed using a monolithic column at the first time. The chromatographic parameters of the method have been optimized using chemometric methods and the optimum values of the flow rate of mobile phase, the temperature of the column oven have been determined as 2.50 mL/minute and 38.41 ^{o}C, respectively. Different amounts of methanol-water mixture have been used as mobile phase and thus the polarity of the mobile phase has been changed during the analysis. The validation of the developed MA2 method has been done with the OODD sample and it was found that the MA2 method could successfully detect all bioactive species found in a saponified deoderized distillate sample with a single analysis, in a short time and with high accuracy.

Keywords: Chemometrics, chromatography, deodorizer distillate, IR, monolithic column, olive oil, sterol, squalene, tocopherol.

ÖNSÖZ

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

Bu çalışmanın hazırlanmasında, kaynak araştırmasında ve seminerinin sunulmasında her türlü bilgi ve önerileriyle bana yol gösteren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Hüseyin KARA' ya teşekkür ederim.

Desteklerinden ötürü Araştırma Grubumuzda yer alan Doç. Dr. H. Filiz AYYILDIZ, Doç. Dr. Mustafa TOPKAFA, Dr. Öğr. Üyesi Fatih DURMAZ, Dr. Öğr. Üyesi Fatma Nur ARSLAN, Doktora Öğrencisi Aslan TAŞ, Yüksek Lisans Öğrencileri Oktay KALKAN ve Raşit BAKIR olmak üzere, tüm arkadaşlarıma da teşekkür ederim.

Ayrıca bu çalışmanın bir bölümü, Tübitak 2214/A Yurtdışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı desteğiyle (Bursiyer No: 1059B141400950, Süre: 12 Ay), Doç. Dr. Ashraf A. ISMAIL danışmanlığı ile Kanada McGill Üniversitesi, Tarım ve Çevre Bilimleri Fakültesi, Gıda Bilimi ve Tarım Kimyası Bölümünde, McGill IR Araştırma Grubu laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

Kanada McGill Üniversitesi'ne kabul eden ve laboratuvarlarında çalışma fırsatı sunan Doç. Dr. Ashraf A. ISMAIL'e ve bu üniversiteye kabul almamda bana referans ve yardımcı olan Prof. Dr. Syed Tufail Hussain SHERAZI'ye de çok teşekkür ederim. Ayrıca desteklerinden ötürü McGill IR Araştırma Grubunda yer alan Doktora Öğrencisi Serella (Qianjun) GAN, Yüksek Lisans Öğrencileri Tamao TSUTSUMI ve Rissy RAN ve stajyer Michael PONTIF'e de teşekkür ederim.

Çalışmaların yürütülebilmesi için gerekli mali kaynağı, BAP 16101011 nolu proje ile sağlayan S.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğüne de teşekkür ederim.

Son olarak; çalışmalarım süresince manevi desteğiyle ve güler yüzüyle hep yanımda olan eşim Esra TARHAN'a ve en büyük motivasyon kaynağım, biricik kızım Zeynep Miray TARHAN'a teşekkür ediyor ve O'na ayıramadığım zamanların bir telafisi olması ümidiyle doktora tezimi Kızım Zeynep Miray TARHAN'a atfediyorum.

İsmail TARHAN
KONYA-2018

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iv**
ABSTRACT ..... **vi**
ÖNSÖZ ..... **viii**
İÇİNDEKİLER ..... **ix**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **iv**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **x**
SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **xv**
1. GİRİŞ **1**
2. ZEYTİNYAĞI VE RAFİNASYONU **3**
2.1. Yağlar 3
2.2. Zeytinyağı 5
2.3. Zeytinyağının Bileşenleri 7
2.3.1. Trigliseritler 8
2.3.2. Monogliseritler ve digliseritler 10
2.3.3. Yağ asidi kompozisyonu 10
2.3.4. Serbest yağ asitleri 11
2.3.5. Tokoferoller 12
2.3.6. Steroller 14
2.3.7. Hidrokarbonlar 16
2.3.8. Fosfolipitler 17
2.4. Zeytinyağı Çeşitleri 17
2.5. Zeytinyağının Kalite Parametreleri 18
2.6. Zeytinyağının Kimliğinin Doğrulanması ve Tağşişi 19
2.7. Zeytinyağının Rafinasyonu 22
2.7.1. Degumming 23
2.7.2. Nötralizasyon 24
2.7.3. Ağartma 24
2.7.4. Vinterizasyon 25
2.7.5. Deoderizasyon ve deoderize distilat 25
2.7.6. Rafinasyon yan ürünleri 28
3. MONOLİTİK KOLONLAR **30**
3.1. Monolitik Kolonların Genel Karakteristiği 33
3.2. Monolitik Kolon Çeşitleri 36
3.2.1. Organik monolitler 36

3.2.2. Silika monolitler 37
3.2.3. Hibrit monolitler 37
4. KAYNAK ARAŞTIRMASI 39
4.1. Zeytinyağı Deoderize Distilatı ve Bileşimi 39
4.2. Gıda Analizlerinde Monolitik Kolonların Ters-Faz Ayrımları 45
4.3. Problemin İfadesi ve Doktora Tezinin Amacı 47
5. MATERYAL VE YÖNTEM 49
5.1. Kullanılan Kimyasallar ve Çözücüler 49
5.2. Kullanılan Enstrümantal Cihazlar 51
5.3. Kullanılan Numuneler 51
5.4. Zeytinyağı Deoderize Distilatının Fiziksel ve Kimyasal Bileşenlerinin Uluslararası Standart Metotlarla Tayini 52
5.4.1. Nem miktarının tayini 52
5.4.2. Serbest yağ asidi miktarının titrimetrik tayini 52
5.4.3. İyot sayısının titrimetrik tayini 53
5.4.4. Birincil ve ikincil oksidasyon ürünlerinin spektroskopik tayini 53
5.4.5. Peroksit sayısının titrimetrik tayini 54
5.4.6. Anisidin ve totoks sayısının spektroskopik tayini 55
5.4.7. Yağ asidi kompozisyonunun gaz kromatografisi ile tayini 57
5.4.8. Trigliserit kompozisyonunun sıvı kromatografisi ile tayini 59
5.4.9. Polar ve apolar madde miktarının sıvı kromatografisi ile tayini 61
5.4.10. Polimerik madde miktarının sıvı kromatografisi ile tayini 62
5.4.11. Tokoferol-tokotrienol miktarının sıvı kromatografisi ile tayini 63
5.4.12. Sterol miktarının gaz kromatografisi ile tayini 65
5.4.13. Sterol miktarının sıvı kromatografisi ile tayini 68
5.4.14. Skualen miktarının sıvı kromatografisi ile tayini 71
5.5. Zeytinyağı Deoderize Distilatı ve Natürel Sızma Zeytinyağları İçin Geliştirilen FT-IR Temelli Spektroskopik Metotlar 74
5.5.1. Zeytinyağı deoderize distilatındaki serbest yağ asidi miktarının tayini için SB-ATR-FT-IR temelli metot geliştirilmesi 74
5.5.2. Zeytinyağı deoderize distilatındaki serbest yağ asidi miktarının tayini için FT-NIR temelli metot geliştirilmesi 76
5.5.3. Zeytinyağı deoderize distilatının iyot sayısının tayini için SB-ATR-FT-IR temelli metot geliştirilmesi 78
5.5.4. Zeytinyağı deoderize distilatının iyot sayısının tayini için FT-NIR temelli metot geliştirilmesi 79

5.5.5. Kemometrik metotlar ve farklı absorpsiyon modlarına sahip FT-IR spektroskopisi kullanarak natürel sızma zeytinyağlarının serbest yağ asidi miktarının kantitatif olarak tayini 80
5.5.6. Orta, yakın ve raman spektroskopisinin natürel sızma zeytinyağlarının sınıflandırılması için kullanımının karşılaştırılması 83
5.6. Monolitik Kolon Çalışmaları 86
5.6.1. Monolitik ayırma1 87
5.6.2. Monolitik ayırma2 88
6. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA 103
6.1. Zeytinyağı Deoderize Distilatının Fiziksel ve Kimyasal Bileşenlerinin Uluslararası Standart Metotlarla Tayini 103
6.1.1. Nem miktarının tayini 103
6.1.2. Serbest yağ asidi miktarının titrimetrik tayini 103
6.1.3. İyot sayısının titrimetrik tayini 103
6.1.4. Birincil ve ikincil oksidasyon ürünlerinin spektroskopik tayini 103
6.1.5. Peroksit sayısının titrimetrik tayini 105
6.1.6. Anisidin ve totoks sayılarının spektroskopik tayini 105
6.1.7. Yağ asidi kompozisyonunun gaz kromatografisi ile tayini 106
6.1.8. Trigliserit kompozisyonunun sıvı kromatografisi ile tayini 108
6.1.9. Polar ve apolar madde miktarının sıvı kromatografisi ile tayini 110
6.1.10. Polimerik madde miktarının sıvı kromatografisi ile tayini 112
6.1.11. Tokoferol-tokotrienol miktarının sıvı kromatografisi ile tayini 113
6.1.12 Sterol miktarının gaz kromatografisi ile tayini 117
6.1.13. Sterol miktarının sıvı kromatografisi ile tayini 118
6.1.14. Skualen miktarının sıvı kromatografisi ile tayini 124
6.1.15. Zeytinyağı deoderize distilatının uluslararası standart metotlarla tayin edilen bileşimi 128
6.2. Zeytinyağı Deoderize Distilatı ve Natürel Sızma Zeytinyağları İçin Geliştirilen FT-IR Temelli Spektroskopik Metotlar 132
6.2.1. Zeytinyağı deoderize distilatındaki serbest yağ asidi miktarının tayini için SB-ATR-FT-IR temelli metot geliştirilmesi 132
6.2.2. Zeytinyağı deoderize distilatındaki serbest yağ asidi miktarının tayini için FT-NIR temelli metot geliştirilmesi 135
6.2.3. Zeytinyağı deoderize distilatının iyot sayısının tayini için SB-ATR-FT-IR temelli metot geliştirilmesi 137
6.2.4. Zeytinyağı deoderize distilatının iyot sayısının tayini için FT-NIR temelli metot geliştirilmesi 139

6.2.5. Kemometrik metotlar ve farklı absorpsiyon modlarına sahip FT-IR spektroskopisi kullanarak natürel sızma zeytinyağlarının serbest yağ asidi miktarının kantitatif olarak tayini 141
6.2.6. Orta, yakın ve raman spektroskopisinin natürel sızma zeytinyağlarının sınıflandırılması için kullanımının karşılaştırılması 146
6.3. Monolitik Kolon Çalışmaları 151
6.3.1. Monolitik ayırma1 151
6.3.2. Monolitik ayırma2 166
7. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 226
7.1. Sonuçlar 226
7.2. Öneriler 233
KAYNAKLAR 235
ÖZGEÇMİŞ 248

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1. Yağların bileşiminde bulunan bazı yağ asitleri a) Stearik asit, b) Oleik asit, c) Linoleik asit, d) Linolenik asit (trans konumlarında verilmiştir)..... 4

Şekil 2. 2. Farklı yağ asitlerinden meydana gelmiş olan bir trigliserit molekülü 5

Şekil 2. 3. Yunanistan'ın Santorini adasında bulunan 60.000 yaşındaki fosilleşmiş zeytin yaprakları (Valavanis 2004) 5

Şekil 2. 4. Milattan önce 6. yüzyılda zeytin toplanmasını gösteren bir tablo (Valavanis 2004) 6

Şekil 2. 5. Zeytinyağının ana bileşenleri..... 8

Şekil 2. 6. Zeytinyağının kimyasal kompozisyonu 8

Şekil 2. 7. Basit (solda) ve karışık (sağda) TG örnekleri (Ayyıldız 2010)..... 9

Şekil 2. 8. Tokoferol ve tokotrienollerin genel yapısı 12

Şekil 2. 9. E vitaminin bileşenleri 12

Şekil 2. 10. Tokoferollerin analiz teknikleri 14

Şekil 2. 11. Kolesterol molekülünün yapısı 15

Şekil 2. 12. Skualen molekülünün yapısı..... 16

Şekil 2. 13. Skualen analiz teknikleri 17

Şekil 2. 14. 1980'den 2010 yılına kadar gıda sahtekarlığına maruz kalan gıda ürünleri yüzdeleri (Moore ve ark 2012) 19

Şekil 2. 15. Spektroskopik datalar kullanılarak sınıflandırma ya da kantitatif analiz için kullanılacak kemometrik modelin oluşturulma basamakları..... 22

Şekil 2. 16. Rafinasyon çeşitleri ve basamakları..... 23

Şekil 2. 17. Deoderizasyon kademesinde yağdan uzaklaştırılan maddeler 26

Şekil 2. 18. Deoderizasyon kademesinde yağda oluşan maddeler (a) ve kayıplar (b)... 27

Şekil 2. 19. Rafinasyon işleminin farklı kademelerinde meydana gelen önemli yan ürünler 28

Şekil 3. 1. Mitolojik Yunan yapılarında bulunan monolitik sütunlar (Nikolaos 2010) 32

Şekil 3. 2. Çin, Beijing'te bir parkta sergilenen monolitik yapı (Guiochon 2007) 33

Şekil 3. 3. Silika tabanlı ve organik tabanlı monolitik kolonlar (Merck 2010) 33

Şekil 3. 4. Tipik bir silika tabanlı monolitik kolonun gözenek yapısının SEM görüntüsü (Cabrera 2004) 34

Şekil 3. 5. Silika tabanlı bir monolitik malzemenin mezo ve makro gözeneklerinin boyutları (Onyx 2010) 34

Şekil 3. 6. Geleneksel dolgulu ve monolitik kolonların partikül ve gözenek yapısı (Onyx 2010) 35

Şekil 3. 7. Geleneksel kolonlar ile monolitik kolonların artan akış hızlarında gösterdiği geri basınçların karşılaştırılması (Onyx 2010) 35

Şekil 3. 8. Moleküler baskılama tekniğinin temel basamakları 38

Şekil 5. 1 Shimadzu marka Ultraviyole-görünür alan Spektrofotometre 54

Şekil 5. 2. Yenilebilir bir yağın zamanla değişen oksidasyonunun PV, AV ve TV değerleri ile ölçümü (Miller 2016) 56

Şekil 5. 3. MSE Mistral 2000 santrifüj cihazı 57

Şekil 5. 4. Agilent 7890 GC sistemi 58

Şekil 5. 5. Agilent 1200 HPLC sistemi 60

Şekil 5. 6. Agilent 7890N-5975C GC-MS sistemi 66

Şekil 5. 7. Sterol tayini için standart ekleme metoduna göre hazırlanmış kalibrasyon çözeltileri 70

Şekil 5. 8. Skualen tayini için standart ekleme metoduna göre hazırlanmış kalibrasyon çözeltileri 73

Şekil 5. 9. Alpha model SB-ATR-FT-IR (Bruker, Almanya) spektrofotometre 75

Şekil 5. 10. Bomem FT-NIR (Bomem Inc., Quebec, Kanada) Spektrofotometre 77

Şekil 5. 11. IRSphinx marka taşınabilir ATR-IR Spektrofotometre 85

Şekil 5. 12. Bruker marka el tipi ve dokunmatik ekranlı Bravo model raman Spektrofotometre 86

Şekil 5. 13. İki değişkenli bir sistemin optimizasyonunda kullanılan kuadratik modelden elde edilen yüzey grafiklerinin bazı profilleri: (a) maksimum, (b) plato, (c) maksimum nokta deneysel alanın dışarısında, (d) minimum ve (e) eğri yüzey (Bezerra ve ark 2008). 95

Şekil 5. 14. Etkilerin normal dağılım grafiği 97

Şekil 6. 1. EVOO, OODD ve RAY numunelerinin Ultraviyole-görünür alan spektrumları 104

Şekil 6. 2. EVOO, OODD ve RAY numunelerinin Ultraviyole-görünür alan spektrumları 105

Şekil 6. 3. OODD numunesinin yağ asit kompozisyonu kromatogramı 107

Şekil 6. 4. OODD (Kırmızı)-RSY (Mavi) (a) ve OODD (Kırmızı)-EVOO (Mavi) (b) numunelerinin TG kromatogramları 109

Şekil 6. 5. OODD (kırmızı), EVOO (mavi) ve FFA (Yeşil) numunelerinin apolar fraksiyon kromatogramları (PTGs: Politrigliseritler, TGs: Trigliseritler, DGs: Digliseritler, MGs: Monogliseritler, FFA: Serbest yağ asitleri) 110

Şekil 6. 6. OODD numunesinin apolar fraksiyon kromatogramı 111

Şekil 6. 7. OODD (kırmızı) ve EVOO (mavi) numunelerinin polar fraksiyon kromatogramları (Oks. PTGs: Oksidatif poliTG'ler, Oks. TGs: Oksidatif TG'ler, Oks. DGs: Oksidatif digliseritler, Oks. MGs: Oksidatif monogliseritler) 112

Şekil 6. 8. OODD (mavi) ve HPY (kırmızı) numunelerinin polimerik madde kromatogramları 112

Şekil 6. 9. OODD numunesinin polimerik madde kromatogramı 113

Şekil 6. 10. Alfa, beta, gama ve sigma tokoferol içeren 10, 25, 50, 75 ve 100 mg/L'lik kalibrasyon standartlarının kromatogramı (α-T: α-tokoferol, β-T: β-tokoferol, γ-T: γ-tokoferol, δ-T: δ-tokoferol) 114

Şekil 6. 11. OODD numunesinin tokoferol miktarının tespitinde kullanılan kalibrasyon grafikleri 115

Şekil 6. 12. OODD numunesinin tokoferol türlerine ait kromatogramı 115

Şekil 6. 13. HPY (kırmızı) ve OODD (mavi) numunelerinin tokotrienol türlerine ait kromatogramı (α-T3: Alfa tokotrienol, β-T3: Beta tokotrienol, γ-T3: Gama tokotrienol, δ -T3: Sigma tokotrienol) 117

Şekil 6. 14. OODD numunesinin sterol türlerine ait kromatogramı 117

Şekil 6. 15. Kampesterol, β-sitosterol ve stigmasterol içeren 5, 10, 25, 50, 75, 100, 125 mg/L'lik kalibrasyon standartlarının kromatogramı 118

Şekil 6. 16. OODD numunesinin sterol miktarının tespitinde kullanılan kalibrasyon grafikleri 119

Şekil 6. 17. OODD numunesinin sterol türlerine ait kromatogramı 119

Şekil 6. 18. Numune, kampesterol, beta-sitosterol ve stigmasterol karışımlarından oluşan standart ekleme çözeltilerinin kromatogramı 121

Şekil 6. 19. OODD numunesinin sterol miktarının tespitinde kullanılan standart ekleme grafikleri 122

Şekil 6. 20. Skualen içeren 10, 100, 250, 500, 750 ve 1000 mg/L'lik kalibrasyon standartlarının kromatogramı 125

Şekil 6. 21. OODD numunesinin skualen miktarının tespitinde kullanılan kalibrasyon grafiği, R^2: 0.99836 125

Şekil 6. 22. OODD numunesinin skualen türüne ait kromatogramı 126

Şekil 6. 23. Numune ve skualen karışımlarından oluşan standart ekleme çözeltilerinin kromatogramı 127

Şekil 6. 24. OODD numunesinin skualen miktarının tespitinde kullanılan standart ekleme grafiği 127

Şekil 6. 25. Kalibrasyon standartlarının ve OODD numunesinin SB-ATR-FT-IR spektrumları 133

Şekil 6. 26. Standart titrimetrik metottan elde edilen FFA değerleri ve SB-ATR-FT-IR metodundan elde edilen FFA değerlerinin karşılaştırılmasıyla oluşturulan kalibrasyon grafiği 134

Şekil 6. 27. Kalibrasyon standartlarının ve OODD numunesinin FT-NIR spektrumları 135

Şekil 6. 28. Standart titrimetrik metottan elde edilen FFA değerleri ve FT-NIR metodundan elde edilen FFA değerlerinin karşılaştırılmasıyla oluşturulan kalibrasyon grafiği 136

Şekil 6. 29. Kalibrasyon standartlarının ve OODD numunesinin SB-ATR-FT-IR spektrumları 138

Şekil 6. 30. Standart titrimetrik metottan elde edilen IV değerleri ve SB-ATR-FT-IR metodundan elde edilen IV değerlerinin karşılaştırılmasıyla oluşturulan kalibrasyon grafiği 138

Şekil 6. 31. Kalibrasyon standartlarının ve OODD numunesinin FT-NIR spektrumları 140

Şekil 6. 32. Standart titrimetrik metottan elde edilen IV değerleri ve FT-NIR metodundan elde edilen IV değerlerinin karşılaştırılmasıyla oluşturulan kalibrasyon grafiği.. 140

Şekil 6. 33. 10 farklı EVOO numunesinin yansıma (a) ve transmisyon (b) modlarındaki FT-IR spektrumlarından elde edilen ortalama spektrumlar..... 142

Şekil 6. 34. 19 kalibrasyon standardının seçilen bir bölgesinin transmisyon modunda alınan normal (a) ve birinci dereceden türevi (b) 143

Şekil 6. 35. Kalibrasyon standartlarının FFA konsantrasyonları ile seçilen spektral bölgede ölçülen FFA değerlerinin grafiği 144

Şekil 6. 36. SB-ATR-FT-IR tekniği ile EVOO sınıflandırmasına ait dendrogram..... 146

Şekil 6. 37. Transmisyon-FT-IR tekniği ile EVOO sınıflandırmasına ait dendrogram 147

Şekil 6. 38. FT-NIR tekniği ile EVOO sınıflandırmasına ait dendrogram..... 148

Şekil 6. 39. FT-NIR tekniği ile EVOO sınıflandırmasına ait benzerlik haritası..... 149

Şekil 6. 40. Taşınabilir ATR-IR tekniği ile EVOO sınıflandırmasına ait dendrogram 149

Şekil 6. 41. Taşınabilir raman tekniği ile EVOO sınıflandırmasına ait dendrogram ... 150

Şekil 6. 42. MA1 metodun göre analiz edilen RSY'nın kromatogramı 153

Şekil 6. 43. MA1 metodun göre analiz edilen OODD numunesinin kromatogramı.... 154

Şekil 6. 44. MA1 metodun göre analiz edilen OODD numunesinin kromatogramının 0-12 dk aralığı..... 156

Şekil 6. 45. MA1 metodun göre analiz edilen (%50 OODD + %50 HPY) numunesinin kromatogramı..... 157

Şekil 6. 46. MA1 metodun göre analiz edilen (%50 OODD + %50 HPY) numunesinin kromatogramının 0-12 dk aralığı 159

Şekil 6. 47. MA1 metodun göre analiz edilen OODDS numunesinin kromatogramı.. 161

Şekil 6. 48. MA1 metodun göre analiz edilen HPYS numunesinin kromatogramı 162

Şekil 6. 49. MA1 metodun göre analiz edilen OODDS (Mavi) ve HPYS (Kırmızı) numunelerinin kromatogramları 164

Şekil 6. 50. MA1 metodun göre analiz edilen OODDS (Mavi), HPYS (Kırmızı) ve S(%50 OODD + %50 HPY) (Yeşil) numunesinin kromatogramı 165

Şekil 6. 51. MA2 metodu için uygun dalga boyunun seçiminde kullanılan 3D spektrumlar (a: Pik şiddeti ve zaman eksenleriyle, b: Pik şiddeti, zaman ve dalga boyu eksenleriyle)..... 167

Şekil 6. 52. MA2 metodu için yapılan 1. ön denemede elde edilen kromatogram 168

Şekil 6. 53. MA2 metodu için yapılan 2. ön denemede elde edilen sterol türlerine ait kromatogram 169

Şekil 6. 54. MA2 metodu için yapılan 3. ön denemede elde edilen sterol türlerine ait kromatogram 170

Şekil 6. 55. MA2 metodu için yapılan 4. ön denemede elde edilen sterol türlerine ait kromatogram 171

Şekil 6. 56. Sterol türlerinin ayrımında hareketli fazın polarite ve akış hızı parametrelerinin optimizasyonu için oluşturulan yüzey grafiği 174

Şekil 6. 57. Sterol türlerinin ayrımında hareketli fazın polarite ve kolon fırını sıcaklığı parametrelerinin optimizasyonu için oluşturulan yüzey grafiği 175

Şekil 6. 58. Sterol türlerinin ayrımında hareketli fazın akış hızı ve kolon fırını sıcaklığı parametrelerinin optimizasyonu için oluşturulan yüzey grafiği 176

Şekil 6. 59. Sterol türlerinin ayrımında kullanılan deneysel tasarımların cevap değerine olan tesirini gösteren normal dağılım grafiği 177

Şekil 6. 60. Sterol türlerinin monolitik kolon kullanılarak optimum şartlarda gerçekleştirilen analizinin kromatogramı 179

Şekil 6. 61. Tokotrienol türlerinin ayrımında hareketli fazın polarite ve akış hızı parametrelerinin optimizasyonu için oluşturulan yüzey grafiği 182

Şekil 6. 62. Tokotrienol türlerinin ayrımında hareketli fazın polarite ve kolon fırını sıcaklığı parametrelerinin optimizasyonu için oluşturulan yüzey grafiği 183

Şekil 6. 63. Tokotrienol türlerinin ayrımında hareketli fazın akış hızı ve kolon fırını sıcaklığı parametrelerinin optimizasyonu için oluşturulan yüzey grafiği 184

Şekil 6. 64. Tokotrienol türlerinin ayrımında kullanılan deneysel tasarımların cevap değerine olan tesirini gösteren normal dağılım grafiği 185

Şekil 6. 65. Tokotrienol türlerinin monolitik kolon kullanılarak optimum şartlarda gerçekleştirilen analizinin kromatogramı (δ-T3: Sigma tokotrienol, (β+γ)-T3: Beta+gama tokotrienol, α-T3: Alfa tokotrienol) 187

Şekil 6. 66. Tokoferol türlerinin ayrımında hareketli fazın polarite ve akış hızı parametrelerinin optimizasyonu için oluşturulan yüzey grafiği 190

Şekil 6. 67. Tokoferol türlerinin ayrımında hareketli fazın polarite ve kolon fırını sıcaklığı parametrelerinin optimizasyonu için oluşturulan yüzey grafiği 191

Şekil 6. 68. Tokoferol türlerinin ayrımında hareketli fazın akış hızı ve kolon fırını sıcaklığı parametrelerinin optimizasyonu için oluşturulan yüzey grafiği 192

Şekil 6. 69. Tokoferol türlerinin ayrımında kullanılan deneysel tasarımların cevap değerine olan tesirini gösteren normal dağılım grafiği 193

Şekil 6. 70. Tokoferol türlerinin monolitik kolon kullanılarak optimum şartlarda gerçekleştirilen analizinin kromatogramı (δ-T: δ-tokoferol, (β+γ)-T: (β+γ)-tokoferol, α-T: α-tokoferol) 195

Şekil 6. 71. Sterol (a), tokotrienol (b) ve tokoferol (c) türlerinin ayrımında monolitik kolondan (Merck Chromolith Performance RP-18 100mmx4.6mm) ve geleneksel dolgulu kolondan (ACE Excel 5 Super C18 4.6x250mm 2µm) elde edilen basınç değerlerinin karşılaştırma grafiği 198

Şekil 6. 72. Sterol, tokotrienol, tokoferol ve skualen türlerinin monolitik kolonla ayrımı için 1. gradient uygulaması kromatogramı 201

Şekil 6. 73. Sterol, tokotrienol, tokoferol ve skualen türlerinin monolitik kolonla ayrımı için 2. gradient uygulaması kromatogramı 203

Şekil 6. 74. Sterol, tokotrienol, tokoferol ve skualen türlerinin monolitik kolonla ayrımı için 2. gradient uygulamasından elde edilen baseline düzeltilmiş kromatogramı 205

Şekil 6. 75. MA2 metodunun optimum kromatografik şartlarında yapılan analizin hareketli faz polaritesinin zamanla değişimi 206

Şekil 6. 76. MA2 metodunun kalibrasyonu için hazırlanan standart karışımların toplu kromatogramı 208

Şekil 6. 77. MA2 metodunun kalibrasyonu için hazırlanan standart karışımların sterol bölgesinde verdiği pikler ve kalibrasyon grafikleri 209

Şekil 6. 78. MA2 metodunun kalibrasyonu için hazırlanan standart karışımların tokotrienol bölgesinde verdiği pikler ve kalibrasyon grafikleri 211

Şekil 6. 79. MA2 metodunun kalibrasyonu için hazırlanan standart karışımların tokoferol bölgesinde verdiği pikler ve kalibrasyon grafikleri 212

Şekil 6. 80. MA2 metodunun kalibrasyonu için hazırlanan standart karışımların skualen bölgesinde verdiği pikler ve kalibrasyon grafikleri 213

Şekil 6. 81. MA2 metoduna göre analizi gerçekleştirilen OODDS numunesinin kromatogramı 216

Şekil 6. 82. MA2 metodun göre analiz edilen OODD numunesinin kromatogramı 220

Şekil 6. 83. MA2 metodun göre analiz edilen (%50 OODD + %50 HPY) numunesinin kromatogramı 221

Şekil 6. 84. MA2 metodun göre analiz edilen HPYS numunesinin kromatogramı 222

Şekil 6. 85. MA2 metodun göre analiz edilen OODDS (Mavi) ve HPYS (Kırmızı) numunelerinin kromatogramları 223

Şekil 6. 86. MA2 metodun göre analiz edilen OODDS (Mavi), HPYS (Kırmızı) ve S(%50 OODD + %50 HPY) (Yeşil) numunelerinin kromatogramları 225

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2. 1. Bazı ülkelerin ve grupların 2010-2016 yılları arasındaki hasatlarda ürettiği zeytinyağı miktarları (Bin Ton) (Zeytinyağı 2015) 7

Çizelge 2. 2. Zeytinyağında ağırlıkla bulunan TG'lerin bileşimi ve yüzdeleri (Boskou 2006) 9

Çizelge 2. 3. Gaz kromatografisi ile elde edilmiş zeytinyağı yağ asidi kompozisyonları (Boskou 2006) 11

Çizelge 2. 4. Bazı çalışmalardan elde edilmiş zeytinyağı toplam tokoferol miktarları.. 13

Çizelge 2. 5. Farklı Uluslararası Organizasyonlar tarafından zeytinyağlarının sınıflandırılması (Boskou 2006) 18

Çizelge 2. 6. Farklı Uluslararası Organizasyonlar tarafından kullanılan zeytinyağı kalite parametreleri 19

Çizelge 2. 7. Bazı yağlara ait DD'ların kimyasal bileşenleri (Verleyen ve ark 2001) ... 27

Çizelge 3. 1. Farklı uzunluklardaki monolitik kolonların geri basınçları (Merck 2010) 36

Çizelge 4. 1. İlgili çalışmada kullanılan OODD'ının kimyasal bileşimi (Bondioli ve ark 1993) 39

Çizelge 4. 2. İlgili çalışmada kullanılan OODD'nın kimyasal bileşimi (Abdalla 1999) 40

Çizelge 4. 3. İlgili çalışmada kızartma işlemi sonucu OODD'nın sabunlaşmayan madde kısmının ayçiçek yağının kimyasal ve fiziksel özellikleri üzerine olan etkileri (Abdalla 1999) 41

Çizelge 4. 4. İlgili çalışmada kullanılan OODD'nın kimyasal bileşimi (Gutiérrez ve ark 2014) 43

Çizelge 4. 5. İlgili çalışmada kullanılan OODD'nın kimyasal bileşimi (Rocha ve ark 2014) 44

Çizelge 4. 6. İlgili çalışmada C18 silika monolitik kolonlar ile RP kromatografi şartlarında yapılmış olan ayrımlar (Jandera 2013)..... 46

Çizelge 5. 1. Kullanılan Kimyasallar ve Çözücüler 49

Çizelge 5. 2. Kullanılan enstrümental Cihazlar..... 51

Çizelge 5. 3. Kullanılan Numuneler 51

Çizelge 5. 4. Yağ asit kompozisyonu tayini kromatografik şartları (Kara 2008) 59

Çizelge 5. 5. TG kompozisyonu tayini kromatografik şartları (AOCS 2017) 60

Çizelge 5. 6. Polar ve apolar madde tayini kromatografik şartları (Dobarganes ve ark 2000) 62

Çizelge 5. 7. Tokoferol-tokotrienol tayini kromatografik şartları (Agilent 2016) 64

Çizelge 5. 8. Sterol tayini GC-MS kromatografik şartları (COI 2010) 66

Çizelge 5. 9. Sterol tayini GC-FID kromatografik şartları (COI 2010) 67

Çizelge 5. 10. Sterol tayini kromatografik şartları (Holen 1985)..... 68

Çizelge 5. 11. Skualen tayini kromatografik şartları (Agilent 2016) 72

Çizelge 5. 12. ELOO (%0.30 FFA) ve saf oleik asit (%100 FFA) kullanılarak hazırlanan kalibrasyon standartları 76

Çizelge 5. 13. Mısır yağı (120.00 IV) ve hindistan cevizi yağı (10.00 IV) kullanılarak hazırlanan kalibrasyon standartları 79

Çizelge 5. 14. ELOO (%0.00 FFA) ve saf oleik asit (%100 FFA) kullanılarak hazırlanan kalibrasyon standartları 81

Çizelge 5. 15. Monolitik kolon kullanılarak geliştirilen kromatografik metotların sabit parametreleri 87

Çizelge 5. 16. MA1 metoduna ait kromatografik şartlar 87

Çizelge 5. 17. Sterol türlerinin tayini için optimizasyonu yapılacak olan parametreler ve kodlanmış seviye değerleri 89

Çizelge 5. 18. Sterol türlerinin tayini için kullanılan deneysel tasarım ve her bir deneyde parametrelerin sahip olduğu seviye kodları..... 90

Çizelge 5. 19. Sterol türlerinin tayini için kullanılan deneysel tasarımın düzenlenmiş analiz sırası 91

Çizelge 5. 20. Sterol türlerinin tayini için kullanılan deneysel tasarımın gerçek parametre değerleri..... 92

Çizelge 5. 21. Tokotrienol türlerinin tayini için optimizasyonu yapılacak olan parametreler ve kodlanmış seviye değerleri 98

Çizelge 5. 22. Tokotrienol türlerinin tayini için kullanılan deneysel tasarımın gerçek parametre değerleri ve düzenlenmiş analiz sırası 98

Çizelge 5. 23. Tokoferol türlerinin tayini için optimizasyonu yapılacak olan parametreler ve kodlanmış seviye değerleri 100

Çizelge 5. 24. Tokoferol türlerinin tayini için kullanılan deneysel tasarımın gerçek parametre değerleri ve düzenlenmiş analiz sırası 100

Çizelge 6. 1. EVOO, OODD ve RAY numunelerinin As_{232} ve As_{272} indeks değerleri 104

Çizelge 6. 2. EVOO, OODD ve RAY numunelerinin AV ve TV değerleri..... 106

Çizelge 6. 3. OODD ve EVOO numunelerinin yağ asidi kompozisyonu 108

Çizelge 6. 4. OODD numunesinin apolar fraksiyonlarının yüzdeleri 111

Çizelge 6. 5. OODD numunesinin polimerik madde yüzdeleri 113

Çizelge 6. 6. OODD numunesinin tokoferol miktarları 116

Çizelge 6. 7. OODD numunesinin sterol miktarları..... 117

Çizelge 6. 8. OODD numunesinin sterol miktarları..... 120

Çizelge 6. 9. OODD numunesinin GC'den ve en küçük kareler metodu kullanılan sıvı kromatografisinden elde edilen sterol sonuçları..... 120

Çizelge 6. 10. OODD numunesinin sterol miktarları 122

Çizelge 6. 11. OODD numunesinin GC'den ve standart ekleme metodu kullanılan sıvı kromatografisinden elde edilen sterol sonuçları 123

Çizelge 6. 12. OODD numunesinin en küçük kareler ve standart ekleme metodu kullanılan sıvı kromatografisinden elde edilen sterol sonuçları 124

Çizelge 6. 13. OODD numunesinin skualen miktarı 126

Çizelge 6. 14. OODD numunesinin skualen miktarı 127

Çizelge 6. 15. OODD numunesinin en küçük kareler ve standart ekleme metodu kullanılan sıvı kromatografisinden elde edilen skualen sonuçları 128

Çizelge 6. 16. OODD numunesinin uluslararası standart metotlar kullanılarak tespit edilen kimyasal bileşimi ve karşılaştırılması 129

Çizelge 6. 17. ELOO (%0.30 FFA) ve saf oleik asit (%100 FFA) kullanılarak hazırlanan kalibrasyon standartları 133

Çizelge 6. 18. OODD numunesinin standart titrimetrik metot ve SB-ATR-FT-IR metoduyla bulunan FFA değerleri 135

Çizelge 6. 19. OODD numunesinin standart titrimetrik metot ve FT-NIR metoduyla bulunan FFA değerleri 136

Çizelge 6. 20. Hindistan cevizi yağı (10.00 IV) ve mısır yağı (120.00 IV) kullanılarak hazırlanan kalibrasyon standartları 137

Çizelge 6. 21. OODD numunesinin standart titrimetrik metot ve SB-ATR-FT-IR metoduyla bulunan IV değerleri 139

Çizelge 6. 22. OODD numunesinin standart titrimetrik metot ve FT-NIR metoduyla bulunan IV değerleri 141

Çizelge 6. 23. 10 farklı EVOO numunesinden elde edilen ortalama spektrumların ortak bantları 142

Çizelge 6. 24. Her iki absorpsiyon modunda seçilmiş spektral bölgelerin normal ve birinci dereceden türevleri kullanılarak elde edilmiş 12 tane çok değişkenli kalibrasyon modeli 144

Çizelge 6. 25. 10 farklı EVOO'nın standart titrimetrik metotla ve geliştirilen FT-IR PLS kalibrasyon metodu ile elde edilen üç tekrarlı FFA yüzdeleri 145

Çizelge 6. 26. MA2 metodu için uygun dalga boyunun seçiminde kullanılan kromatografik şartlar 166

Çizelge 6. 27. MA2 metodu için yapılan 1. ön denemede kullanılan kromatografik şartlar 168

Çizelge 6. 28. MA2 metodu için yapılan 2. ön denemede kullanılan kromatografik şartlar 169

Çizelge 6. 29. MA2 metodu için yapılan 3. ön denemede kullanılan kromatografik şartlar 170

Çizelge 6. 30. MA2 metodu için yapılan 4. ön denemede kullanılan kromatografik şartlar 171

Çizelge 6. 31. Sterol türlerinin kromatografik ayrım parametrelerinin tayini için kullanılacak olan yüzey grafiklerinin elde edilmesinde kullanılan bağımsız değişkenlerin seviyeleri ve elde edilen cevap değerleri 173

Çizelge 6. 32. Sterol türlerinin monolitik kolonla ayrımı için tespit edilen optimum kromatografik şartlar 178

Çizelge 6. 33. Tokotrienol türlerinin kromatografik ayrım parametrelerinin tayini için kullanılacak olan yüzey grafiklerinin elde edilmesinde kullanılan bağımsız değişkenlerin seviyeleri ve elde edilen cevap değerleri 181

Çizelge 6. 34. Tokotrienol türlerinin monolitik kolonla ayrımı için tespit edilen optimum kromatografik şartlar 186

Çizelge 6. 35. Tokoferol türlerinin kromatografik ayrım parametrelerinin tayini için kullanılacak olan yüzey grafiklerinin elde edilmesinde kullanılan bağımsız değişkenlerin seviyeleri ve elde edilen cevap değerleri 189

Çizelge 6. 36. Tokoferol türlerinin monolitik kolonla ayrımı için tespit edilen optimum kromatografik şartlar 194

Çizelge 6. 37. Biyoaktif türlerinin monolitik kolon ile ayrımı için gerçekleştirilen deneysel tasarımdan ve aynı şartlarda geleneksel dolgulu bir kolondan elde edilen kolon geri basınçları 197

Çizelge 6. 38. Sterol, tokotrienol, tokoferol ve skualen türlerinin monolitik kolonla ayrımı için tespit edilmiş optimum kromatorafik şartlar 199

Çizelge 6. 39. Sterol, tokotrienol, tokoferol ve skualen türlerinin monolitik kolonla ayrımı için tespit edilmiş optimum kromatorafik şartlar ve 1. gradient uygulaması 200

Çizelge 6. 40. Sterol, tokotrienol, tokoferol ve skualen türlerinin monolitik kolonla ayrımı için tespit edilmiş optimum kromatorafik şartlar ve 2. gradient uygulaması 202

Çizelge 6. 41. MA2 metodunun kalibrasyonu için hazırlanan kalibrasyon standartları 207

Çizelge 6. 42. MA2 metodu ile tüm biyoaktif türler için elde edilen kalibrasyon grafiklerinin verileri 214

Çizelge 6. 43. OODD numunesinin biyoaktif türlerinin MA2 metoduyla elde edilen miktarları 215

Çizelge 6. 44. OODD numunesinin standart ve MA2 metoduyla elde edilen toplam sterol miktarlarının karşılaştırılması 217

Çizelge 6. 45. OODD numunesinin toplam sterol miktarının MA2 metoduyla tayininden elde edilen istatistiksel veriler 217

Çizelge 6. 46. OODD numunesinin standart ve MA2 metoduyla elde edilen toplam tokoferol miktarlarının karşılaştırılması 218

Çizelge 6. 47. OODD numunesinin toplam tokoferol miktarının MA2 metoduyla tayininden elde edilen istatistiksel veriler 218

Çizelge 6. 48. OODD numunesinin standart ve MA2 metoduyla elde edilen skualen miktarlarının karşılaştırılması 218

Çizelge 6. 49. OODD numunesinin skualen miktarının MA2 metoduyla tayininden elde edilen istatistiksel veriler 219

Çizelge 6. 50. OODD numunesinin uluslararası standart metotlar kullanılarak tespit edilen kimyasal bileşimi ve karşılaştırılması..... 229

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

%	: Yüzde
^{o}C	: Santigrat derece
Δ	: Delta
α	: Alfa
β	: Beta
γ	: Gama
δ	: Sigma
μ	: Mikro
μL	: Mikro litre
μm	: Mikro metre
A	: Hareketli fazın polarite sabiti
As_{232}	: 232 nm'deki absorbans
As_{270}	: 270 nm'deki absorbans
B	: Hareketli fazın akış hızı sabiti
C	: Kolon fırını sıcaklığı sabiti
cm^{-1}	: Dalga boyu
cv	: Varyasyon katsayısı
g	: Gram
kg	: Kilo gram
mg	: Mili gram
mm	: Mili metre
nm	: Nano metre
P	: İhtimaliyet
P'	: Polarite
R^2	: Korelasyon katsayısı
R_s	: Ayırma gücü katsayısı
s^2	: Varyans
T	: T testi
T_d	: Kritik T değeri
w	: Yayılım
Y	: Cevap değeri sabiti

Kısaltmalar

3D	: Üç boyutlu
ABD	: Amerika birleşik devletleri
ANN	: Yapay sinirsel ağ
AOAC	: Resmi analitik kimya derneği
AOCS	: Amerikan yağ kimyacıları derneği
AV	: Anisidin sayısı
ATR	: Zayıflatılmış toplam yansıma
BSTFA	: Bis(trimetilsilil)trifloroasetamit
CAC	: Codex Alimentarius Komisyonu
COI	: Uluslararası Zeytinyağı Komitesi
CVA	: Kanonik değişken analizi
DA	: Diskriminant analizi
DAD	: Diodarray dedektör
DD	: Deoderize distilat
DG	: Digliserit
DGs	: Digliseritler
dk	: Dakika
EC	: Avrupa komisyonu
ELOO	: Ekstra hafif rafine zeytinyağı
EVOO	: Natürel sızma zeytinyağı
FAME	: Yağ asidi metil esteri
FFA	: Serbest yağ asidi
FID	: Alev iyonlaşma dedektörü
FLD	: Floresans dedektörü
FT	: Fourier dönüşüm
GC	: Gaz kromatografisi
HCA	: Hiyerarşik bulut analizi
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
HPSEC	: Yüksek performanslı boyut eleme kromatografisi
HPY	: Ham palm yağı
HPYS	: Sabunlaştırılmış ham palm yağı
IR	: İnfrared
IUPAC	: Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
IV	: İyot sayısı
L	: Linoleik asit
LDA	: Lineer diskriminant analizi
Ln	: Linolenik asit
LOD	: Tespit limiti
LOQ	: Tayin limiti
MA1	: Monolitik ayırma1
MA2	: Monolitik ayırma2
mAU	: Mili absorbans birim
MG	: Monogliserit
MGs	: Monogliseritler
MIR	: Orta infrared
min	: Minute
No	: Numara
NP	: Normal faz

NIR	: Yakın İnfrared
O	: Oleik asit
Oks. DGs	: Oksidatif digliseritler
Oks. MGs	: Oksidatif monogliseritler
Oks. PTGs	: Oksidatif polimerik trigliseritler
Oks. TGs	: Oksidatif trigliseritler
OODD	: Zeytinyağı deoderize distilatı
OODDS	: Sabunlaştırılmış zeytinyağı deoderize distilatı
P	: Palmitik asit
PCA	: Temel bileşen analizi
PLS	: Kısmi en küçük kareler metodu
PCR	: Temel bileşen regresyonu
PTFE	: Politetrafloroetilen
PV	: Peroksit sayısı
RAY	: Rafine Ayçiçek yağı
RID	: Kırılma indisi dedektörü
RMSEC	: Kalibrasyonun ortalama karekök hatası
RMSECV	: Çapraz validasyonun ortalama karekök hatası
RMSEP	: Tahmin kapasitesinin ortalama karekök hata değeri
RSD	: Bağıl standart sapma
RSM	: Yüzey grafiği
RSY	: Rafine soya yağı
SB	: Tekli
SD	: Standart sapma
SIMCA	: Hafif bağımsız sınıf analiz modelleme
St	: Stearik asit
T	: Tokoferol
T3	: Tokotrienol
te	: Tespit edilemedi
TG	: Trigliserit
TGs	: Trigliseritler
THF	: Tetrahidrofuran
TV	: Totoks değeri
UV-VIS	: Ultra viyole-görünür alan

1. GİRİŞ

Dünyada ve Ülkemizde her yıl milyonlarca ton ham yağ içerdiği safsızlıkların uzaklaştırılması amacıyla rafine edilmektedir. Ülkemizde ise senede 1.500.000 ton ham yağ, rafinasyon işlemine tabi tutulmakta ve bu proseste büyük miktarlarda önemli yan ürünler elde edilmektedir. Birçok biyoaktif bileşenin yağdan uzaklaşıp distilata geçtiği deoderizasyon kademesinde yağın %1'i kadar deoderize distilat oluşmaktadır. Başta küçük gibi görünen bu oranın, yılda rafine edilen yağ miktarı dikkate alındığında (15.000 ton) önemi anlaşılmaktadır.

Zeytinyağı üretiminde lider ülkeler arasında olan ülkemizde direkt kullanımı uygun olmayan milyonlarca ton zeytinyağı fiziksel ya da kimyasal rafinasyon yöntemleriyle kullanıma uygun hale getirilmektedir. Bu işlemler esnasında birçok kademede önemli yan ürünler oluşmaktadır. Bunlardan en önemlisi ve en büyük katma değere sahip olanı, deoderizasyon kademesinde meydana gelen deoderize distilattır. Yağa koku, tat-aroma, asitlik ve renk veren maddelerin uzaklaştırıldığı bu aşamada, ulaşılan yüksek sıcaklıklar sebebiyle, zeytinyağında yüksek miktarlarda bulunan başta tokoferol, sterol ve skualen v.b., maddeler olmak üzere doğal antioksidan özelliğine sahip ve yağda bulunması istenen çeşitli biyoaktif bileşenler yağdan uzaklaşıp distilata geçmekte ve atık olarak değerlendirilmektedir. İlgili biyoaktif bileşenlerin en önemlileri tokoferol türevleri (α-, β-, γ-, δ-), sterol türevleri (Birassikasterol, kampesterol, stigmasterol, sitosterol) ve skualendir. Yüksek katma değere sahip olan ve genellikle ithal edilen bu önemli biyoaktif bileşenlerin distilat içerisindeki türlerinin ve miktarlarının kolaylıkla belirlenebilmesi, bu maddelerin geri kazanılması ve değerli ürünlere dönüştürülmesi açısından ayrı bir öneme sahip olmaktadır.

Günümüzde ayırma metotlarının kullanıldığı alanlarda, özellikle biyokimya alanında yapılan ayırmalarda monolitik kolonlar sıklıkla öne çıkmaya başlamıştır. Yüksek akış hızlarında dahi düşük kolon basıncına sahip olması, tek bir birimden oluşması, kolon içerisinde sentezlenebilmesi, karışık matrislerde bulunan ve ayrılması hedeflenen biyomoleküller için doğal sensör özellikleri gösterebilmesi ve sahip oldukları gözenekli yapıları ile geleneksel kolonlara göre daha iyi ayrım özellikleri gösterebilmelerinden dolayı monolitik kolonlar, günümüzün gözde ayırma tekniklerinden biridir.

İnfrared spektrumu pek çok moleküler grup için karakteristik pikler vermektedir. Bu sayede spektrumu alınan maddede hangi karakteristik grupların olduğunu anlaşılmakta, dolayısıyla maddenin yapısının anlaşılması daha kolay olmaktadır. Ayrıca molekül yapısının değişmesi ile karakteristik grup piklerinin yerlerinin kayması da tayin ve tespit açısından önemli olmaktadır. Günümüzde geliştirilmiş olan yeni infrared teknikleri ile bilinmeyen maddelerin tespiti ya da bilinen türlerin miktarının ve yapısının incelenmesi bilimsel ve endüstriyel uygulamaların vazgeçilmez bir analiz metodu olmuştur. İncelenen numuneyi yok etmemesi, hemen hemen tüm biyolojik ve kimyasal türleri inceleyebilmesi, kolay ve hızlı olması sebebiyle infrared teknikleri günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Gerçekleştirilmiş olan bu doktora tezinin amacı; zeytinyağının rafinasyonu esnasında deoderizasyon kademesinde elde edilen deoderize distilatının, fiziksel ve kimyasal özelliklerinin titrimetrik, kromatografik ve infrared spektroskopik metotlarla incelenmesi ve yüksek sıcaklık ve düşük basınç gibi ağır şartlar sebebiyle yağdan uzaklaşarak deoderize distilata geçen, serbest yağ asitleri, tokoferol türleri, sterol türleri ve skualen gibi katma değeri yüksek ve insan sağlığı açısından son derece önemli biyoaktif bileşenleri, standart kromatografik metotlarla karşılaştırarak üstün ayırma özelliklerine sahip monolitik kolonlarla tayinlerini incelemektir.

2. ZEYTİNYAĞI VE RAFİNASYONU

2.1. Yağlar

Yağlar, çift karbon sayılı (4–24) doymuş veya doymamış yağ asitlerinin gliserinle verdiği triesterlerdir. Saf yağın bileşiminde C, H ve O elementleri bulunmaktadır. Bu bileşikler suda çözünmediği halde pek çok organik çözücüde çözünürler ve sudan daha düşük yoğunluğa sahiptirler.

Yağlar, karbonhidratlar ve proteinler gibi insan vücudu için çok önemli olan ve insanların beslenmesindeki en temel ihtiyaç maddelerinden biridir (Demirci 2005). Özellikle doymuş yağ oranlarının düşük olması, hücre yapısı için gerekli olan yağ asitlerini içermesi ve insan vücudunda A, D, E, K gibi yağda çözünen vitaminleri çözmesi gibi özellikleri ile bitkisel yağlar, insan sağlığına katkıları ve yüksek besin değerine sahip olmaları bakımından ayrı bir yere sahiptir (Gadoth 2008).

Yağlar; insanların sağlıklı beslenmesi, çocukların gelişimi, yaşlanma, fizyolojik tüm faaliyetlerin normal seyretmesi, hastalıklardan korunma ve tedavilerin başarılı olması gibi hayati konularda en önemli unsurların başında gelmektedir. Sağlıklı beslenmenin temeli, kabaca beş önemli madde grubunun vücuda yeterli, uygun ve yüksek kalitede alınmasına dayanır. Bunlar; proteinler, yağlar, karbonhidratlar (şekerler), vitaminler ve minerallerdir (Ayyıldız 2010).

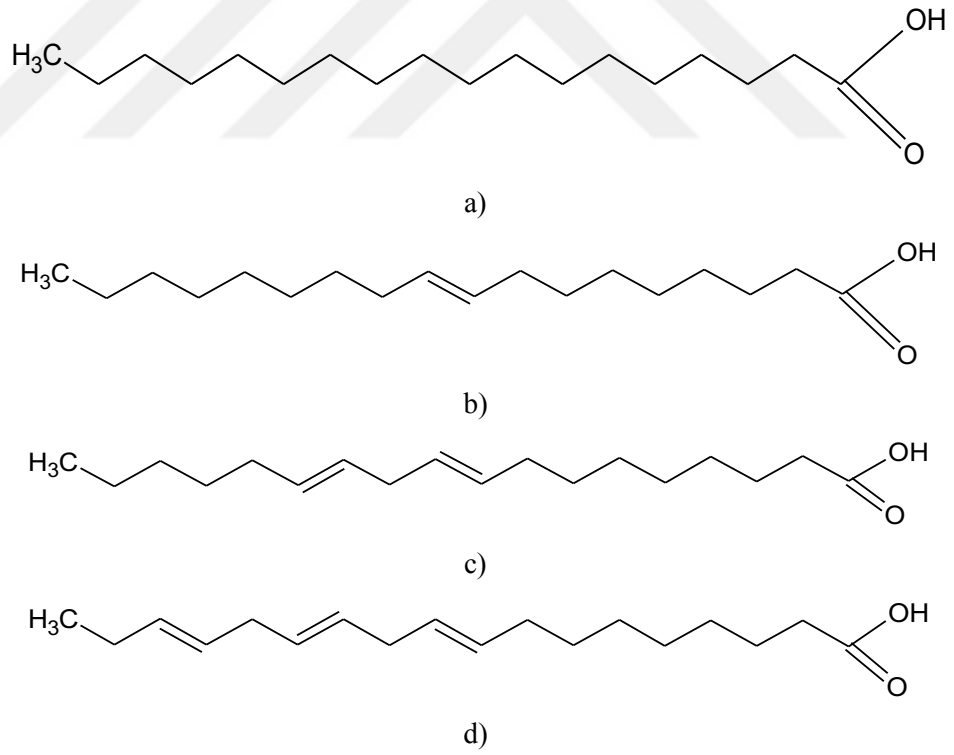
Kimyasal olarak yağ asitlerinin trigliserit (TG)'leri olarak bilinen yağlar;

- Canlıların anatomik yapısının oluşum ve korunmasındaki önemli işlevlerinin yanı sıra, vücudun estetik görünümünü de etkilerler.
- Vücut sıcaklığının ve suyunun korunmasında, izolatör olarak görev alırlar.
- Vücuda alınmış fazla enerjiyi, gerektiğinde kullanılmak üzere depolarlar.
- Sindirilmeleri, diğer besin öğelerine kıyasla daha uzun sürdüğünden, canlılarda daha uzun süreli bir tokluk hissi yaratırlar.
- Yağda çözünen provitaminler ve vitaminlerin yanında, seksüel hormonların sentezlendiği steroitlere, enzimlere, antioksidan etkisi olan terpen, glikozit ve alkolit yapısındaki aktif maddelere, elementlere (iyot, mangan, demir, çinko, bakır, fosfor ve kalsiyum) bunların metaloitlerine taşıyıcılık görevi yaparlar.
- A, D, E, K gibi yağda çözünen vitaminleri içerirler (Bitkisel yağlar E vitamini ihtiyacının ¾ ünü karşılamaktadırlar).

- Ayrıca vücudumuzda sentezlenemeyen esansiyel yağ asitleri gibi elzem bileşikler için de en önemli kaynak durumundadırlar.
- Bilinen besin öğeleri içinde, içerdikleri yağ asitlerinin zincir uzunluğuna bağlı olarak, 9.1–9.7 (ortalama 9.3) kcal/g'lık enerjiye sahip olmaları nedeniyle, yakıldıklarında vücut ısısı için önemli bir enerji kaynağıdırlar.
- Ayrıca beslenme açısından iştah açıcı bir etkiye de sahiptirler, yemeklere lezzet ve tat kazandırırlar.

Sayılan tüm bu özellik ve işlevler dikkate alındığında, pek çok otorite ve araştırıcı tarafından da vurgulandığı gibi, yağların canlı yaşamındaki temel işlevleri, "Yağ tüketimi olmaksızın, insanın yaşamını sürdürmesi olanaksızdır." şeklinde vurgulanabilir (Kola 2015).

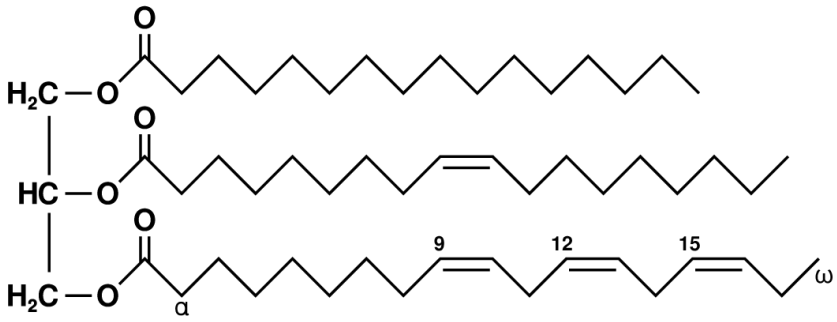
Tüm yenilebilir yağların bileşiminde yağ asitleri bulunur. Şekil 2.1.'de bazı temel yağ asitlerinin moleküler yapıları gösterilmiştir. Bu bakımdan yağların fiziksel ve kimyasal özelliklerini, bileşimlerindeki yağ asitleri belirler (Baydar 2000).



Şekil 2. 1. Yağların bileşiminde bulunan bazı yağ asitleri a) Stearik asit, b) Oleik asit, c) Linoleik asit, d) Linolenik asit (trans konumlarında verilmiştir)

İnsan beslenmesinde ve fizyolojik ihtiyaçların karşılanmasında yaşamsal önem taşıyan ve temel gıda maddeleri arasında ilk sıralarda yer alan yağlar, yağ asitleri ile

gliserinin esterleşmesi sonucu oluşurlar. Şekil 2.2.`de palmitik, oleik ve linolenik asitten oluşan bir trigliseridin yapısı görülmektedir.



Şekil 2. 2. Farklı yağ asitlerinden meydana gelmiş olan bir trigliserit molekülü

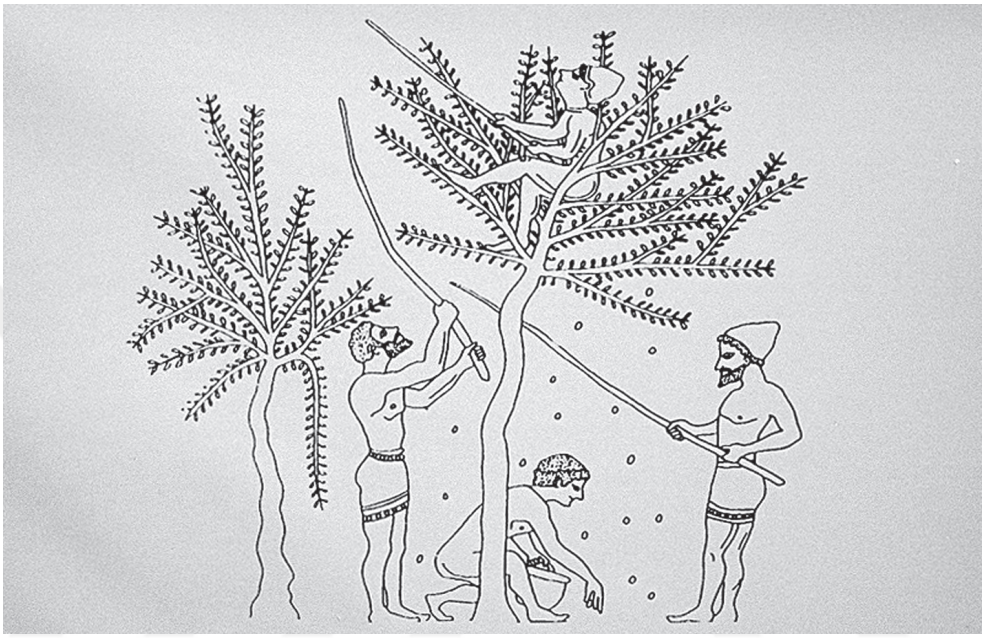
2.2. Zeytinyağı

Zeytin ağacı (*Olea europea L.*) yeşenşik çalılar ve zeytin ailesindeki *Olea* cinsi ağaçlarının yaklaşık 35 türü için ortak bir isimdir ve Akdeniz bölgesi için ayırt edici bir özelliktir. Suriye, Orta Asya, Etiyopya, Mısır veya Hindistan'da ortaya çıktığı düşünülmektedir. Antik çağlardan beri ekonomi ve sağlık alanında Akdeniz bölgesi insanlarına pratik ve sembolik anlamda faydalı olmuştur. Şekil 2.3'te, yaklaşık 50.000 yıl ile 60.000 yıl öncesine dayanan ve Yunanistan'daki Santorini adasında bulunan fosilleşmiş zeytin yaprağı izleri görülmektedir (Valavanis 2004).



Şekil 2. 3. Yunanistan'ın Santorini adasında bulunan 60.000 yaşındaki fosilleşmiş zeytin yaprakları (Valavanis 2004)

Zeytin ilk olarak Güney Asya ülkelerinde ortaya çıkmış ve göçmen kuşlar ile Orta Doğu üzerinden Akdeniz Bölgesine taşınmıştır. İspanyol göçmenler zeytini Latin Amerika'da Meksika, Arjantin ve Uruguay'a götürürken; İtalyanlar Avustralya'ya götürerek Dünya genelinde yaygınlaşmasını sağlamıştır. Şekil 2.4'de milattan önce 6. yüzyılda zeytin toplanmasını gösteren bir tablo verilmiştir.



Şekil 2. 4. Milattan önce 6. yüzyılda zeytin toplanmasını gösteren bir tablo (Valavanis 2004)

Günümüzde Girit, Peloponnese, Yunanistan'ın kıyı bölgelerinde çokça; Midilli, Lesbos, Samos, İyon ve Tasos gibi adaların tümünde bulunmaktadır. Ayrıca Türkiye kıyıları, Kıbrıs, Suriye, Lübnan, İsrail, İspanya'nın güneyi, Fransa, İtalya ve Kuzey Afrika sahilinde çokça zeytin ağacı ve bahçeleri bulunmaktadır. Farklı bir bitki örtüsü olması, başta zeytinyağı kullanımı olmak üzere bölgedeki insanların beslenme diyetine yön vermesi ve kendisi ve meyvesinin sahip olduğu sembolik önem sebebiyle zeytin bitkisi, Akdeniz Bölgesinde kendine has bir kültür oluşturmuştur (Boskou 2006).

Zeytin ağacının meyvesinin ortalama kimyasal kompozisyonu %50 su, %1.6 protein, %22 yağ, %19 karbonhidrat, %5.8 selüloz ve %1.5 mineralden (kül) oluşmaktadır. Diğer önemli bileşenleri ise, pektinler, organik asitler, pigmentler ve fenol glikositlerdir (Boskou 2006).

Zeytin meyvesi olgunlaşmasının ilk aşamasında yeşil renkte olmaktadır. Bu aşamada zeytin meyvesi ulaşabileceği en büyük boyutlara ulaşmaktadır. Daha sonra kabuktaki klorofil yerini antosiyaninlere bırakmaya başlar ve meyvenin rengi zamanla

lekeliden mora ve en sonunda nihai rengi olan siyah renge dönmektedir. Zeytin meyvesi, en yüksek fenolik bileşik içeriğine yeşilden mora renk değiştirdiği gelişim aralığında sahip olmaktadır (Boskou 2006).

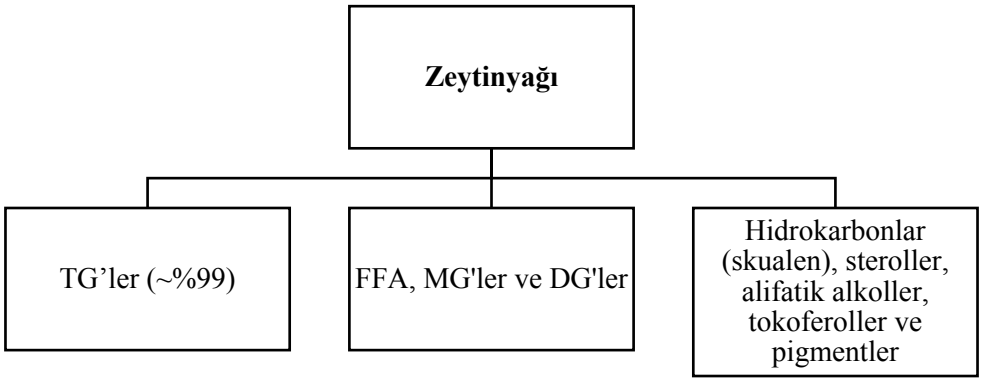
Zeytinyağı yenilebilir yağ pazarında her zaman önemli bir rol oynamış ve oynamaya devam etmektedir. Dünya yenilebilir bitkisel yağ pazarında %3.5'dan düşük bir paya sahip olmasına rağmen (Tio 1996), yemeklik zeytin ve zeytinyağı üretiminin %98'i Akdeniz ülkeleri tarafından karşılanmaktadır. Kendine özgü toprak yapısı ve iklim faktörleri sayesinde Akdeniz Bölgesi, kaliteli zeytinyağı ve yemeklik zeytin üretimi için gerekli şartları sağlayan yegane bölge olmaktadır (Boskou 2006). Tablo 2.1'de bazı ülkelerin ve grupların 2010-2016 yılları arasındaki hasatlarda ürettiği zeytinyağı miktarları verilmiştir.

Çizelge 2. 1. Bazı ülkelerin ve grupların 2010-2016 yılları arasındaki hasatlarda ürettiği zeytinyağı miktarları (Bin Ton) (Zeytinyağı 2015)

Ülkeler	2010-2011	2011-2012	2012-2013	2013-2014	2014-2015	2015-2016
İspanya	1391.9	1615.0	618.2	1781.5	829.0	1200.0
İtalya	440.0	399.2	415.5	463.7	302.5	350.0
Yunanistan	301.0	294.6	357.9	132.0	300.0	300.0
Portekiz	62.9	76.2	59.2	91.6	90.0	92.0
AB Ülkeleri Toplamı	2209.0	2395.1	1461.7	2485.0	1535.5	1960.5
Tunus	120.0	182.0	220.0	70.0	295.0	140.0
Suriye	180.0	198.0	175.0	180.0	50.0	215.0
Türkiye	160.0	191.0	201.0	135.0	160.0	143.0
Fas	130.0	120.0	100.0	120.0	120.0	130.0
Cezayir	67.0	39.5	66.0	44.0	44.0	73.5
Arjantin	20.0	32.0	17.0	30.0	6.0	25.0
Ürdün	27.0	19.5	21.5	19.0	35.0	39.0
Diğer Ülkeler Toplamı	785.0	851.5	859.5	652.0	758.0	861.0
Dünya Toplamı	3075.0	3321.1	2401.7	3205.5	2366.5	2909.5

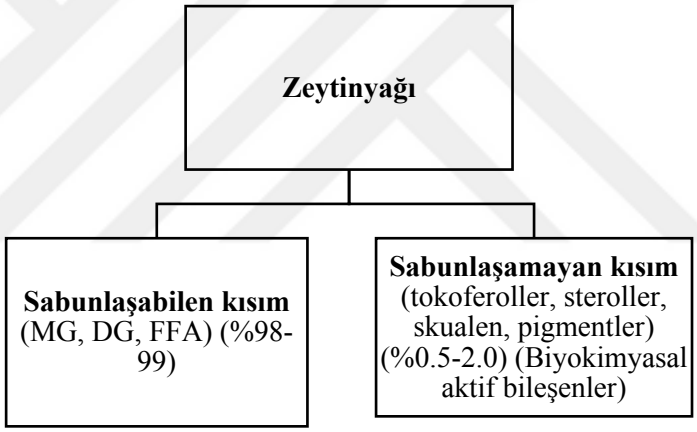
2.3. Zeytinyağının Bileşenleri

Zeytinyağının ana bileşeni yaklaşık %99'luk kısmını oluşturan TG'lerdir. Geriye kalan yaklaşık %1'lik kısım ise monogliserit (MG) ve digliserit (DG)'ler, serbest yağ asit (FFA)'leri, tokoferoller, steroller, hidrokarbon olarak başlıca skualen, alifatik alkoller ve renk pigmentlerinden oluşmaktadır. Zeytinyağının bileşenleri şematik olarak Şekil 2.5'de verilmiştir.



Şekil 2. 5. Zeytinyağının ana bileşenleri

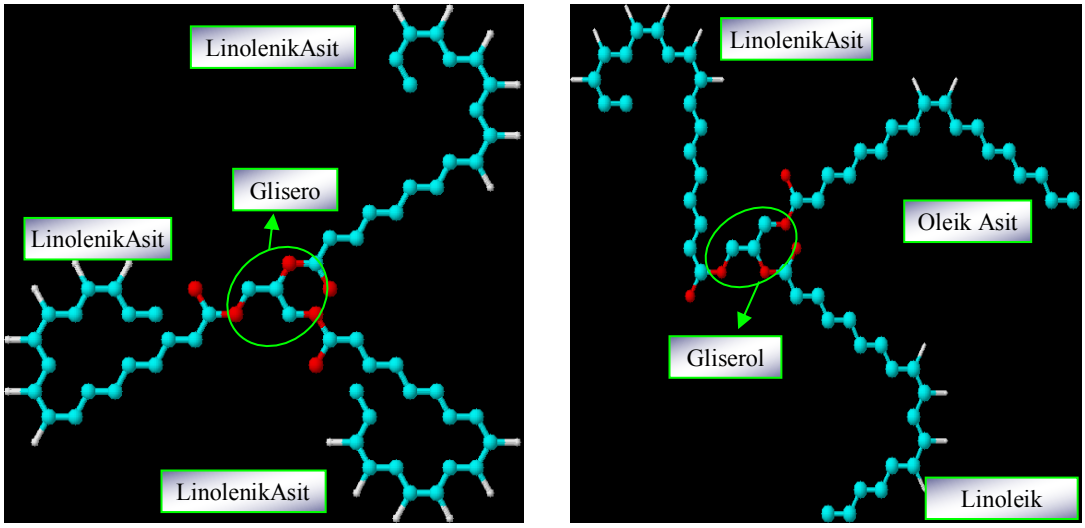
Zeytinyağının kimyasal kompozisyonu iki ana gruba ayrılabilir. Bunlardan birincisi neredeyse zeytinyağının ağırlıkça %98-99'unu oluşturan sabunlaşabilen kısmı; diğeri ise zeytinyağının ağırlıkça %0.5-2.0'ını oluşturan ve biyokimyasal bakımdan büyük öneme sahip ayırt edici bileşenleri içeren sabunlaşamayan kısmıdır (Şekil 2.6).



Şekil 2. 6. Zeytinyağının kimyasal kompozisyonu

2.3.1. Trigliseritler

TG'ler yapılarındaki yağ asitlerinin kompozisyonuna göre ikiye ayrılırlar. TG'nin yapısındaki yağ asitlerinin üçü de aynı ise "basit TG" olarak isimlendirilir. Eğer iki veya üç farklı yağ asidinden oluşuyorsa bu tip TG'lere "karışık TG" denir. Her iki TG formülü Şekil 2.7.`de sembolize edilmiştir.



Şekil 2. 7. Basit (solda) ve karışık (sağda) TG örnekleri (Ayyıldız 2010)

Çizelge 2.2'de yapılmış olan araştırmalar ışığında zeytinyağında ağırlıkla bulunan TG'lerin yaklaşık bileşimi ve yüzdeleri verilmiştir. Bu yüzdelerde bölgeden bölgeye ve hatta aynı bölgedeki farklı hasatlarda bile değişimler gözlenebilmektedir.

Çizelge 2. 2. Zeytinyağında ağırlıkla bulunan TG'lerin bileşimi ve yüzdeleri (Boskou 2006)

TG	% Miktarı
OOO	45-59
POO	12-20
OOL	12.5-20
POL	5.5-7
SOO	3-7
POP	≤1
POS	≤1
OLnL	≤1
LOL	≤1
OLnO	≤1
PLL	≤1
PLnO	≤1
LLL	≤1

TG: TG, O: Oleik asit, P: Palmitik asit, L: Linoleik asit, S: Stearik asit, Ln: Linolenik asit.

Yenilebilir yağların TG kompozisyonlarının analizi Amerikan Yağ Kimyacıları Derneği (AOCS)'nin Ce 5b-89 (AOCS 2017) kodlu standart kabul edilen metoduna göre

yüksek performanslı sıvı kromatografi tekniği (HPLC) kullanılarak yapılmaktadır. Ters faz (RP) kromatografi şartlarına sahip metotta yağ numuneleri herhangi bir ön işleme tabi tutulmadan aseton içerisinde çözülerek TG kompozisyonları analiz edilebilmektedir.

2.3.2. Monogliseritler ve digliseritler

MG ve DG'ler yağ asitleri ile gliserolün oluşturduğu mono ve diesterlerdir. MG ve DG'ler kıvam artırıcı (emülsifler) olarak önem arz eden bileşiklerdir. Bu amaçla gıdalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. MG ve DG'ler, gliserol ile TG'lerin reaksiyon ortamında yağ asidi değişimi yoluyla veya gliserol ile yağ asitlerinin esterifikasyonu ile ticari ölçekte üretilmektedir. Sindirim sisteminde TG'lerin normal parçalanması ile MG ve DG'ler meydana gelmektedir. Hayvansal ve bitkisel yağlarda ise çok az miktarlarda doğal olarak oluşurlar (Ayyıldız 2010).

MG ve DG'ler, sonlanmamış TG biyosentezi veya hidrolitik reaksiyonlar sonucu zeytinyağında oluşmaktadırlar. MG'ler zeytinyağlarında %0.25'den daha az bir konsantrasyona sahipken; DG'lerin konsantrasyonu %1-2.8 arasında olmaktadır (Frega 1993, Kiosseoglou ve Kouzounas 1993) ve bu DG'ler genellikle 34 ile 36 karbon sayısına sahip olmaktadırlar (Leone 1988, Frega 1993).

2.3.3. Yağ asidi kompozisyonu

Zeytinyağı içerisinde en çok bulunan bulunan ve TG formunda olan yağ asitleri genellikle palmitik asit (C16:0), palmitoleik asit (C16:1), stearik asit (C18:0), oleik asit (C18:1), linoleik asit (C18:2) ve linolenik asittir (C18:3). Miristik asit (C14:0), heptadekanoik (C17:0) asit ve eikosanoik asit (C20:1) de çok az miktarlarda olabilmektedir (Boskou 2006).

Yağ asidi kompozisyonu, üretim bölgesine, yüksekliğe, iklime, çeşitliliğe ve hatta zeytin meyvesinin olgunlaşmasına göre bile değişim göstermektedir. Türk, Yunan, İtalyan ve İspanyol zeytinyağları düşük miktarda linoleik ve palmitik asit içermekte ve yüksek oranda oleik asit içermekteyken; Tunus ve diğer Güney bölge zeytinyağları ise tam tersine yüksek miktarda linoleik ve palmitik asit içermekte ve düşük oranda oleik asit içermektedir. Çizelge 2.3'te iki farklı komitenin birçok çalışma sonucu kabul ettiği zeytinyağı yağ asidi kompozisyonları verilmiştir.

Çizelge 2. 3. Gaz kromatografisi ile elde edilmiş zeytinyağı yağ asidi kompozisyonları (Boskou 2006)

Yağ Asidi		CAC (%)	COI (%)
Laurik	C12:0	te	te
Miristik	C14:0	< 0.1	< 0.05
Palmitik	C16:0	7.5-20.0	7.5-20.0
Palmitoleik	C16:1	0.3-3.5	0.3-3.5
Heptadekanoik	C17:0	< 0.5	≤ 0.3
Heptadekenoik	C17:1	< 0.6	≤ 0.3
Stearik	C18:0	0.5-5.0	0.5-5.0
Oleik	C18:1	55.0-83.0	55.0-83.0
Linoleik	C18:2	3.5-21.0	3.5-21.0
Linolenik	C18:3	te	≤ 1.0
Araşidik	C20:0	0.8	≤ 0.6
Eikosenoik	C20:1	te	≤ 0.4
Behenik	C22:0	< 0.3	≤ 0.2
Erüsik	C22:1	te	te
Lignoserik	C24:0	< 1.0	≤ 0.2

te: Tespit edilemedi
CAC: Codex Alimentarius Komisyonu
COI: Uluslararası Zeytinyağı Komitesi

Yenilebilir yağların yağ asidi kompozisyonları, AOCS'nin hemen hemen tüm yağlar için özel sunmuş olduğu standart metotlarla gerçekleştirilmektedir. İlgili metotlara göre yağ numunelerinin TG'leri uygun bir reaktif ile yağ asitlerine parçalanmakta ve elde edilen yağ asitleri yine uygun bir reaktifle uçucu metil-ester türevleri haline dönüştürülüp gaz kromatografisi (GC) tekniğine göre analiz edilmektedir.

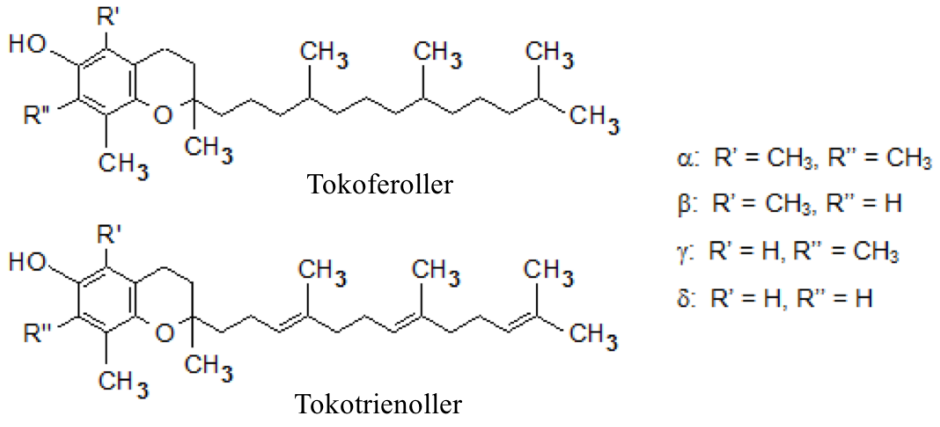
2.3.4. Serbest yağ asitleri

Zeytinyağı içerisinde gliserol ile esterleşmemiş halde bulunan yağ asitlerine FFA denmektedir. Rafine edilmemiş bazı yağlarda FFA normalden birkaç kat daha fazla bulunabilir. Bu yağ asitlerinin seviyesi rafinasyon işleminde azaltılır. Gıda olarak kullanılan rafine katı ve sıvı yağlar genellikle çok az düzeyde (%0.01) FFA içerirler. Fakat rafine edilmeden tüketilebilen EVOO'larında FFA'nin ≤ %0.8 olması istenmektedir.

Yenilebilir yağlardaki FFA'nin kantitatif tayini, AOCS'nin Ca-5a-40 (AOCS 2017) standart metoduna göre yapılmaktadır. İlgili metoda göre uygun bir çözücü ile muamele edilen yağ numunesinin kolorimetrik titrasyon tekniği ile FFA miktarı tespit edilmektedir.

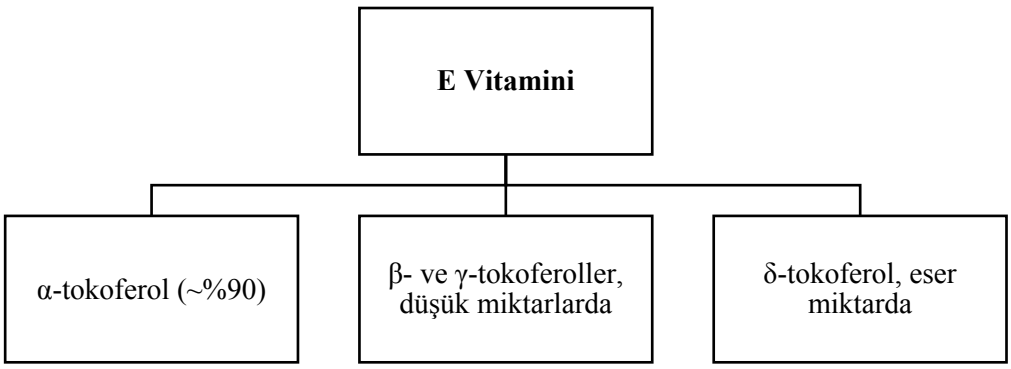
2.3.5. Tokoferoller

Tokoferoller, pek çok bitkisel yağda doğal olarak bulunan önemli izo bileşenlerdir. Bunlar bitkisel yağların oksidatif stabiliteleri yönünden yardımcı olan başlıca tabii antioksidanlar olarak kabul edilmektedir. Ayrıca yağda çözünün E vitamininin kaynağıdırlar (Ayyıldız 2010). Evans ve diğer araştırıcılar (1974), bazı bitkisel yağların sabunlaşmayan fraksiyonundan, kimyasal bakımdan birbirlerine benzeyen fakat farklı E vitamini (şimdi α, β ve γ tokoferoller olarak bilinen) aktivitesine sahip 3 tane bileşiği ilk defa izole eden araştırmacılardı. Pennock ve arkadaşları (1964) çeşitli yağlarda bulunan diğer benzer tokoferolleri tanımlamışlardır. Doymamış yan zincirleri olan bu izomerlere "tokotrienoller" denmektedir. Şekil 2.8'de bazı tokoferol ve tokotrienol türleri verilmiştir.



Şekil 2. 8. Tokoferol ve tokotrienollerin genel yapısı

Bilinen dört tokoferol türü içerisinde α-tokoferol, toplam tokoferol miktarının yaklaşık %90'ını oluşturmakta ve serbest formunda bulunmaktadır (Şekil 2.9).



Şekil 2. 9. E vitaminin bileşenleri

Rapor edilen verilere göre kg zeytinyağındakidaki α-tokoferolün mg miktarı, hasat bölgesine ve teknolojik faktörlere göre geniş bir aralıkta farklılıklar göstermektedir. Çizelge 2.4'te bazı çalışmalardan elde edilmiş toplam tokoferol miktarları verilmiştir.

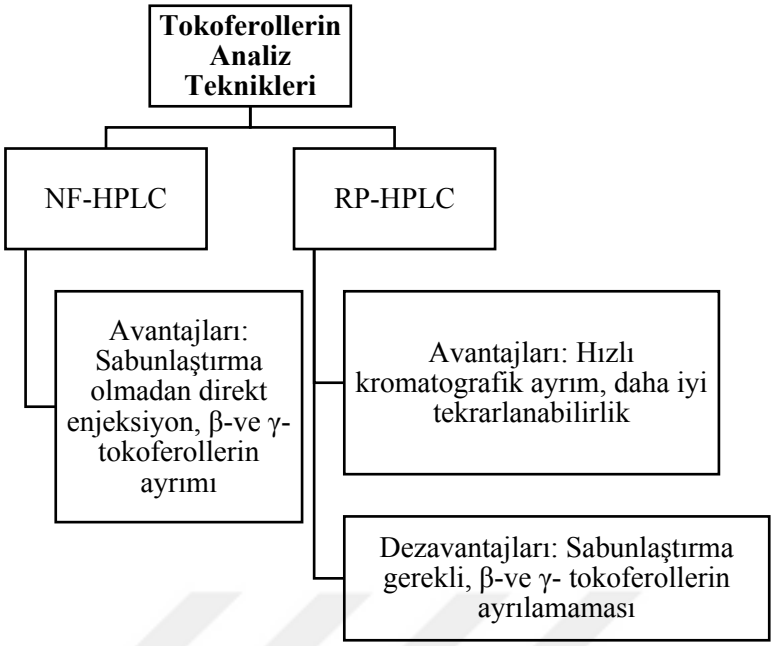
Çizelge 2. 4. Bazı çalışmalardan elde edilmiş zeytinyağı toplam tokoferol miktarları

Toplam tokoferol (mg/kg)	Kaynak
55-264, n:18	(Conte ve ark 1993)
97-315, n:52	(Fedeli ve Cortesi 1993)
100-320, n: 23	(Esti ve ark 1996)
147-187, n:6	(Ranalli ve Angerosa 1996)
103-283, n:14	(Cert ve ark 1996)
160-253, n:15	(Manzi ve ark 1998)
55-234, n:65	(Salvador ve ark 1998)

n: Analiz edilen numune sayısı

α-tokoferol seviyelerinin, yüksek seviyelerdeki klorofil pigmenti ve tekli oksijen deaktivasyonu ile bağlantılı olabileceği de ileri sürülmüştür (Grams ve Eskins 1972). Ayrıca rafinasyon kademeleri ve özellikle deoderizasyon kademesi, tokoferolleri zeytinyağından uzaklaştırmakta ve zeytinyağı içerisindeki tokoferol miktarını büyük ölçüde düşürmektedir.

Yenilebilir yağlardaki tokoferol türlerinin ayrımı ve tespiti, direkt analiz imkanı veren normal faz HPLC (NP-HPLC) ya da sabunlaştırma gerektiren RP-HPLC teknikleri ile yapılabilmektedir. Dedeksiyonları ise floresans (FLD) veya ultraviyole-görünür alan (UV-VIS) dedektörler ile gerçekleştirilebilmektedir. Tokoferoller ve tokotrienollerin kantitatif tayininde NF-HPLC tekniği yaygın olarak kullanılmaktadır. Çünkü NF-HPLC tekniğinde herhangi bir ön sabunlaştırma işlemine gerek duyulmaz ve RP-HPLC'de ayrılması mümkün olmayan β- ve γ- tokoferoller kolaylıkla ayrılabilmektedir (Tasioula-Margari ve Okogeri 2001). Şekil 2.10'da her iki analiz tekniğinin avantaj ve dez avantajları verilmiştir.



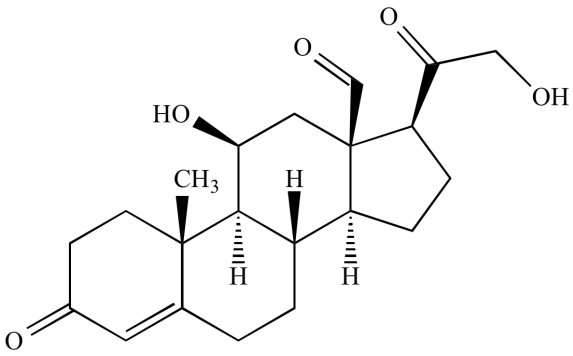
Şekil 2. 10. Tokoferollerin analiz teknikleri

Tokoferollerin tespitinde FLD dedeksiyon UV-VIS dedeksiyona göre daha seçici ve hassas olmaktadır (Hoehler ve ark 1998). Ancak serbest α-tokoferolden daha az floresans ışımaya sahip olan ester formundaki α-tokoferolleri tespit etmeye uygun değildir. Bu durumda ölçülebilen tokoferol kaybını önlemek amacıyla sabunlaştırma işlemi gerçekleştirilmekte ve ester formundaki α-tokoferoller serbest alkol formu olan α-tokoferol haline getirilmektedir (Tasioula-Margari ve Okogeri 2001).

Günümüzde yenilebilir yağların tokoferol miktarının tespiti için AOCS'nin Ce 8-89 (AOCS 2017) kodlu standart metodu kullanılmaktadır. İlgili metot NF-HPLC tekniğini kullanmakta ve FLD dedeksiyon ile tokoferol türlerini tayin etmektedir.

2.3.6. Steroller

Steroller, steroid alkoller olarak da tarif edilirler. Steroller, steroid iskeletine ilaveten 8-10 karbonlu bir yan zincir ve bir alkol grubu içeren bileşiklerdir. Yağlarda serbest halde, yağ asidi esterleri olarak ve glukosidler olarak bulunurlar ve birçok katı ve sıvı yağın sabunlaşmayan maddelerinin büyük bir kısmını teşkil ederler. Bitkisel steroller bir bütün olarak fitosteroller olarak bilinen bir karışımdan ibarettir (Ayyıldız 2010). Şekil 2.11'de sterollere örnek olarak kolesterol molekülünün yapısı verilmiştir.



Şekil 2. 11. Kolesterol molekülünün yapısı

Steroller, yağların ve özellikle zeytinyağlarının kalitesini ve kökenin belirlemede sıklıkla kullanılmaktadır. Zeytinyağında 4 sınıf sterol türü bulunmaktadır. Bunlar; genel steroller (4-desmetilsteroller), 4α-metilsteroller, triterpen alkoller (4.4-dimetilsteroller) ve triterpen dialkollerdir (Boskou 2006).

Zeytinyağları, genel sterolleri serbest ve ester formunda içermektedirler (Grob ve ark 1990). Bu sterollerin ana türleri; β-sitosterol, Δ5-avenasterol ve kampesteroldür (Itoh ve ark 1973, Boskou ve Morton 1975, Kornfeldt ve Croon 1981). Zeytinyağında az miktarda ya da eser miktarda bulunan diğer steroller ise; stigmasterol, kolesterol, brassikasterol, çelerosterol, ergosterol, sitostanol, kampestanol, Δ7-avenasterol, Δ7-kolestanol, Δ7-kampestenol, Δ7-stigmastenol, Δ5,23-stigmastadienol, Δ5,24-stigmastadienol, Δ7,22-ergostadienol, Δ7,24-ergostadienol, 24-metilen-kolesterol ve 22,23-dihidrobrassikasteroldür (Itoh ve ark 1981, Calapaj ve ark 1993, Mariani ve ark 1995, Mariani ve ark 1998).

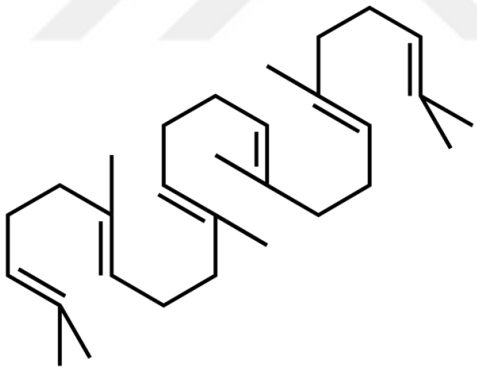
EVOO'larının en düşük sterol miktarı Avrupa Birleşik Komisyonu'nun (EC) belirlediği 1000 mg/kg (EC Regulation 2568 1991) ile 2000 mg/kg (Morchio ve ark 1987, Aparicio ve Luna 2002) arasında değişmektedir. Rafine edilmiş zeytinyağları düşük seviyelerde sterol içermektedirler. Çünkü rafinasyon prosesi yaklaşık %25'lik bir sterol kaybına yol açmaktadır. Rafinasyon esnasında zeytinyağından elde edilen zeytinyağı deoderize distilatı (OODD)'nın sterol konsantrasyonu, rafine edilmemiş zeytinyağından 3 kat fazla olabilmektedir (Morchio ve ark 1987).

Yenilebilir yağlardaki sterol kompozisyonu Uluslararası zeytinyağı konseyinin (COI) COI/T.20 (COI 2001) metoduna göre gerçekleştirilmektedir. İlgili metoda göre yağ numunesi içerisine iç standart olarak alfa-kolestanol katılmakta ve sabunlaştırma-ekstraksiyon işlemine tabi tutulmaktadır. Ardından sililleme işlemi yapılmakta ve GC

tekniği ile ayrımı gerçekleştirilirken kütle spektrofotometresi ile (MS) dedeksiyonu gerçekleştirilmektedir.

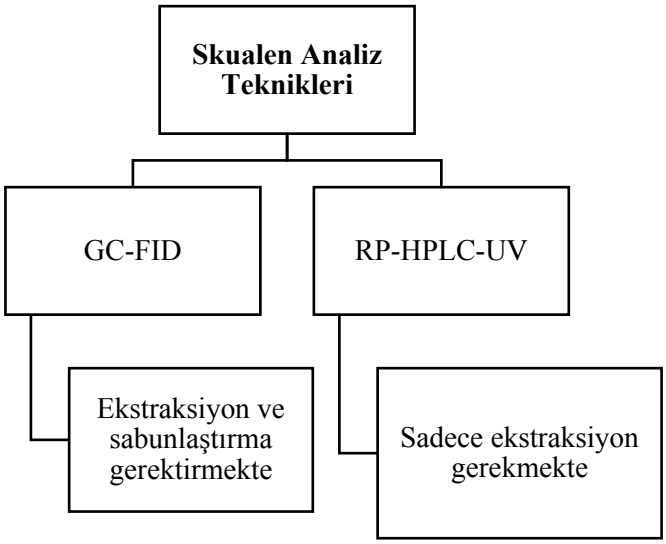
2.3.7. Hidrokarbonlar

Zeytinyağında bulunan en önemli hidrokarbon türevleri skualen ve β-karotendir. Skualen (2,6,10,15,19,23-hekzametil-2,6,10,14,18,22-tetrakosahekzan) bir izoprenid çeşididir ve iki adet farnesil pirofosfattan oluşmaktadırlar. Zeytinyağının sabunlaşmayan madde kısmının ana bileşenidir ve toplam hidrokarbon bileşeninin %90'ından fazlasını oluşturmaktadır (Lanzón ve ark 1994). Ayrıca zeytinyağındaki miktarı 200-7500 mg/kg yağ aralığında değişmektedir. Zeytinyağının rafinasyonu esnasında özellikle deoderizasyon kademesinde büyük oranda yağdan uzaklaşmakta ve deoderize distilat (DD)'a geçmektedir. Bağışıklık sisteminin önemli bir elemanı olan skualen aşılarda bağışıklık artırıcı olarak kullanılmaktadır. Ticari üretimi sadece köpekbalığı karaciğerindendir ve bu sebeple değerli bir maddedir. Şekil 2.12'de skualen molekülünün yapısı verilmiştir.



Şekil 2. 12. Skualen molekülünün yapısı

Yenilebilir yağlardaki skualen miktarının tespiti hem ultraviyole-görünür alan (UV-VIS) dedeksiyona sahip RP-HPLC tekniği ile hem de alev iyonlaşma dedeksiyonuna sahip GC tekniği (GC-FID) ile yapılabilmektedir (Şekil 2.13). HPLC tekniği daha az ön işlem gerektirmesi ve yüksek hassasiyete sahip UV-VIS dedeksiyonu ile öne çıkmaktadır.



Şekil 2. 13. Skualen analiz teknikleri

2.3.8. Fosfolipitler

Fosfolipitler, polihidrik alkol (genellikle) gliserol içeren bileşiklerdir. Yapılarında gilserole ilaveten, yağ asitleri, fosforik asit ve azot içeren bir bileşik bulunur. Zeytinyağında en çok rastlanılan fosfolipitler; fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin, fosfatitilinositol ve fosfatidilserindir. Zeytinyağında çok az miktarda bulunurlar ve özellikle rafinasyon işlemlerinde yağdan uzaklaştırılırlar.

2.4. Zeytinyağı Çeşitleri

Birçok bitkisel yenilebilir yağdan farklı olarak zeytinyağı, zeytin meyvesinin hücrelerindeki yağ zerrelerinin alındığı bazı teknolojik operasyonlar sonucu elde edilmektedir. Özellikle natürel sızma zeytinyağı (EVOO) mekanik ekstraksiyon yöntemiyle elde edildiği için doğal bir yağdır ve kendine has kompozisyonu ve tadını korumaktadır. Bu sebeple herhangi bir rafinasyon işlemine gerek duyulmadan direkt tüketilebilmektedir.

Fakat bazı durumlarda zeytinyağlarının da rafinasyon işlemine tabi tutulmaları gerekmektedir. Hangi zeytinyağlarının rafine edilmesi gerektiği tamamen üretim ve çevre koşullarına göre değişmektedir. Özellikle lampant zeytinyağı elde edilmesi için zeytinyağının rafine edilmesi gerekmektedir. Lampan zeytinyağı, içerdiği yüksek organoleptik bozunma veya Uluslararası Organizasyonlar tarafından belirlenen kimyasal-fiziksel değerleri aştığından direk olarak tüketime uygun değildir (Boskou 2006).

Artan talep ve yüksek üretim maliyetleri sebebiyle EVOO diğer yenilebilir yağlara göre daha yüksek bir piyasa fiyatına sahip olmaktadır. Bu sebeple EVOO'ları nispeten diğer ucuz yağlarla karıştırma yolu çokça denenmektedir. Ayrıca rafine zeytinyağı bile yüksek tekli doymamış yağ asidi bileşimi ve diğer önemli özellikleri sebebiyle diğer birçok zeytinyağı türü ve tohum yağlarından yüksek fiyatlara satılmaktadır. Bu sebeple EVOO'lar rafine zeytinyağı ya da pirina yağlarıyla karıştırılmak suretiyle daha ucuz zeytinyağı türevleri elde edilmektedir. Çizelge 2.5'te farklı Uluslararası Organizasyonlar tarafından zeytinyağlarının sınıflandırılması verilmiştir.

Çizelge 2. 5. Farklı Uluslararası Organizasyonlar tarafından zeytinyağlarının sınıflandırılması (Boskou 2006)

Kategori	%FFA (oleik asit cinsinden)	Elde Edilişi
EVOO	FFA ≤ 0.8	Soğuk mekanik ekstraksiyon ile
Natürel Birinci Zeytinyağı	0.8 ≤ FFA ≤ 2.0	Soğuk mekanik ekstraksiyon ile
Natürel İkinci Zeytinyağı	2.0 ≤ FFA ≤ 3.3	Soğuk mekanik ekstraksiyon ile
Natürel Lampant Zeytinyağı	FFA ≥ 3.3	Soğuk mekanik ekstraksiyon ile
Rafine Zeytinyağı	FFA ≤ 0.3	Natürel zeytinyağının rafinasyonu ile
Riviera Zeytinyağı	FFA ≤ 1.0	Natürel birinci ve rafine zeytinyağının karıştırılması ile
Ham Pirina Zeytinyağı	Belirtilmemiş	Kimyasal çözücülerle soğuk mekanik ekstraksiyondan geriye kalan zeytin posasından ekstraksiyon ile
Rafine Zeytin Posası Yağı	FFA ≤ 0.3	Ham zeytinyağının rafinasyonundan geriye kalan kısım ile
Zeytin Posası Yağı	FFA ≤ 1.0	Natürel birinci zeytinyağının rafine zeytinyağı posası yağı ile karıştırılması ile

2.5. Zeytinyağının Kalite Parametreleri

Zeytinyağları, farklı uluslararası organizasyonlar tarafından belli parametrelere dayanan kalite standartlarına göre sınıflandırılmaktadır. Bu parametreler, zeytinyağının meyve halindeyken ve ekstraksiyon ve rafinasyon işlemleri esnasında meydana gelen hidrolitik ve oksidatif süreçleri hakkında bilgi vermektedir (Boskou 2006). Zeytinyağı kalitesinin belirlenmesinde farklı organizasyonlar tarafından kullanılan parametreler Çizelge 2.6'da verilmiştir.

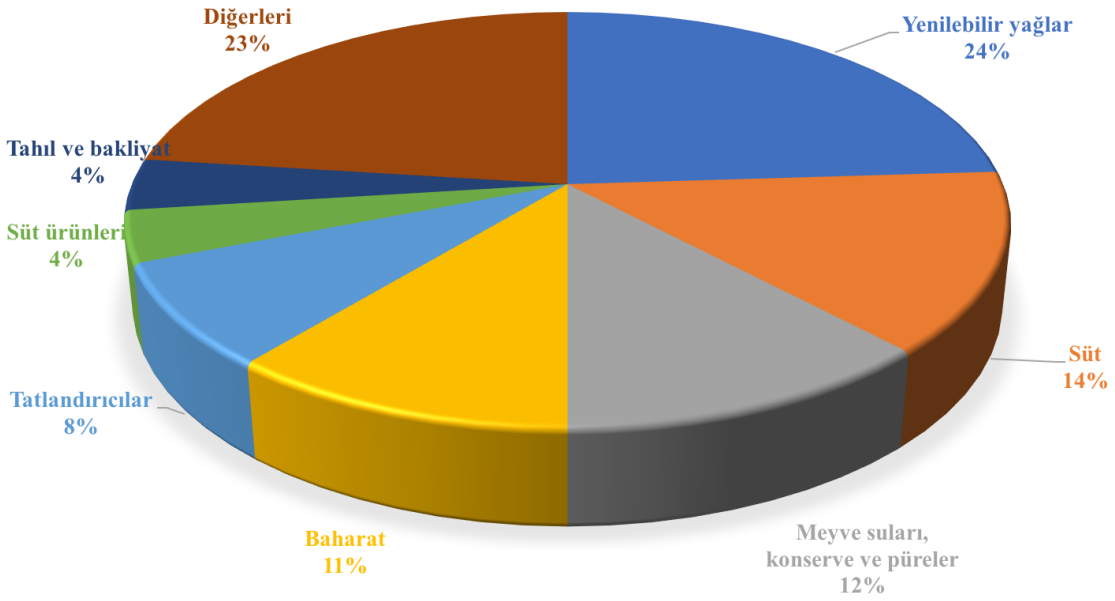
Çizelge 2. 6. Farklı Uluslararası Organizasyonlar tarafından kullanılan zeytinyağı kalite parametreleri

Parametre	COI	CAC	EC
Numune alma metodu	✔	✔	✔
Serbest asitlik	✔	✔	✔
Peroksit değeri	✔	✔	✔
UV bölge absorpsiyonu	✔	✔	✔
Organoleptik değerlendirme	✔	✔	✔
Uçucu halojen çözücüleri	✔	✔	✔
α-tokoferol miktarı	✔	✔	-
Cu, Fe, Pb, As tespiti	✔	✔	
Pirina posasındaki yağ bileşimi	-	-	✔
Çözünmeyen safsızlıklar	✔	✔	-
Sabunlaşmayan madde bileşimi	✔	✔	-

CAC: Codex Alimentarius Commission
COI: Uluslararası Zeytinyağı Komitesi
EC: Avrupa Komisyonu

2.6. Zeytinyağının Kimliğinin Doğrulanması ve Tağşişi

Yenilebilir katı ve sıvı yağlar gıda sektöründe en çok sahtecilik yapılan ürünler arasındadır. 1980'den 2010 yılına kadar elde edilen verilerden oluşan gıda sahtekarlığına ait bir anket, gıdalar arasında en çok yenilebilir yağların sahteciliğe maruz kaldığını göstermektedir (Şekil 2.14).



Şekil 2. 14. 1980'den 2010 yılına kadar gıda sahtekarlığına maruz kalan gıda ürünleri yüzdeleri (Moore ve ark 2012)

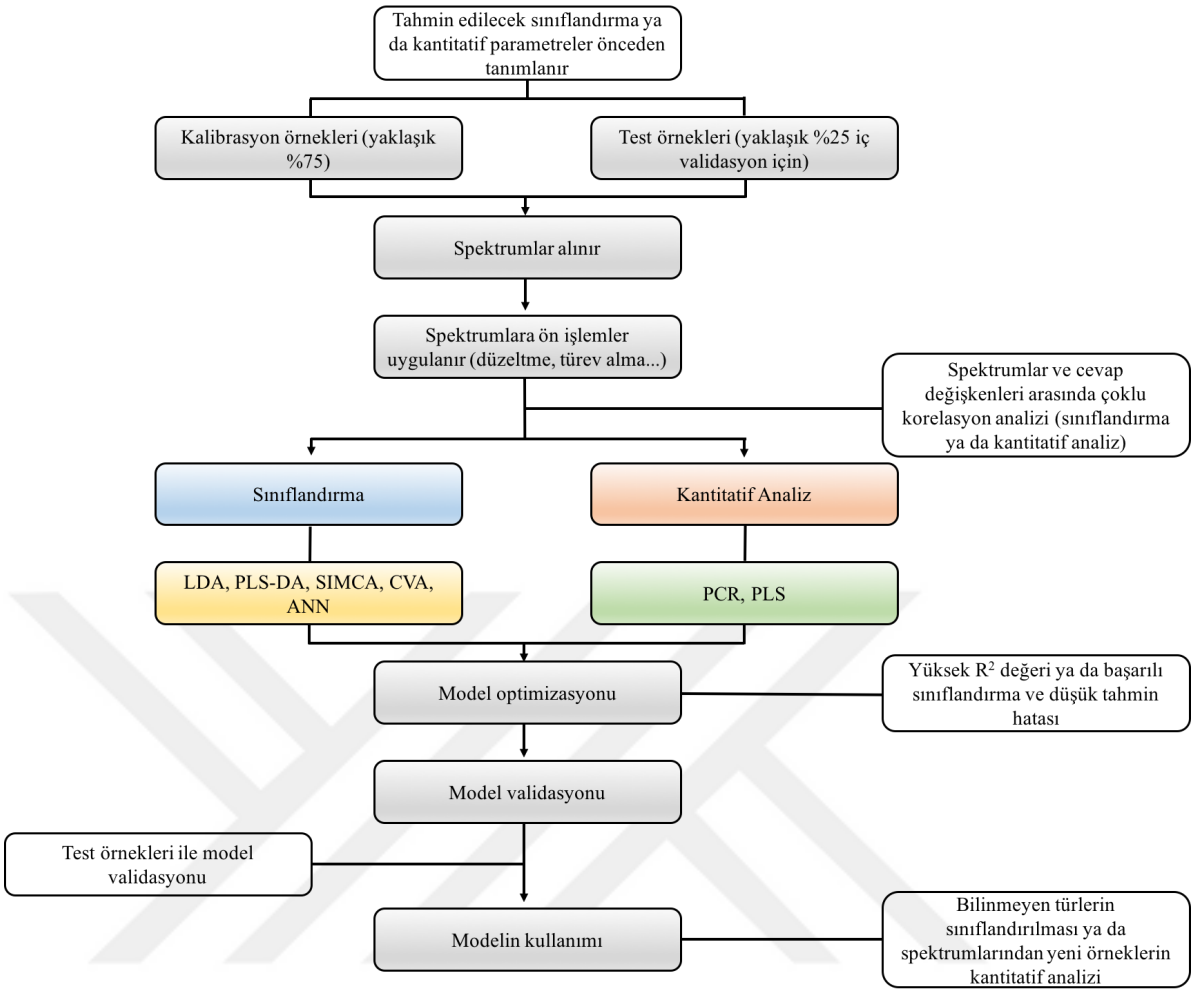
Yenilebilir yağlar arasında da en çok EVOO sahtekarlığa maruz kalmaktadır. EVOO'nın önemi, yüksek seviyede oleik asit bileşimine, doğal antioksidanlar olan zengin fenolik bileşenlere sahip olmasında ileri gelmektedir (Bendini ve ark 2006). Öte yandan EVOO, zaman harcayan hasat işlemleri ve özel soğuk pres ekstraksiyon yöntemleri sebebiyle diğer zeytinyağlarına göre daha pahalı olmaktadır. Bu sebeple EVOO'nın, bileşimi benzer ve daha ucuz olan bitkisel yağlarla karıştırılmasına (tağşiş) sıklıkla rastlanılmaktadır. Zeytinyağının doğruluğunun tespiti, tağşişi, bölgesel ve coğrafik karakterizasyonu ve kaynağı korunmuş tür yağların korunması düzenlemesi (DOP) (EEC Reg No 2081/92) açısından son derece önemlidir (Boskou 2006).

EC ve COI gibi uluslararası kuruluşlar, farklı zeytinyağı kategorilerinin karakteristik özelliklerini tanımlamışlar ve modern enstrümantal tekniklere adapte etmişlerdir. Resmi metotlarla adapte edilen teknikler zeytinyağının kontrolünde önemli bir gelişme sağlamış ve birçok çalışma yapılmıştır (Litridou ve ark 1997, Lechner ve ark 1999, Mateos ve ark 2001, Tasioula-Margari ve Okogeri 2001, Cavalli ve ark 2003, Vichi ve ark 2003, Cañabate-Díaz ve ark 2007, Baccouri ve ark 2008, Beltrán ve ark 2010, Chen ve ark 2011, Lukić ve ark 2013, Ballus ve ark 2014, Tena ve ark 2015). Fakat bazı araştırmacılar, öne sürülen bu metotların zeytinyağlarındaki tüm tağşiş çeşitlerini belirleyemeyeceğini ve tüm zeytinyağlarının kimliğini belirlemede kullanılamayacağını ileri sürmüşlerdir (Boskou 2006). Ayrıca bu metotlar uzun analiz sürelerine, karmaşık numune hazırlama işlemlerine ve yüksek miktarlarda kimyasal çözücü kullanımına ihtiyaç duymaktadırlar.

Zeytinyağlarının yağ asidi kompozisyonun incelenmesi, sadece linoleik asitçe zengin bir yağla yapılan tağşiş durumlarını tespit edebilmede yardımcı olabilmektedir. Tağşişte kullanılan diğer tohum yağlarının tespitinde, botanik orijin hakkında kesin bilgiler verebilen sterol analizini içeren ΔECN42 metodu sıklıkla kullanılmaktadır (Boskou 2006).

Analitik metotlar gıda sahtekarlığının tespiti için önemli bir role sahiptirler. Bu sebeple hızlı tekniklere olan ihtiyaç ve düşük maliyet talepleri, yenilebilir yağların karakterizasyonu için kemometrik tekniklerle beraber spektroskopik tekniklerin kullanımını teşvik etmektedir (Nunes 2014). Kemometrik metotlar, spektroskopik ve kromatografik datalar gibi karmaşık analitik verilerden gerekli bilgileri elde etmek için tanılama, sınıflandırma ve kalibrasyon gibi çoklu istatistikleri kullanmaktadır (Vandeginste ve ark 1998, Gemperline 2006, Otto 2007).

Günümüzde zeytinyağlarının bileşenlerinin kantitatif tayininde, kimliğinin doğrulanması ve tağşiş vakalarının tespitinde yüksek analiz hızına ve düşük maliyete sahip olan spektroskopik teknikler kullanılmaya başlanmıştır. Orta infrared (MIR; 4000-400 cm^{-1}) ve yakın infrared (NIR; 15000-4000 cm^{-1}) spektroskopileri kemometrik yöntemlerden yararlanılarak, zaman alıcı numune hazırlama tekniklerine ihtiyaç duymadan moleküller hakkında direkt spesifik bilgiler vererek tağşiş vakaları hakkında başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Bewig ve ark 1994, Gurdeniz ve Ozen 2009, Lerma-García ve ark 2010, Rohman ve Man 2010, Sinelli ve ark 2010, Rohman ve ark 2014, Azizian ve ark 2015, Borràs ve ark 2015, de Souza ve ark 2015, Gouvinhas ve ark 2015, Machado ve ark 2015, Mendes ve ark 2015, Uncu ve Ozen 2015, Vasconcelos ve ark 2015, Hirri ve ark 2016, Hirri ve ark 2016). Bu metotlar genellikle kemometrik yaklaşımlar ile desteklenmektedir. Bu yaklaşımların ikisi denetimsiz desen tanıma temelli, temel bileşen analizi (PCA) ve hiyerarşik bulut analizi (HCA); beşi denetimli sınıflandırma, kısmi en küçük kareler metodu-diskriminant analizi (PLS-DA), hafif bağımsız sınıf analiz modelleme (SIMCA), lineer diskriminant analizi (LDA), kanonik değişken analizi (CVA), yapay sinirsel ağ (ANN); ve son ikisi çoklu kalibrasyon olan, kısmi en küçük kareler metodu (PLS) ve temel bileşen regresyonudur (PCR) (Nunes 2014). Spektroskopik datalardan faydalanılarak sınıflandırma (karıştırılmış/karıştırılmamış gıda ya da kimliği belli/belli değil) ya da kantitatif parametreler (karıştırılan gıdanın miktarı, yağ asidi miktarı) gibi metot geliştirmeleri için kullanılması gereken kemometrik metodun seçim basamaklarını gösteren örnek şema Şekil 2.15'de verilmiştir.



Şekil 2. 15. Spektroskopik datalar kullanılarak sınıflandırma ya da kantitatif analiz için kullanılacak kemometrik modelin oluşturulma basamakları

2.7. Zeytinyağının Rafinasyonu

Yağlı tohumlardan kabuk kırma ve ayırma, pulcuklandırma, presleme, çözücü ekstraksiyonu gibi işlemler sonucu elde edilen ham yağda, TG'lerin dışında fosfatidler, sabunlaştırılamayan maddeler (steroller, tokoferoller, hidrokarbonlar vs.), renkli maddeler (klorofil, karoten, gosipol vs.), FFA, iz metaller, peroksitler, konjuge yağ asitleri, pestisitler, proteinler, aldehitler, ketonlar, trans yağ asitleri, hidrokarbonlar, dimerler, polimerler gibi bileşikler bulunmaktadır. Ham yağ içinde bulunan bu bileşiklerin miktarı ve cinsi; bitkilerin yetiştirildiği toprak yapısına, iklim şartlarına, tohumların depolanma şartlarına ve işlenmesine bağlı olarak değişim gösterebilmektedir. Yağların, insanların kullanımına sunulabilmeleri yani yağın tüketime uygun özellikler kazanması için bu bileşiklerin miktarlarının tespit edilip, safsızlık olarak bulunan

maddelerin uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu ise; yağların kimyasal, fiziksel ya da enzimatik olarak rafine edilmesi ile gerçekleştirilir (Şekil 2.16).

Mekanik işlemler sonucu, bitkilerin meyvelerinden ya da çekirdeklerinden (tohumlarından) elde edilen ham yağın tabi özelliğini bozmadan ve yapısını değiştirmeden yenilebilir hale getirilmesi amacıyla, ihtiva ettiği safsızlıkların tümünün birden uzaklaştırılma işlemine rafinasyon denir. Rafinasyon işleminde, tüketime engel olan safsızlıklar; yağın TG yapısını bozmadan ve antioksidant görevi yapan ve E vitamininin sentez kaynağı doğal tokoferollere zarar vermeden uzaklaştırılmalıdır.



Şekil 2. 16. Rafinasyon çeşitleri ve basamakları

Yağlarda rafinasyon işlemi kimyasal, fiziksel ve enzimatik olmak üzere üç farklı metotla yapılmaktadır: Kimyasal rafinasyonda; degumming, nötralizasyon, ağartma, kışlandırma-vinterizasyon ve deoderizasyon kademeleri yer alırken; fiziksel rafinasyonda ise degumming, ağartma ve Vinterizasyon, son aşamada ise nötralizasyon ve deoderizasyon işlemleri birlikte yapılır.

2.7.1. Degumming

Rafinasyondaki ilk kademedir. Bu kademe, ham yağda bulunan ve uzaklaştırılmadığı takdirde rafinasyonda kayıplara sebep olan fosfolipidler, proteinler ve gumlar gibi maddelerin hidratlaştırılarak, yağdan uzaklaştırılmalarını içermektedir. Bu maddeler anhidrat (susuz) yapıları nedeniyle ham yağda çözünen maddelerdir fakat

hidratlandıkları zaman çözünürlükleri kaybolmaktadır. Hidratlanabilen fosfolipidler bu şekilde ham yağdan uzaklaştırılırken, hidratlanamayan fosfolipidler ise asitle muamele edilerek yağdan uzaklaştırılmaktadırlar (Arslan 2009).

Degumming kademesinde; fosfatidler, proteinler, nişasta, metaller, v.b. maddeler yağdan uzaklaştırılırken; ilave edilen asit sebebiyle yağda fosforik asit esteri, FFA ve fosfatidik asit oluşmaktadır.

2.7.2. Nötralizasyon

Rafinasyondaki ikinci kademedir. Bu kademe, FFA'nin bazlarla nötralizasyonunu içermektedir. Nötralizasyon işleminde yaygın olarak kullanılan yöntem; FFA'ların NaOH ile sabunlaştırılması sonucu oluşan sodyum sabunlarının soapstokla birlikte uzaklaştırılmasıdır. Soapstok; bitkisel ham yağların rafinasyonunda, FFA'ların NaOH ile nötralizasyonundan sonra yer alan yıkama işleminde ayrıştırılan yan üründür. Yağda serbest halde bulunan yağ asitleri NaOH ile muamele edilince yağda erimeyen sabun meydana getirerek çökmektedirler. Meydana gelen sabun, asidik karakterde olan diğer bazı maddeleri de absorbe ederek, bu maddelerin de kendisiyle birlikte çökmelerini sağlamaktadır (Arslan 2009).

Nötralizasyon basamağında yağ içerisinde varolan FFA'lar, fenolik bileşikler ve bazı metaller uzaklaştırılmakta iken; bir önceki degumming basamağından kalan fazla fosforik asit ve yine bir önceki basamakta oluşan fosforik asit esteri ve fosfatidik asit uzaklaştırılmaktadır. İlgili basamakta ilave edilen NaOH sebebiyle yağda sabun, DG ve su oluşmaktadır.

2.7.3. Ağartma

Bir diğer basamak olan ağartma kademesi; ham yağın doğal olarak içerdiği renk kaynağı pigmentlerinin ve yağa koyu renk veren diğer çeşitli maddeler ile; bu basamaktan önceki işlemlerde yeterince uzaklaştırılamamış fosfolipidler, oksidasyon ürünleri, iz metalleri, sabun kalıntıları gibi türlerin uzaklaştırılmasını içermektedir. Ağartma işlemi; yağın oksidasyon kararlılığını azaltan ve tadını bozan bu maddelerin uygun bir adsorban madde üzerinde tutulması ve işlem tamamlandıktan sonra kullanılan adsorbanların filtrasyon yardımı ile yağdan uzaklaştırılmasını esas almaktadır. Ağartma işleminde adsorban madde olarak genellikle yüzey aktivasyonu yüksek topraklar kullanılmaktadır.

Tonsil, Bentonit gibi çeşitli ticari adlar alan ve sanayide "ağartma toprağı" genel adı ile bilinen adsorban özellikteki bu toprakların yanı sıra; son yıllarda doğal killerin H_2SO_4 veya HCl gibi derişik ve kuvvetli asitlerle ile muamele edilip yüksek sıcaklığa ısıtılmasıyla aktif hale getirilen topraklar da yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (Arslan 2009).

Ağartma kademesinde yağda bulunan renkli maddeler, hidroperoksitler, metaller, bir önceki kademede oluşan fosfatidler ve fosforik asit uzaklaştırılırken; ilgili kademe şartlarından dolayı yağda trans yağ asitleri, keton ve aldehitler, konjuge dimer ve polimerler, polar maddeler ve FFA oluşmaktadır.

2.7.4. Vinterizasyon

Vinterizasyon, kademeli olarak soğutulan ve düşük sıcaklıklarda yavaş bir karıştırma ile bekletilen yağda oluşan kristallerin süzülerek uzaklaştırılması işlemi olarak tanımlanabilmektedir. Yağlarda bulunan doymuş TG'lerin; özellikle de stearinlerin, 8-10 °C'de donarak yağa bulanık renk vermelerini önlemek amacıyla yapılmaktadır. Vinterizasyonda kristallenmeyi başlatmak ve süzmeyi iyileştirmek için vinterize toprağı "perlit" kullanılmakta ve bu toprak daha sonra süzme işlemi ile yağdan ayrılmaktadır. Ayırma işleminden sonra yağlar, soğutulmuş filtrelerden geçirilerek berrak kısım alınmaktadır. Vinterizasyon işleminin başarılı olabilmesi için ortamdaki serbest asitlik, yapışkan maddeler ve renk maddeleri gibi kristal oluşumunu güçleştiren maddelerin, diğer rafinasyon aşamalarında tamamen giderilmesi gerekmektedir (Arslan 2009).

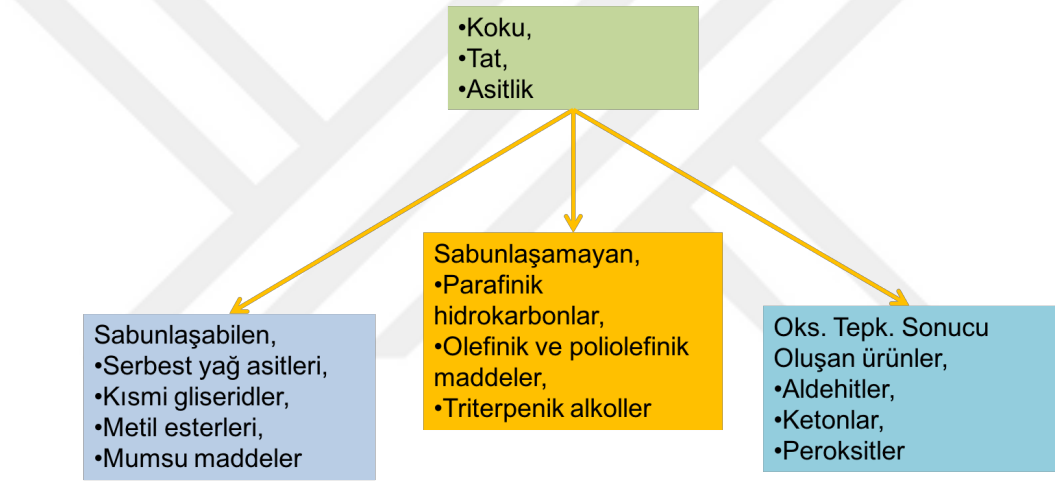
Vinterizasyon kademesinde yağda bulunan stearin, vakslar ve parafin gibi maddeler uzaklaştırılırken; ilgili kademede yağda perlit kalmakta ve katı parçacıklar oluşmaktadır.

2.7.5. Deoderizasyon ve deoderize distilat

Ham yağların rafinasyonunda uygulanan son işlem kademesi deoderizasyon işlemidir. Bu işlem kimyasal rafinasyonda 220-240 °C sıcaklıkta, 3-5mBar basınçta, yağın %0.5- 1'i kadar su buharı enjeksiyonu ile yaklaşık 20-30 dakika (dk) süreyle uygulanmaktadır. Bu koşullarda uçucu bileşenler su buharının da sürükleyici etkisi ile yağdan uzaklaşarak deoderizasyon distilatında toplanmaktadır. Fiziksel rafinasyonun son kademesi olan su buharı distilasyonunda ise FFA'nin uzaklaştırılması da amaçlandığı için

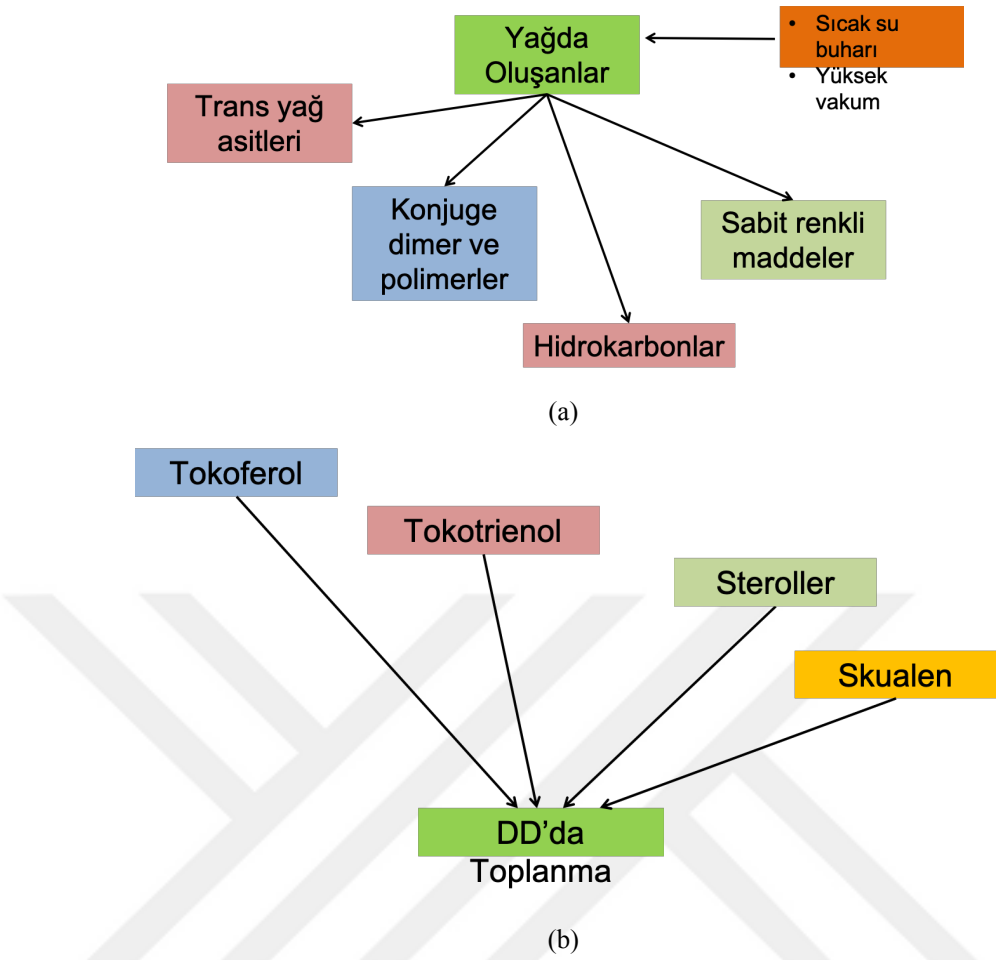
işlem daha yüksek sıcaklıkta ve daha düşük basınç altında 60 dk süreyle uygulanmaktadır. İşlem koşullarındaki bu farklılık, oluşan distilatların bileşen kompozisyonlarını da değiştirmektedir. Su buharı distilasyonu ve deodorizasyon kademesinde oluşan distilat genel olarak FFA, tokoferoller, sterol ve sterol esterleri, skualen, terpenik ve alifatik alkoller, MG, DG, TG, yağ asitlerinin parçalanma ürünleri, aldehitler, ketonlar açısından zengindir (Dumont ve Narine 2007).

Deoderizasyon işleminde bu aşamaya kadar gerçekleştirilen rafinasyon basamakları sonucunda yağda oluşan ve istenmeyen yağa koku, tat ve asitlik veren maddeler (sabunlaşabilen, sabunlaşamayan ve oksidatif tepkimeler sonucu oluşan bileşikler) yağdan uzaklaştırılmaktadır (Şekil 2.17).



Şekil 2. 17. Deoderizasyon kademesinde yağdan uzaklaştırılan maddeler

Deoderizasyon kademesinde yüksek sıcaklık ve basınç altında gerçekleştirilen distilasyon sonucunda yağda farklı maddeler oluşmakta ve tokoferol, sterol ve skualen gibi önemli biyoaktif bileşenlerin büyük bir bölümü bu kademede yağdan ayrılmakta ve DD'a geçmektedir (Şekil 2.18).



Şekil 2. 18. Deoderizasyon kademesinde yağda oluşan maddeler (a) ve kayıplar (b)

Fiziksel ve kimyasal rafinasyon yöntemlerinde elde edilen su buharı distilasyonu ve deoderizasyon kademelerinde oluşan DD'lerin örnek kompozisyonu Çizelge 2.7.'de görülmektedir.

Çizelge 2. 7. Bazı yağlara ait DD'ların kimyasal bileşenleri (Verleyen ve ark 2001)

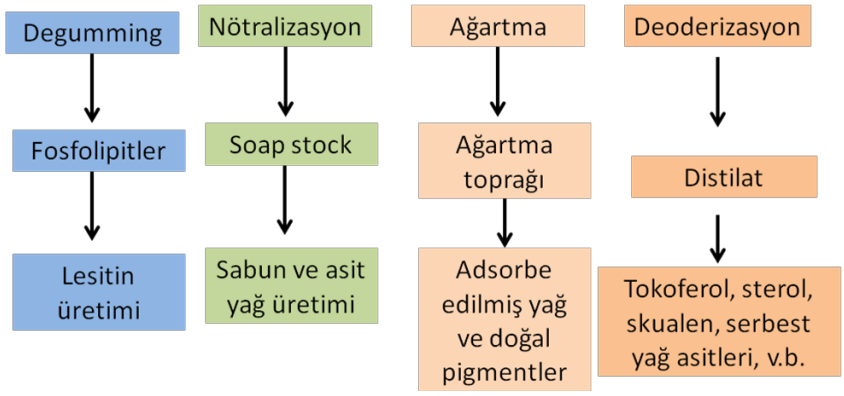
Bileşen	Soya			Mısır		Ayçiçeği		Kanola	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Skualen	1.28	2.09	0.65	0.21	0.99	1.00	0.73	0.40	0.07
α-tokoferol	0.82	0.81	0.54	0.15	0.36	1.21	4.76	1.35	0.89
β- tokoferol	0.52	0.36	0	0.06	0.08	te	te	0.18	0.14
γ-tokoferol	10.73	11.26	4.96	1.09	2.75	0.07	0.3	2.48	2.33
δ-tokoferol	4.41	5.59	2.01	0.12	0.12	te	te	0.18	0.31
Brassikasterol	te	te	te	te	te	te	te	2.75	1.64
Kampesterol	5.06	5.66	1.91	0.84	1.67	0.45	1.58	4.37	2.93
Stigmasterol	4.1	4.81	1.38	0.19	0.37	0.62	2.04	te	0.01
Sitosterol	7.9	8.34	3.03	1.68	3.38	2.6	8.6	6.24	4.05
Diğer steroller[a]	te	te	te	te	te	0.62	1.68	te	te
Steril esterler	2.59	2.33	4.45	0.62	te	0.09	0.3	5.33	1.35
FFA	33	32	73.8	81.2	77.1	70.82	39,2	39,2	42.8

[a]Δ5 avenasterol, Δ7 avenasterol ve Δ5 stigmasterol.
te: tespit edilemedi.
Konsantrasyonlar g/100g DD'dir.

2.7.6. Rafinasyon yan ürünleri

Dünya'da ve Ülkemiz'de her yıl milyonlarca ton direkt kullanıma uygun olmayan yağlar rafinasyon işlemine tabi tutulmaktadır. Gıda sektörünün büyük bir bölümünü oluşturan bu rafinasyon işlemi sonucu her bir basamaktan hatırı sayılır miktarlarda yan ürünler oluşmaktadır. Bu yan ürünlerin çoğu ticari olarak değeri olan bileşenlerden oluşmakta ve ham madde olarak kullanılabilmektedir. Rafinasyon işlemleri sırasında oluşan ve yan ürün olarak değerlendirilebilen atıklar;

- Degumming basamağında yağdan uzaklaştırılan fosfolipidler (lesitin),
- Nötralizasyon işlemi esnasında sabunlaşma reaksiyonu sonucu oluşan sabun (sabun, asit yağı),
- Renk açma işlemi esnasında kullanılan ağartma toprağı (adsorbe edilen yağ ve doğal renk pigmentleri) ve
- Deoderizasyon işlemi sırasında oluşan distilat (sterol, tokoferol, skualen, FFA) olmak üzere dört grup altında özetlenebilir (Şekil 2.17). Bunlardan en değerlisi kuşkusuz deoderizasyon kademesinde oluşan, önemli biyoaktif bileşenleri içeren DD'dir.



Şekil 2. 19. Rafinasyon işleminin farklı kademelerinde meydana gelen önemli yan ürünler

Fiziksel veya kimyasal rafinasyon işlemleri sonunda oluşan distilat, ekonomik öneme sahip olan FFA, tokoferoller, skualen, sterol gibi biyoaktif bileşenleri içermektedir. Bu bileşenleri için ucuz bir kaynak olarak değerlendirilen DD'larla ilgili birçok çalışma yapılmış ve farklı yağlardan elde edilen DD'ların kimyasal bileşenlerini belirlemeye ve bu bileşenleri DD'lardan izole etmeye yönelik birçok çalışma yapılmıştır (Verleyen ve ark 2001, Mendes ve ark 2002, Che Man ve ark 2005, Nagao ve ark 2005,

Martins ve ark 2006, Dumont ve Narine 2007, Posada ve ark 2007, Shao ve ark 2007, Gunawan ve ark 2008, Kasim ve ark 2009, Carmona ve ark 2010, Yang ve ark 2010, Naz ve ark 2012, Gutiérrez ve ark 2014, Naz ve ark 2014, Rocha ve ark 2014).

3. MONOLİTİK KOLONLAR

Kromatografi, bir karışımda bulunan türlerin hareketli bir faz yardımıyla sabit bir faz üzerinden geçirilmesi sırasında, fiziksel ve kimyasal özelliklerindeki farklılıklar sebebiyle, sabit ve hareketli faza gösterdikleri farklı ilgi ve etkileşimler sebebiyle değişik hızlarda hareket etmeleri esasına dayanan güçlü bir ayırma ve tayin yöntemidir. Hareketli faz ve sabit faz, numunedeki türlerin hızlı bir şekilde hareketli ve sabit faz arasında dengeye gelebildiği ve sabit fazı terk etmeden önce tamamen diğer bileşenlerden ayrılacağı şekilde seçilebilmektedir.

Gözenekli bir sabit faz kromatografinin kalbi gibi düşünülebilir çünkü hareketli fazın sabit faz içerisinde düzenli bir şekilde süzülebiliyor olması kromatografik proseslerin temel prensibini oluşturmaktadır. Çözünmüş türlerin hareketli ve sabit faz arasındaki etkileşimi (kütle transferi) hızlı ve sık olmalıdır. Bu durum kromatorafik sistemlerde hareketli ve sabit faz arasında dengede olan türlerin ayrımı ve buna bağlı olarak kolonun yüksek bir ayırma gücüne sahip olması için şarttır. İyi bir kütle transferi ve ayrım için kolon malzemesi bazı özelliklere sahip olmalıdır. Bunlardan ilki, hızlı kütle transfer kinetiklerine dayanabilmesi için kolon yatağının difüzyon mesafelerinin küçük olmasıdır. İkincisi, yine aynı sebeple sabit fazın hareketli fazla temas ettiği bölgenin yüzey alanı büyük olmalıdır (Guiochon 2007). Bu durum, eğer alıkonma mekanizması adsorpsiyona dayalı bir ayırma sistemi ise yüksek bir kolon ayırma gücü sağlanabilmesi için daha da öne çıkmaktadır. Sonuncusu ise kolon malzemesinin hareketli fazın akışına gösterdiği hidrolik mukavemet makul seviyelerde olmalıdır. Yüksek bir hidrolik mukavemet, yüksek basınçlarda çalışan pompalı ayırma sistemlerinde kolon uzunluklarının sınırlı ölçülerde kalmasına sebep olmaktadır. Fakat bu gereksinimler hiçbir zaman mutlak bir uyum içerisinde olmamaktadır. Uygun hareketli-sabit faz seçimi için yapılan araştırmalar hala birçok bilim adamı tarafından yapılmakta ve son 50 yıldır devamlı geliştirilmektedir (Guiochon 2007).

Tswett (Tswett 1903, 1910, Tswett ve Senchenkova 2003), döneminde temin edebildiği en küçük parça boyutuna sahip malzemeyle doldurduğu bir kolon kullanmıştır. Çok vakit geçmeden küçük parçacık boyutuna sahip malzemelerden elde edilen sabit faza sahip bir kolonla yapılan çalışmalarda çok iyi ayrımalar elde edilmesine karşın o dönemde herhangi bir pompa imkanı olmaması ve tek hareket gücünün yerçekimi olması sebebiyle hareketli fazın çok yavaş ilerlediğini tespit etmiştir. Tswett'in keşfinden sonra neredeyse bir yüzyıl boyunca sabit fazlar küçük parçacık boyutuna sahip malzemelerle elde

edilmiştir. 1960'ların sonuna kadar kolon kromatografisi, hareketli fazın kendi ağırlığı sayesinde sabit faz üzerinde hareket etmesi esasına dayanarak gerçekleştirilmiştir. Bu durum kolon uzunluklarının sınırlı olması ve partikül boyutlarının daha da küçültülememesi sebebiyle hem etkili hem de hızlı bir ayrımın gerçekleştirilmesini önlemiştir (Guiochon 2007).

1960'lardan sora gelişen teknolojiye paralel olarak kromatografi alanında kullanılan dolgu malzemeleri ve pompalar da gelişmiştir. Daha yüksek basınçlar elde edildikçe ayırmalar da daha iyi olmaya başlamıştır. Fakat bir süre sonra yüksek geri kolon basınçları sebebiyle, üst limitlerine ulaşılan basınçlar da yeni ayırmalar için yeterli olmamaya başlamıştır. Bu durum ise hareketli fazın ısıtılarak viskozitesinin düşürülmesi ve aynı basınçta daha hızlı analizlerin gerçekleştirilebilmesi ile aşılmıştır. Carr ve çalışma grubu (Yang ve ark 2005, Wang ve ark 2006) bu alanda ciddi başarılara imza atmışlardır.

Hareketli faz üzerinden yapılan çalışmalarla, hareketli fazın sabit faz içerisindeki süzülüşünün artırılabiliyor olmasına karşın; bu durumun sabit faz üzerinde yapılacak değişikliklerle arttırılması neredeyse imkansızdır. Sabit fazın hareketli fazı geçirebilme kapasitesi, meydana geldiği partiküllerin ortalama boyutuna ve kolon yatağının iç gözenekliliği ile ölçülebilen doldurma yoğunluğuna bağlı olmaktadır. Artan gözeneklilik ile doğru orantılı olarak hareketli fazın sabit faz içerisinden geçiş hızı artmaktadır. Fakat geleneksel kolonların iç gözenekliliğinin artmasıyla, kolon verimliliğini düşüren kusurlu bölgeler ve boşluklar oluşmaktadır. Bu durum ise iyi bir ayırma için istenmeyen bir durumdur.

Geleneksel kolonların gözenek yapısı çoğunlukla iki gözenek boyutu modu ile ifade edilmektedir. Mezo gözenek boyutu modu, ayrılması istenen bileşenlerin alıkonduğu ve büyük bir yüzey alanına sahip olan mezoporların partikül içi etkileşimlerini ifade etmektedir. Bu mezoporların hacimsel fraksiyonu kolonun iç gözenekliliği olarak ifade edilmektedir. Makro gözenek boyutu modu ise hareketli fazın süzüldüğü, kolon dolgu maddesinin içinde bulunan kanallar ya da boşlukları ifade etmektedir. Geleneksel kolonlarda bu boşluklar çok dar olduğu için hareketli faz yavaş ilerlemekte ve kolon geri basıncı da doğru orantılı olarak artmaktadır. İşte bu noktada hem yüksek iç gözenekliliğe sahip olan, ayırma verimliliğinde bir azalma olmayan, hem de partikül yapısı bakımından geleneksek kolonlardan farklı olan monolitik kolonlar öne çıkmaktadır.

Monolit kelimesi Yunan dilinden gelmektedir. Mono, tek; lit ise kaya veya taş anlamına gelmektedir. Monolit kelimesi, Mitolojik Yunan yapılarında bulunan sütunlar için kullanılmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3. 1. Mitolojik Yunan yapılarında bulunan monolitik sütunlar (Nikolaos 2010)

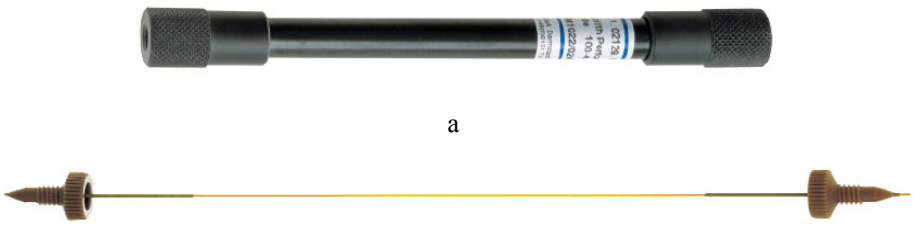
Monolitik kolonlar ise yapısal olarak geleneksel kolonlardan farklılıklar göstermektedir. Geleneksel kolonlar birçok partikülün uygun şartlarda kolona doldurulması ile meydana gelmiş bir yığın şeklindedir. Monolitik kolonlar ise kanallar ve gözenekler içeren tek bir birimden meydana gelmiş sürekli sistemler olarak tanımlanmaktadırlar. Çin, Beijing'te pir parkta sergilenen monolitik yapı Şekil 3.2'de görülmektedir.



Şekil 3. 2. Çin, Beijing'te bir parkta sergilenen monolitik yapı (Guiochon 2007)

3.1. Monolitik Kolonların Genel Karakteristiği

Monolitik malzemeler silika ve organik tabanlı olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır. Silika tabanlı monolitik kolonlar, geleneksel doldurma teknikleri kullanılarak hazırlanmaktadır (Şekil 3.3.a). Organik tabanlı monolitik kolonlar ise kolon içerisinde sentezlenmek suretiyle elde edilmektedirler. Özellikle spesifik katı faz ekstraksiyonu ayırmaları için moleküler olarak baskılanmış monolitik kolonlar bu yolla hazırlanmaktadır (Şekil 3.3.b).



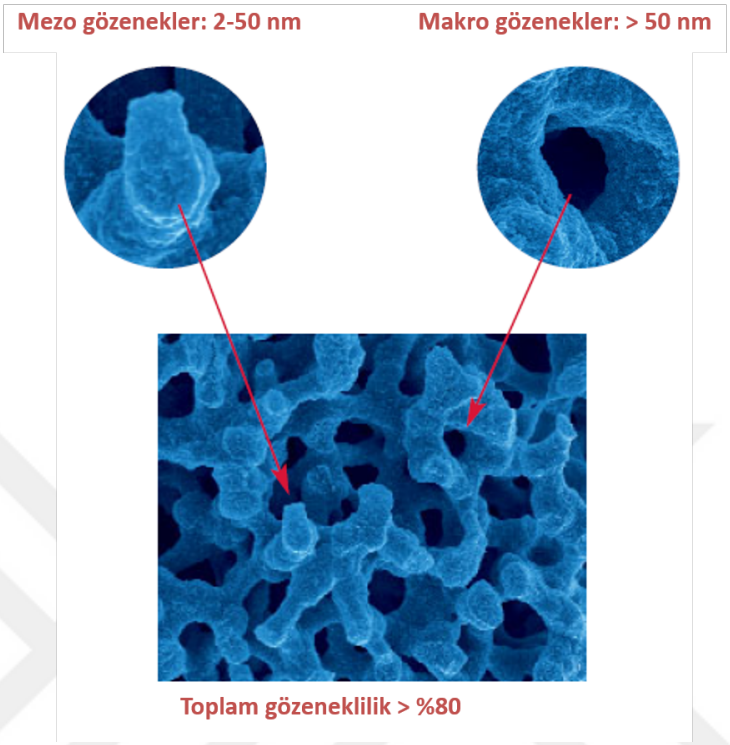
a

b

Şekil 3. 3. Silika tabanlı ve organik tabanlı monolitik kolonlar (Merck 2010)

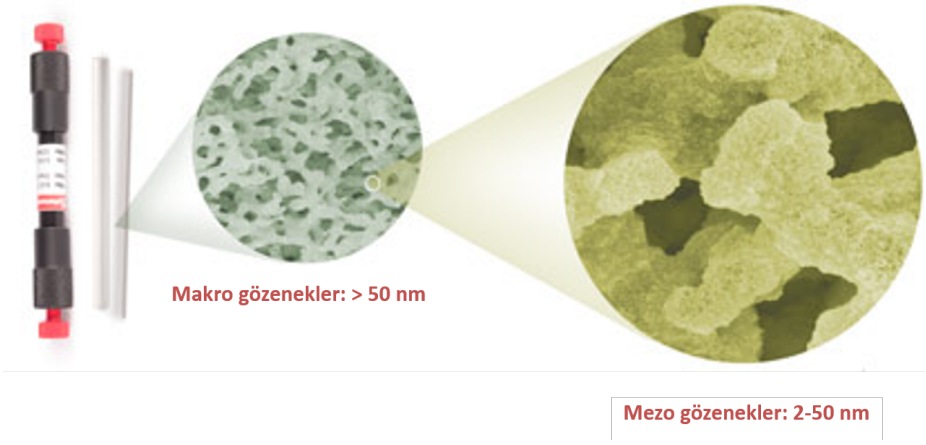
Monolitik malzemelerin gözenekliliği de makro ve mezo gözeneklerin ortalamasından oluşmaktadır. Şekil 3.4'teki taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüsünden de görüleceği üzere mezo gözenekler 2 ila 50 nm arasında olurken; makro

gözenekler ise 50 nm'den büyük olmaktadır. Mezo ve makro gözeneklerden gelen ortalama gözeneklilik miktarı %80'den büyük oranlara ulaşabilmektedir.



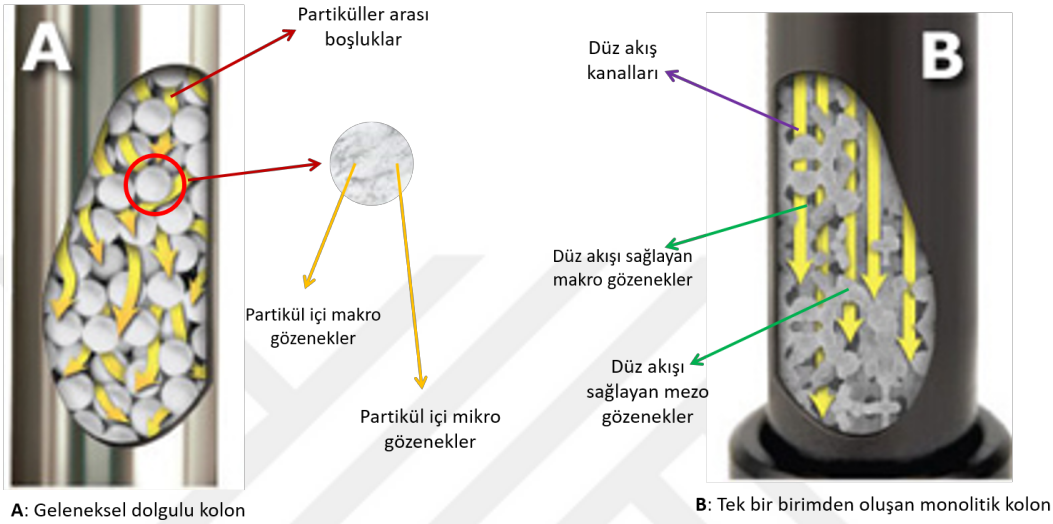
Şekil 3. 4. Tipik bir silika tabanlı monolitik kolonun gözenek yapısının SEM görüntüsü (Cabrera 2004)

Monolitik malzemeler geniş bir yüzey alanına sahip ve farklı boyutlarda olan mezo ve makro gözeneklerinden gelen yüksek ortalama gözeneklilik miktarı ile yüksek akış hızlarında bile düşük kolon basınçları ile iyi bir ayırma sağlamaktadırlar (Şekil 3.5).

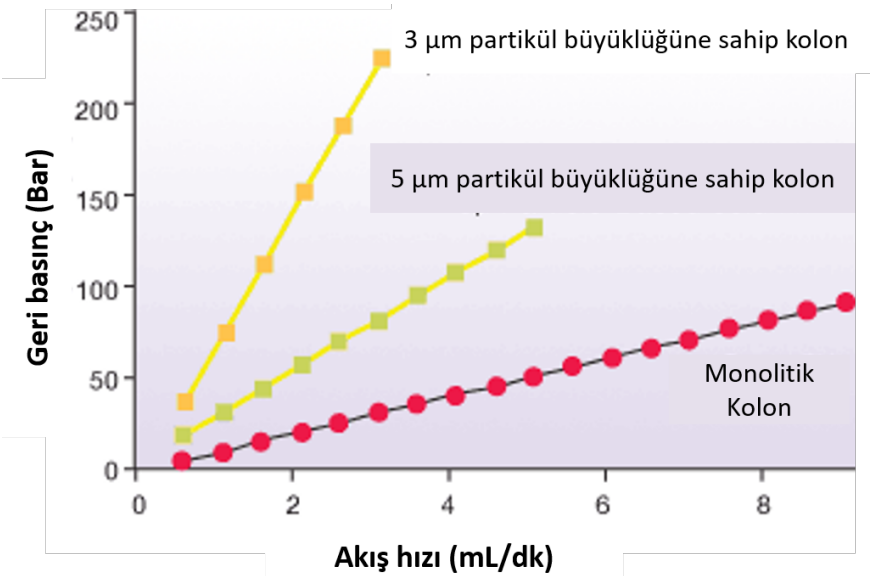


Şekil 3. 5. Silika tabanlı bir monolitik malzemenin mezo ve makro gözeneklerinin boyutları (Onyx 2010)

Birçok birim partikülden oluşan geleneksel kolonların aksine, monolitik kolonlar gözenekli ve tek bir yapıdan oluştuğu için hareketli fazın kolayca akabileceği düz kanallar içermektedir (Şekil 3.6). Bu sayede düşük geri basınçlarda yüksek kütle-transfer aktarımı sağlanarak daha verimli kromatografik ayrımlar elde edilmekte ve daha yüksek akış hızlarına çıkılabilmektedir (Şekil 3.7).



Şekil 3. 6. Geleneksel dolgulu ve monolitik kolonların partikül ve gözenek yapısı (Onyx 2010)



Şekil 3. 7. Geleneksel kolonlar ile monolitik kolonların artan akış hızlarında gösterdiği geri basınçların karşılaştırılması (Onyx 2010)

Monolitik kolonlar, sahip oldukları farklı partikül yapıları sebebiyle geleneksel kromatografi kolonlarına göre üstün özelliklere sahip olmaktadırlar. Bunlardan bir diğeri

de monolitik kolonların birbirlerine seri bağlanarak daha uzun ve buna bağlı olarak ayrılması daha zor olan bileşenlerin ayrımını sağlayabilmesidir. Çizelge 3.1'deki verilerden de görülebileceği üzere 10 adet monolitik kolon birbirine seri bağlanabilmekte ve elde edilen yüksek tabaka sayısı ile geleneksel kolonlarla ayrılması mümkün olmayan bileşenlerin ayrımı sağlanabilmektedir. Üstelik yarım metreye varan uzunluğuna rağmen monolitik kolonlardan alınan geri basınç değerleri, sadece bir tane geleneksel kolondan alınabilecek geri basınç değerinden bile düşük çıkmaktadır.

Çizelge 3. 1. Farklı uzunluklardaki monolitik kolonların geri basınçları (Merck 2010)

Kolon Uzunluğu (mm)	Geri Basınç (Bar)	Tabaka Sayısı
200	22	19000
300	33	27000
400	44	35000
500	54	41000

3.2. Monolitik Kolon Çeşitleri

Monolitik kolonlar, hazırlanması için kullanılmış olan materyallerin doğal yapısına göre birçok sınıfta sınıflandırılabilmektedirler. Buna bağlı olarak birçok monolitik malzeme sınıfından bahsedilebilmektedir fakat genel olarak organik ve inorganik bazlı monolitler olarak kategorize edilmektedirler (Nema ve ark 2014). Akrilamit (Hjertén ve ark 1989, Fujimoto 1995, Palm ve Novotny 1997) ve metakrilat (Peters ve ark 1997, 1998, 1998) gibi organik monomerler organik monolitler için kullanılırken; silika (Minakuchi ve ark 1998, Malik 2002, Tanaka ve ark 2002), titanyum (Konishi ve ark 2006, Ren ve ark 2006) ve zirkonyum (Randon ve ark 2006) gibi malzemeler de inorganik monolit malzemelerin hazırlanmasında kullanılmaktadır.

3.2.1. Organik monolitler

Polimer bazlı organik monolitler, boş bir kromatografi kolonu veya bir kapiler tüp içerisinde uygun bir monomer, çözücü ve başlatıcı kullanılarak hazırlanan çözeltinin, metoduna göre ısı ya da UV ışığa maruz bırakılarak başlatılan polimerizasyon ile organik monolitin kolon içerisinde sentezi ile elde edilmektedir (Rieux ve ark 2005).

Genel olarak organik monolitler, metakrilat, akrilamit ve stiren monomerleri kullanılarak sentezlenmektedirler. Polimer bazlı monolitlerden elde edilen monolitik kolonlar genellikle proteinlerin, polipeptitlerin, oligonükleotitlerin, sentetik polimerlerin ve bazı küçük moleküllerin (Gusev ve ark 1999) RP ve iyon değştirme kromatografi teknikleri kullanılarak yüksek hızlarda ayrımlarında kullanılmaktadırlar. Geleneksel polimer tabanlı kolonlarla karşılaştırıldığında polimer monolitik kolonlar daha yüksek ayırma verimliliğine ve daha az şişme problemlerine sahip olmaktadırlar (Nema ve ark 2014). Ayrıca polimer monolitik kolonlar, RP kromatografi şartlarında ulaşılan aşırı yüksek pH değerlerini de (pH 1-14) tolere edebilmektedirler.

3.2.2. Silika monolitler

Silikon alkoksit temelli monolitik malzemeler genellikle, sentezlenen monolitin morfolojisi ve kompozisyonu üzerinde tam kontrol imkanı verdiği için sol-jel yöntemi kullanılarak elde edilmektedir. Sentez reaksiyonu, $Si(OR)_4$ polimerizasyon başlatıcısının içerisinde siloksan (Si-O-Si) karışımının hazırlanması ile başlamaktadır. Ardından hidroliz, kondenzasyon ve faz ayrımı basamakları gerçekleştirilerek silika tabanlı monolit malzeme elde edilmektedir (Šefčik ve McCormick 1997). Elde edilen monolit, geleneksel kolon doldurma teknikleri kullanılarak kromatografi kolonu haline getirilmektedir.

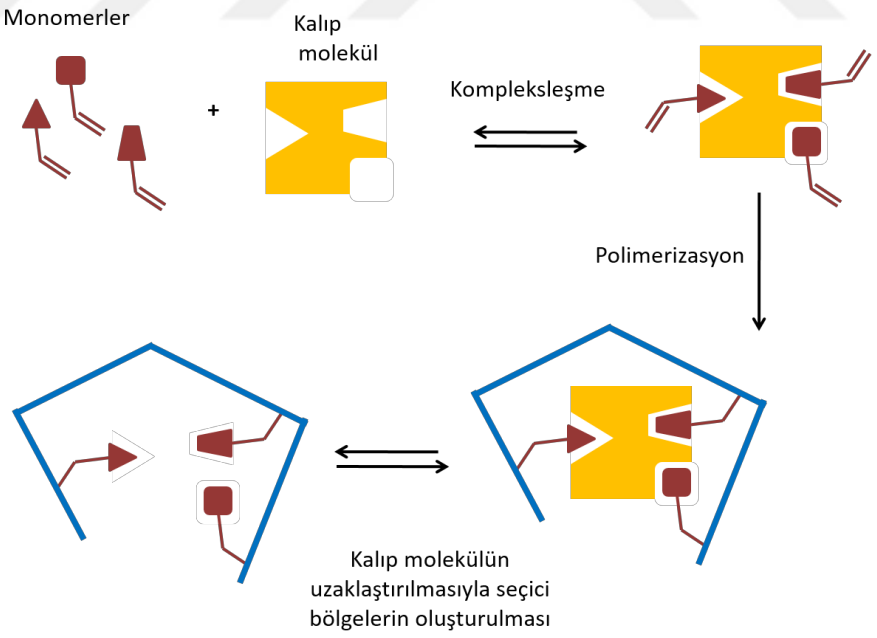
3.2.3. Hibrit monolitler

Organik-inorganik karışımı olan hibrit monolit malzemeler, bir seri hidroliz ve polikondenzasyon reaksiyonları içeren sol-jel tekniği kullanılarak elde edilmektedir (Hench ve West 1990). Hazırlanma prosedürü silika monolitlerin hazırlanması ile aynıdır. Tek farkı, istenilen özellikteki sabit fazın elde edilmesi için silika iskeletine organik bir bileşenin kopolimerizasyonudur (Nema ve ark 2014). Organik ve inorganik monolitlerden tamamen farklı olmakta ve ayırma metoduna göre her ikisinin özelliklerine kısmen sahip olabilmektedir.

Sol-jel yöntemi ile elde edilmiş olan hibrit monolit malzemeler, geleneksel silika monolit malzemelerle karşılaştırıldığında birçok avantaja sahip olduğu görülmüştür. Sol-jel hibrit monolitler, arzu edilen ayırma özelliklerine göre tasarlanmıştır ve kolon

verimliliği, stabilitesi ve seçiciliği gibi önemli ayırma parametrelerine etki edebilecek olumsuzlukları daha kolay egale edebilmektedir.

Hibrit monolit malzemelerin bir diğer önemli uygulama alanı ise moleküler baskılanmış monolitik kolonlardır. Ayrılması istenen bileşene özel üç boyutlu bir yapı oluşturan ve moleküler baskılama tekniği adı verilen bu teknikte ilk önce uygun bir monomer uygun bir çözücüde çözülmektedir. Ardından çapraz bağlayıcı ve gözenek oluşturucu maddelerin ilavesi ile polimerleşmeye hazır çözelti elde edilmiş olur. Ayrılması istenen maddenin saflaştırılmış hali de (kalıp molekül) bu çözeltiye ilave edildikten sonra polimerleştirme işlemi uygun bir teknikle başlatılır. Polimerleşme işlemi bittikten sonra uygun bir çözücü vasıtasıyla monolit içerisinde tutulmuş ayrılması istenen bileşik molekülleri gözenekli yapıdan ayrılır (Liu ve ark 2007). İşlemin sonunda, ayrılması istenen bileşene özgü boşluklar içeren ve sadece bu bileşeni tutabilen spesifik bir hibrit monolitik malzeme elde edilmiş olur. Moleküler baskılanmış polimerler, doğal reseptörlere yakın ölçüde seçiciliğe, afiniteye, doğal moleküllere göre yüksek kararlılığa, kolay hazırlanabilme ve uygulanabilme özelliklerine sahiptir. Şekil 3.8'de moleküler baskılama tekniğinin temel basamakları gösterilmiştir.



Şekil 3. 8. Moleküler baskılama tekniğinin temel basamakları

4. KAYNAK ARAŞTIRMASI

4.1. Zeytinyağı Deoderize Distilatı ve Bileşimi

Yenilebilir yağların rafinasyonunda deoderizasyon basamağında elde edilen DD, içerdiği önemli biyoaktif bileşenler sebebiyle bilim insanları tarafından birçok araştırmaya konu olmuş ve çalışmalar yapılmıştır. Fakat zeytinyağlarının rafinasyonundan elde edilen OODD'ler hakkında diğer distilatlara göre daha az çalışma yapılmıştır. Günümüze kadar yapılan çalışmalar kronolojik olarak irdelenmiştir.

Bondioli ve arkadaşları (Bondioli ve ark 1993) yapmış oldukları çalışmalarında zeytinyağı distilatından skualen eldesi için yeni bir metot geliştirmişlerdir. Geliştirmiş oldukları prosese göre ilk önce distilatta bulunan FFA'ni ve metil ve etil esterlerini TG türevlerine çevirmişlerdir. Ardından süperkritik karbondioksit kullanarak TG türevlerini ekstrakte etmişler ve geriye skualence zengin bir fraksiyon kalmasını sağlamışlardır. Pilot tesis kullanarak gerçekleştirdikleri çalışmalarında zeytinyağı DD'ından yüksek saflıkta ve %90'lara varan verimlerde skualen elde etmeyi başarmışlardır. Çalışmalarında kullandıkları OODD'ının kimyasal kompozisyonu Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4. 1. İlgili çalışmada kullanılan OODD'ının kimyasal bileşimi (Bondioli ve ark 1993)

Kimyasal bileşen	Kütlece oranı (%)
FFA (oleik asit cinsinden)	34.2
Hidrokarbonlar (skualen)	31.5
Metil ve etil yağ asit esterleri	24.1
Steroller	4.6
Diğerleri (Gliseritler, tokoferoller)	5.6

Abdalla (Abdalla 1999) gerçekleştirmiş olduğu çalışmasında OODD'dan elde edilen sabunlaşmayan maddelerin, kızartma esnasında ayçiçek yağının stabilitesine olan etkilerini ve elde edilen patates cipsinin kalitesine olan etkilerini incelemiştir. Çalışma kapsamında, 10 gün süreyle 180 ^{o}C'de kızartma işlemine tabi tutulan farklı konsantrasyonlarda sabunlaşmayan madde içeren ayçiçeği örneklerinin fiziksel ve kimyasal özellikleri incelenmiştir. Çizelge 4.2'de çalışmada kullanılmış olan OODD'ın kimyasal kompozisyonu; Çizelge 4.3'de ise 180 ^{o}C'de gerçekleştirilen kızartma işlemi sonucu OODD'nın sabunlaşmayan madde kısmının ayçiçek yağının kimyasal ve fiziksel özellikleri üzerine olan etkileri verilmiştir.

Çizelge 4. 2. İlgili çalışmada kullanılan OODD'nın kimyasal bileşimi (Abdalla 1999)

Genel kompozisyon	
Bileşen	**%**
Nem	0.10
FFA (oleik asit cinsinden)	30.40
MG ve DG'ler	32.80
Sabunlaşmayan madde	36.70
Sabunlaşmayan madde kompozisyonu	
Bileşen	**g/kg distilat**
Skualen	284.2
Toplam sterol	48.4
Kampesterol	1.2
Stigmasterol	0.5
β-sitosterol	42.7
Avenasterol	3.8
Toplam tokoferol	18.1
α-tokoferol	17.1
γ-tokoferol	1.1

Çizelge 4. 3. İlgili çalışmada kızartma işlemi sonucu OODD'nın sabunlaşmayan madde kısmının ayçiçek yağının kimyasal ve fiziksel özellikleri üzerine olan etkileri (Abdalla 1999)

Kızartma süresi (gün)	**40 °C'deki kırma indisi**	**400 nm'deki renk**	**İyot sayısı**	**Peroksit sayısı (meg/O_2)**	**FFA (oleik asit)**	**Anisidin sayısı**	**% Toplam polar bileşen**	**UV absorbans**	
								234 nm	**268 nm**
Ayçiçek yağı									
0	1.4725	0.03	128.5	1.15	0.11	1.42	4.85	0.06	0.02
1	1.4730	0.05	120.2	19.88	0.48	14.10	7.18	0.12	0.03
4	1.4736	0.06	115.1	26.85	0.65	25.56	20.80	0.22	0.04
6	1.4742	0.08	112.2	24.87	0.88	31.72	31.72	0.21	0.06
8	1.4750	0.12	110.2	23.79	1.15	35.15	36.16	0.20	0.16
10	1.4762	0.18	108.3	22.80	1.55	46.40	43.60	0.22	0.20
Ayçiçek yağı + %1.0 SM*									
0	1.4725	0.04	128.4	1.66	0.15	1.78	4.92	0.07	0.02
1	1.4728	0.03	127,6	4.15	0.40	4.72	4.26	0.07	0.02
4	1.4728	0.03	126.9	8.10	0.50	12.98	6.60	0.08	0.03
6	1.4732	0.04	126.1	8.65	0.60	12.22	8.40	0.08	0.03
8	1.4733	0.04	125.6	9.55	0.70	14.14	13.65	0.10	0.04
10	1.4740	0.06	124.4	9.90	0.80	19.25	17.18	0.10	0.05

Kızartma yağına %1 oranında ilave edilen sabunlaşmayan maddenin, yağda oksidasyona bağlı bozulmaları engellemede en etkili oran olduğu bulunmuştur. Bu antioksidatif etkinin ise OODD'nın sabunlaşmayan kısmını oluşturan skualen, Δ-avenasterol ve tokoferol bileşenlerinden ileri geldiği öne sürülmüştür. Ayrıca 10 gün süreyle aynı yağda gerçekleştirilen kızartma işlemi sonunda yağdaki skualen miktarının %79, tokoferol ve Δ-avenasterol türlerinin ise %69 oranında azaldığı tespit edilmiştir.

Akgün (Akgün 2011) gerçekleştirmiş olduğu çalışmasında OODD'ndan skualenin ayrılması için süperkritik akışkanların kullanıldığı entegre bir metot geliştirmiştir. İlgili metoda göre ilk önce süperkritik metanol kullanarak distilatı esterleştirmiş ve ardından %66 oranında metil esterlerine dönüşen numuneden süperkritik CO_2 vasıtasıyla skualeni ekstrakte etmiştir. En yüksek ekstraksiyon verimini elde etmek amacıyla basınç, sıcaklık ve süre gibi ekstraksiyon parametrelerini yüzey grafikleri ve kemometrik yöntemler kullanarak optimize etmiştir. İlgili parametrelerin optimum değerlerini sıcaklık için 52.05 °C, basınç için 104.8 bar ve süre için 180 dk olarak tespit etmiştir. Günümüzde ticari olarak derin deniz köpekbalıklarının karaciğer yağından elde edilen skualen için bitkisel ve kolay ulaşılabilir bir kaynak ve metot geliştirmişlerdir.

Hernandez (Hernández ve ark 2011) grubu ile birlikte yapmış olduğu çalışmada OODD'ndan skualen eldesi için tarımda çokça kullanılan bir kimyasal olan etil laktatın potansiyel ekstraksiyon kabiliyetini incelemişlerdir. Bu inceleme için skualen+etil laktat, zeytinyağı-etil laktat ve skualen+zeytinyağı+etil laktat tan oluşan üç sıvı-sıvı karışımın etil laktat ile ekstraksiyonunu deneysel ve modellemeli olarak incelemişlerdir. Elde ettikleri sonuçlara göre skualen+TG karışımlarından skualenin ekstraksiyonu için çevreci bir çözücü olan etil laktatın yüksek bir potansiyele sahip olduğu tespit edilmiştir.

Gutierrez (Gutiérrez ve ark 2014) arkadaşları ile yapmış olduğu çalışmasında, fiziksel rafinasyon sonucu elde edilen OODD'ndan skualenin eldesi için kapalı bir vakum distilasyon sistemine sahip bir basınçlı asidik esterifikasyon metodu geliştirmişlerdir. Yaptıkları çalışmalar sonucunda esterifikasyon işlemi için optimum sıcaklığı 122 ^{o}C; skualen verimini ise %78 olarak tespit etmişlerdir. Çizelge 4.4'de çalıştıkları OODD'nın kimyasal analiz sonuçları verilmiştir.

Çizelge 4. 4. İlgili çalışmada kullanılan OODD'nın kimyasal bileşimi (Gutiérrez ve ark 2014)

Genel kompozisyon	
Bileşen	**Kütlece oranı (%)**
FFA (oleik asit cinsinden)	66.67
MG	0.02
DG	0.05
TG	0.80
Skualen	13.00
Alifatik vaks	1.02
Sterol ve triterpen vaksları	0.96
Diğerleri (vitaminler, fenolik bileşenler, bozulma ürünleri)	17.48
Yağ asidi profili	
Yağ asidi	**Kütlece oranı (%)**
C14:0	0.16
C16:0	16.32
C18:0	3.19
C18:1	59,22
C18:2	10.47
C18:3	2.14
C20:0	0.93
C20:1	1.19
C22:0	0.17
C22:1	6.22

Rocha ve arkadaşları (Rocha ve ark 2014) yapmış oldukları çalışmada kolin hidrojen karbonat ve süperkritik karbondioksit kullanarak OODD'ndan FFA'ları ayırmayı hedeflemişlerdir. İki ana aşamadan oluşan çalışmalarında ilk aşamada OODD içerisindeki FFA'ları kolin hidrojen karbonat kullanarak nötralize etmişler ve kozmetik endüstrisinde değerli bir bileşen olan kolin karboksilat türevlerine dönüştürmüşlerdir. İkinci aşamada ise süperkritik karbondioksit ekstraksiyonu kullanılarak kolin karboksilatlar hariç OODD'ndaki diğer türler uzaklaştırılmış ve kolin karboksilatca zengin OODD elde edilmiştir. Çizelge 4.5'te kullanılmış olan OODD'nın kimyasal kompozisyonu verilmiştir.

Çizelge 4. 5. İlgili çalışmada kullanılan OODD'nın kimyasal bileşimi (Rocha ve ark 2014)

Genel kompozisyon	
Bileşen	**Kütlece oranı (%)**
FFA (oleik asit cinsinden)	37.2
Skualen	31.2
Yağ asidi alkil esterleri	18.4
Diğer bileşenler (Alkilgliseritler, tokoferoller, steroller)	13.1
Yağ asidi profili	
Yağ asidi	**Kütlece oranı (%)**
C14:0	2.2
C16:0	12.4
C18:0	10.1
C18:1	60.3
C18:2	13.2
C18:3	1.8

Xynos ve arkadaşları (Xynos ve ark 2016) yapmış oldukları çalışmalarında santrifügal ayırma kromatografisi kullanarak tek aşamada OODD'ndan skualenin ayrılmasını çalışmışlardır. Ayırma işlemini, 4 saat içerisinde hedef bileşen olan skualenin ayrılmasını sağlayan 1L'lik preparatif kolon kullanarak ve heptan-asetonitril-bütanol den oluşan susuz tekfazlı çözücü sistemi kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Aynı zamanda bu çalışma ile OODD'ndaki ve saflaştırılmış formdaki skualenin miktarını belirlemek için hızlı bir ultra yüksek performanslı sıvı kromatografi-diodarray dedektör (UHPLC-DAD) sistemi geliştirmişlerdir. Çalışma sonuçlarına göre, skualen yüzdesi %23.4 olan başlangıç materyalinin ayırma sonunda skualen yüzdesi %95.5 olmuştur. Geliştirilmiş olan sistemin skualen ayrım gücü 234 mg/saat/L olarak tespit edilmiştir.

Cruz ve arkadaşları (Cruz ve ark 2016) yapmış oldukları çalışmalarında OODD'ndan üretilmiş orta uzunlukta zincire sahip polihidroksialkonatların (PHA) karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Çalışma kapsamında ilk defa OODD', *Pseudomonas resinovorans* bakterisi tarafından PHA üretimi için substrat olarak kullanılmıştır. %36 biyokütleden oluşan OODD 19 saat boyunca bakteri kültürüne tabi tutulmuştur. Süre sonunda 4.7 g/L PHA elde edilmiştir. Elde edilen PHA'nın kompozisyonu 3-hidroksioktanot (%48.3 mol), 3-hidroksidekanoat (%31.6 mol), 3-

hidroksihekzanoat (%12.1 mol) ve 3-hidroksi dodekanoat (%8.0 mol) olarak tespit edilmiştir. Ayrıca elde edilen PHA'nın, yapışkana benzer bir yapıda olduğu ve oda şartlarında katılaşmadığı görülmüştür. Çalışma sonunda elde edilen PHA'nın biyobazlı yapışkan olarak kullanılabileceği ileri sürülmüştür.

4.2. Gıda Analizlerinde Monolitik Kolonların Ters-Faz Ayrımları

RP kromatografi tekniği, moleküllerin polar olan ya da olmayan kısımlarındaki farklı etkileşimlerinden faydalanarak bileşenlerin ayrılmasını sağlayan bir tekniktir (Jandera 2013). Ayrıca düşük polariteye sahip bileşenlerin RP ayrımlarında organik hareketli fazlara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu teknik temelinde üretilmiş olan RP C18 silika monolitik kolonlar birçok organik bileşenin yüksek hassasiyetle ve düşük geri basınçlarla ayrılmasında başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Çizelge 4.6'da C18 silika monolitik kolonlar ile RP kromatografi şartlarında yapılmış olan ayrımlar verilmiştir.

Çizelge 4. 6. İlgili çalışmada C18 silika monolitik kolonlar ile RP kromatografi şartlarında yapılmış olan ayrımlar (Jandera 2013)

Analit	Matris	Monolitik kolon	Hareketli faz	Referans
Flavonoitler	Soya ekstraktları	Silika C18	Organik gradient	(Apers ve ark 2004, Repollés ve ark 2006, Manchón ve ark 2011)
Antosiyaninler	Kırmızı lahana	Silika C18	Organik gradient	(Arapitsas ve Turner 2008)
Fenolik asitler	Meyve olgunlaştırma prosesi	Silika C18	Organik gradient	(Biesaga ve ark 2007)
Fenolik koruyucular	Sağlık ürünleri	Silika C18	Organik gradient	(Ballesta-Claver ve ark 2007)
Askorbik asit, fenolik bileşikler, kakonin, solanin	Patates	Silika C18	Organik gradient	(Shakya ve Navarre 2006)
Askorbik asit	Çilek ekstraktları	Silika C18	Organik gradient	(Walker ve ark 2006)
Sorbat ve benzoat katkıları	Alkolsüz içecekler	Silika C18	Asetonitril	(Can ve ark 2011)
A ve E Vitaminleri	İnsan kanı	Chromolith RP-18	Metanol-su gradienti	(Petr ve ark 2009)
Lisopen	Domates ve gıda ürünleri	Silika C18	Metanol-su gradienti	(Pól ve ark 2004)
TG'ler	Katı ve sıvı bitkisel yağlar	Chromolith RP-18	Asetonitril-izopropil alkol gradienti	(Lísa ve ark 2009)
Kafein	İçecekler ve kahve	Silika C18	Asetonitril gradienti	(Tzanavaras ve Themelis 2007)
Teobromin, teofilin, kafein	Alkolsüz içecekler, bitkisel ürünler, farmasötikler	Chromolith RP-18	Asetonitril gradienti	(Tzanavaras ve ark 2010)
Veteriner ilacı nitrofuran	Çiftlik suyu ve hayvan yemleri	Silika C18	Asetonitril gradienti	(Viñas ve ark 2007)
Sefalosporin antibiyotiği	İlaç kalıntıları	Silika C18	Asetonitril gradienti	(Karageorgou ve Samanidou 2010)
Kabuklu yemiş allerjenleri	Reçel ve bisküviler	Silika C18	Asetonitril gradienti	(Bignardi ve ark 2010)
Aflatoksinler	Gıda kirleticileri	Chromolith RP-18	Asetonitril gradienti	(Khayoon ve ark 2012)
Arsenobetain, dimetil arsenit, metil arsonat	Üre ve gıda	Chromolith RP-18	Fosfat tamponunda tetrabütilamonyum bromit	(Pearson ve ark 2007)
Protein profilleri	Gıda ürünleri	Chromolith RP-18	Asetonitril gradienti	(Rodríguez-Nogales ve ark 2009)
Peptitler	Triptik sindirim	4-silika C18 kapiler	Asetonitril gradienti	(Eghbali ve ark 2011)
Fenoksikarb, permetrin	Veteriner ilaçları	Silika C18	Asetonitril-su	(Chocholouš ve ark 2008)

4.3. Problemin İfadesi ve Doktora Tezinin Amacı

Zeytinyağı üretiminde lider ülkeler arasında olan ülkemizde direkt kullanımı uygun olmayan binlerce ton zeytinyağı fiziksel ya da kimyasal rafinasyon yöntemleriyle kullanıma uygun hale getirilmektedir. Bu işlemler esnasında birçok kademede önemli yan ürünler oluşmaktadır. Bunlardan en önemlisi ve en büyük katma değere sahip olanı, deoderizasyon kademesinde meydana gelen deoderize distilattır. Yağa koku, tat-aroma, asitlik ve renk veren maddelerin uzaklaştırıldığı bu aşamada, ulaşılan yüksek sıcaklıklar sebebiyle, zeytinyağında yüksek miktarlarda bulunan başta tokoferol, sterol ve skualen v.b., maddeler olmak üzere doğal antioksidan özelliğine sahip ve yağda bulunması istenen çeşitli biyoaktif bileşenler yağdan uzaklaşıp distilata geçmekte ve atık olarak değerlendirilmektedir. İlgili biyoaktif bileşenlerin en önemlileri tokoferol türevleri (α-, β-, γ-, δ-), sterol türevleri (Birassikasterol, kampesterol, stigmasterol, sitosterol) ve skualendir. Yüksek katma değere sahip olan ve genellikle ithal edilen bu önemli biyoaktif bileşenlerin distilat içerisindeki türlerinin ve miktarlarının kolaylıkla belirlenebilmesi için hızlı ve ucuz bir analiz metodunun geliştirilmesi, bu maddelerin geri kazanılması ve değerli ürünlere dönüştürülmesi açısından ayrı bir öneme sahip olmaktadır.

Literatürde yapılmış olan çalışmalar incelendiğinde, yenilebilir yağların rafinasyonu sonucu elde edilen deoderize distilatlar hakkında birçok çalışma yapılmış fakat zeytinyağından elde edilen deoderize distilatlarla ilgili çok az araştırma yapılmıştır. Yapılan araştırmalar ise ağırlıklı olarak OODD'nın skualen miktarının incelenmesi veya kullanılması üzerine olmuştur. OODD'nin kimyasal bileşenleri ve başta tokoferol, tokotrienol, sterol olmak üzere önemli birçok biyoaktif bileşenler hakkında yeterli bilgiler elde edilememiştir.

Düşük geri basınç ve üstün ayırma özellikleri ile monolitik kolonlar, birçok gıda numunesinin biyoaktif bileşenlerinin RP kromatografi şartları ile tayin edilmesinde kullanılmıştır. Fakat deoderize distilatların özellikle OODD'nın biyoaktif bileşenlerinin tayini için monolitik kolonların kullanıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Yapılmış olan bu doktora tezi, yenilebilir yağların ve DD'larının tüm biyoaktif bileşenlerini tek bir analizle tayin edebilecek yeni metotlar içeren ilk çalışma olması bakımından büyük önem arz etmektedir.

Bu doktora tezi ile birinci basamakta, OODD numunesinin

- Nem miktarı
- FFA miktarı
- IV değeri
- PV değeri
- AV değeri
- TV değeri
- Birincil ve ikincil oksidasyon ürünleri
- Yağ asidi kompozisyonu
- TG kompozisyonu
- Polar ve apolar madde tayini
- Polimerik madde tayini
- Tokoferol analizi
- Tokotrienol analizi
- Sterol analizi
- Skualen analizi

gibi önemli parametreleri, ilk defa kombine olarak ve uluslararası standart metotlar kullanılarak tayin edilmiştir.

İkinci basamakta ise;

- OODD numunesinin FFA ve IV değerlerinin FT-IR spektroskopisi ile kantitatif olarak tayini,
- EVOO'nın FFA değerinin FT-IR spektroskopisi ile kantitatif olarak tayini,
- EVOO'nın FT-IR spektroskopisi ile sınıflandırılması ve doğrulanması

gibi FT-IR spektroskopisinin kullanıldığı yeni metotlar geliştirilmiştir.

Üçüncü ve son basamakta ise her biri ayrı bir standart metotla tayin edilebilen

- Sterol
- Tokoferol
- Tokotrienol
- Skualen
- FFA
- MG
- DG
- TG

türlerinin monolitik kolon kullanarak ve kemometrik yöntemlerden faydalanarak tek bir analizle tayin edilebilmesine imkan veren yeni kromatografik metotlar geliştirilmiş ve literatürde bulunan önemli bir boşluk doldurularak yağ endüstrisi ve bilim dünyası için önemli çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

5. MATERYAL VE YÖNTEM

5.1. Kullanılan Kimyasallar ve Çözücüler

Deneysel çalışmalarda kullanılan tüm kimyasallar ve çözücüler metoduna göre analitik veya kromatografik saflıkta olup başlıca Merck, Fluka, Sigma-Aldrich, Supelco ve LabScan firmalarından temin edilmiştir (Çizelge 5.1).

Çizelge 5. 1. Kullanılan Kimyasallar ve Çözücüler

Analiz Adı	Kullanılan Kimyasallar
FFA, IV ve PV Analizleri	Etanol
	Dietileter
	Sodyumhidroksit
	Fenolftalein
	Karbontetraklorür
	Civa(II)asetat
	Wijs reaktifi
	Potasyumiyodür
	Sodyumtiyosülfat
	Nişasta
	Kloroform
	Asetikasit
İnfrared (IR) Analizleri	Standart Oleik asit
	Etanol
Birincil ve İkincil Oksidasyon Ürünlerinin Tayini ve Anisidin Sayısının Tayini	İzooktan
	p-Anisidin
	Sodyumsülfit
	Aktif karbon
Yağ Asidi Kompozisyonunun Tayini	Metanol
	Potasyumhidroksit
	Hekzan
	Susuz sodyumsülfat
	Standart FFA karışımı
TG Kompozisyonunun Tayini	Aseton
	Asetonitril
Polar ve Apolar Madde Tayini	Silikajel
	Petroleteri
	Dietileter
	Tetrahidrofuran
Polimerik Madde Tayini	Tetrahidrofuran
Tokoferol-Tokotrienol Miktarının Tayini	n-Heptan
	Tersiyerbütilmetileter
	Standart α-Tokoferol ve α-Tokotrienol
	Standart β-Tokoferol ve β-Tokotrienol
	Standart γ- Tokoferol ve γ-Tokotrienol
	Standart δ-Tokoferol ve δ -Tokotrienol
Sterol Miktarının Tayini	Standart α-kolestanol
	Standart Kampesterol
	Standart Stigmasterol
	Standart β-Sitosterol
	Etanol

	Potasyumhidroksit
	Dietileter
	Ultra Saf su
	Kloroform
	Susuz piridin
	Bis(trimetilsilil)trifloroasetamit
	Hidrojen gazı
	Kuru hava
	Helyum gazı
	Metanol
Skualen Miktarının Tayini	Aseton
	Asetonitril
	Metanol
	Standart skualen
Monolitik Kolon Analizleri	Standart Oleik asit
	Standart α-Tokoferol ve α-Tokotrienol
	Standart β-Tokoferol ve β-Tokotrienol
	Standart γ- Tokoferol ve γ-Tokotrienol
	Standart δ-Tokoferol ve δ -Tokotrienol
	Standart Kampesterol
	Standart Stigmasterol
	Standart β-Sitosterol
	Standart skualen
	Ultra Saf su
	Metanol
	Aseton
	Asetonitril

5.2. Kullanılan Enstrümantal Cihazlar

Deneysel çalışmalarda kullanılan tüm cihazlar Çizelge 5.2'de verilmiştir.

Çizelge 5. 2. Kullanılan enstrümental Cihazlar

Cihaz Adı	**Marka-Model**
Santrifüj Cihazı	Mse-Mistral2000
Karıştırıcı	IsoLab
Vorteks	IsoLab
Ultra Saf Su Cihazı	Tka-GenPure
Etüv	Mido-2/AL
Hassas Terazi	Gec-Avery
Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı	Ika-Rct Classic
Mantolu Isıtıcı	LabHeat
Ultrasonik Banyo	Kudos
Döner Buharlaştırıcı	Buchi-Rotavapor R210
Buzdolabı	Arçelik
Bulaşık Makinası	Bosch
HPLC	Agilent-1200 Series
Alev İyonlaşma Dedektörlü GC Cihazı (GC-FID)	Agilent-7890 Series
Kütle Spektrofotometresine Sahip GC Cihazı (GC-MS)	Agilent-7890N/5975C
Ultraviyole-görünür alan Spektrofotometre Cihazı	Shimadzu
Tekli zayıflatılmış toplam yansıma fourier dönüşümlü infrared Spektrofotometre (SB-ATR-FT-IR) Cihazı	Bruker-Alpha
Fourier dönüşümlü infrared Spektrofotometre (FT-IR) Cihazı	Bomem-MB Series
Fourier dönüşümlü yakın infrared Spektrofotometre (FT-NIR) Cihazı	Bomem-MB Series
ATR-IR Taşınabilir IR Spektrofotometre Cihazı	IRSphinx
Taşınabilir Raman Spektrofotometre Cihazı	Bruker-Bravo

5.3. Kullanılan Numuneler

Deneysel çalışmalarda kullanılan tüm numuneler Çizelge 5.3'de verilmiştir.

Çizelge 5. 3. Kullanılan Numuneler

Numune Adı
OODD
10 Adet Farklı Marka EVOO
Ekstra hafif rafine zeytinyağı (ELOO)
Rafine Mısır Yağı
Ham Hindistan Cevizi Yağı
Rafine Avokado Yağı
Rafine Kanola Yağı
Ham Palm Yağı (HPY)
Rafine Yerfıstığı Yağı
Rafine Ayçiçek Yağı (RAY)
Rafine Soya Yağı (RSY)

5.4. Zeytinyağı Deoderize Distilatının Fiziksel ve Kimyasal Bileşenlerinin Uluslararası Standart Metotlarla Tayini

5.4.1. Nem miktarının tayini

OODD'nın nem miktarı, Resmi analitik kimya derneği (AOAC)'nin nem tayini metoduna göre (AOAC 1990) yapılmıştır. İlgili metoda göre, virgülden sonra dördüncü hanesine kadar hassasiyetle tartılmış olan distilat numunesi 105 ^{o}C'deki etüvde 3 saat süre ile bekletilmiştir. Ardından desikatörde soğutularak tekrar tartılmış ve nem miktarı Denklem 5.1'e göre hesaplanmıştır.

$$\%\text{Nem} = \frac{A-B}{m} x100 \quad (5.1)$$

A: Distilatın etüve konmadan önceki ağırlığı
B: Distilatın etüvden alındıktan sonraki ağırlığı
m: Numune miktarı

5.4.2. Serbest yağ asidi miktarının titrimetrik tayini

OODD'nın ve çalışma kapsamında incelenen diğer yağ numunelerinin FFA miktarları, AOCS'nin Ca 5a-40 kodlu standart titrasyon metoduna göre (AOCS 2017) gerçekleştirilmiştir. İlgili metoda göre, 1 g numune virgülden sonra dördüncü hanesine kadar hassasiyetle tartılmış ve içerisinde 20 mL %50-50 etanol-dietileter olan erlene alınarak çözülmüştür. Ardından etanolde çözülmüş ayarlı 0.05 N NaOH çözeltisi ile fenolftalein indikatörlüğünde renk dönümüne kadar titre edilmiştir. Titrasyonda harcanan sarfiyattan faydalanılarak numunedeki FFA miktarı, Denklem 5.2.'ye göre kütlece %oleik asit cinsinden hesaplanmıştır.

$$\%FFA = \frac{N.V.FA}{m.10} \quad (5.2)$$

N: NaOH'ın normalitesi
V: Titrasyon sarfiyatı
FA: Oleik asidin formül ağırlığı
m: Numunenin g ağırlığı

5.4.3. İyot sayısının titrimetrik tayini

İyot sayısı (IV), yenilebilir yağların doymamışlık derecesinin bir ölçütü olarak kullanılmakta ve 100 g yağın bağlayabileceği iyodun g cinsinden miktarı olarak tanımlanmaktadır. OODD'nın ve çalışma kapsamında incelenen diğer yağ numunelerinin iyot sayıları, AOCS'nin Cd 1-25 kodlu standart titrasyon metoduna göre (AOCS 2017) gerçekleştirilmiştir. İlgili metoda göre, 0.2 g numune virgülden sonra dördüncü hanesine kadar hassasiyetle tartılmış ve üzerine 15 mL CCl_4, 10 mL %5'lik $Hg(CH_3COO)_2$ ve 25 mL Wijs reaktifi ilave edilerek erlende çözülmüştür. Ardından 3 dk karanlık bir ortamda bekletildikten sonra 1.990 g KI ilave edilmiştir. Karıştırıldıktan sonra 100 mL saf su ilave edilmiş ve 0.1 N $Na_2S_2O_3$ ile renk açılana kadar titre edilmiştir. Renk açıldıktan sonra ise 3 damla %1'lik nişasta çözeltisi ilavesi yapılmış ve ayarlı 0.1 N $Na_2S_2O_3$ ile titre edilmiştir. Ayrıca bir de şahit deneme yapılarak IV, Denklem 5.3'e göre hesaplanmıştır.

$$\text{İ}yot\ sayısı = \frac{N.(V2-V1).12.7}{m} \qquad (5.3)$$

N: $Na_2S_2O_3$'ün normalitesi
V2: Numune için harcanan titrasyon sarfiyatı
V1: Şahit için harcanan titrasyon sarfiyatı
m: Numunenin g ağırlığı

5.4.4. Birincil ve ikincil oksidasyon ürünlerinin spektroskopik tayini

OODD ve EVOO yağı numunelerindeki birincil (As_{232}) ve ikincil (As_{270}) oksidasyon bozunma ürünlerinin (hiperoksitler, aldehit ve keton türevleri vb.) miktarlarını tespit etmek amacıyla gerçekleştirilen özgül absorbans tayinleri, çift ışın yollu Shimadzu marka Ultraviyole-görünür alan Spektrofotometre (Şekil 5.1) kullanılarak, Alfa Laval metoduna göre tespit edilmiştir (Laval 1995).



Şekil 5. 1 Shimadzu marka Ultraviyole-görünür alan Spektrofotometre

Öncelikle cihazının her iki hücresine izooktan konularak sıfırlama yapılmıştır. Daha sonra, 10 mL izooktanda çözülen ve virgülden sonra dördüncü hanesine kadar hassasiyetle tartılmış 0.05 g numune spektrofotometre cihazının küvetine doldurulmuş ve spektrum taramasından geçirilmiştir. Spektrum taraması sonunda 232 ve 270 nm dalga boylarında okunan absorbans değerleri, Denklem 5.4 ve 5.5 kullanılarak birincil ve ikincil oksidasyon ürünlerinin miktarlarının hesaplanmasında kullanılmıştır.

$$As232 = \frac{A232}{m.10} \quad (5.4)$$

$$As270 = \frac{A270}{m.10} \quad (5.5)$$

A232: 232 nm'deki absorbans değeri
A270: 270 nm'deki absorbans değeri
m: Numunenin g ağırlığı

5.4.5. Peroksit sayısının titrimetrik tayini

Peroksit sayısı (PV), yenilebilir yağların oksidasyon derecesini gösteren bir parametredir ve yenilebilir yağlarda bulunan aktif oksijen miktarının bir ölçütü olup, 1 kg yağda bulunan peroksit oksijeninin miliekivalent gramı olarak tanımlanmaktadır. Yağların depolanmaları sırasında ortamda bulunan oksijenin, metal iyonlarının, sıcaklığın, ışığın ve benzeri faktörlerin katalitik etkileri sebebiyle yağ molekülleri daha küçük moleküllere parçalanmaktadır. PV, deoderizasyon işleminin etkin bir şekilde yapılıp yapılmadığını göstermektedir (MEB 2012).

OODD'nın ve çalışma kapsamında incelenen diğer yağ numunelerinin PV'ları, AOCS'nin Cd 8b-90 kodlu standart titrasyon metoduna göre gerçekleştirilmiştir. İlgili metoda göre, 10.0 g numune alınmış, 10 mL kloroform ve 15 mL asetik asit karışımdan çözülmüştür. Ardından 0.5 mL doymuş KI çözeltisi ilave edilmiş ve 3 dk karanlıkta bekletilmiştir. Bekletilmiş olan çözeltiye 3 damla ağırlıkça %1'lik nişasta çözeltisi ilave edilip 0.002 N ayarlı $Na_2S_2O_3$ ile renk açılana kadar titre edilmiştir. Ayrıca bir de şahit deneme yapılarak PV, Denklem 5.6'ya göre hesaplanmıştır.

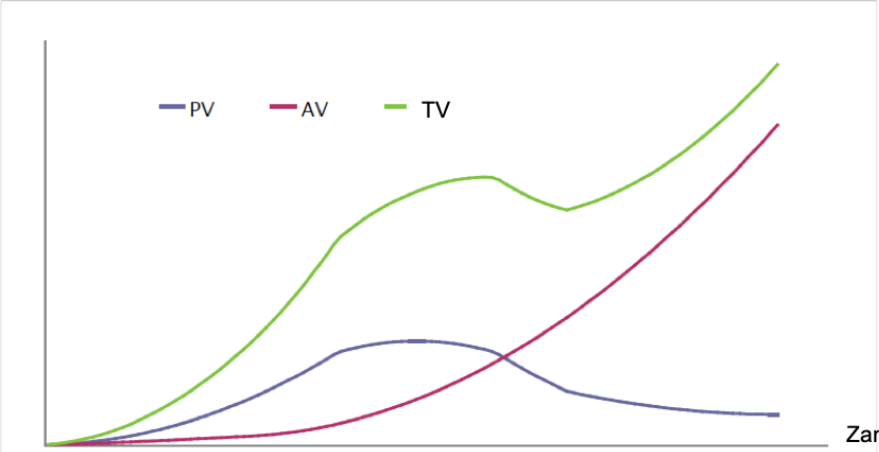
$$Peroksit\ sayısı = \frac{N.(V2-V1)x1000}{m} \quad (5.6)$$

N: $Na_2S_2O_3$'ün normalitesi
V2: Numune için harcanan titrasyon sarfiyatı
V1: Şahit için harcanan titrasyon sarfiyatı
m: Numunenin g ağırlığı

5.4.6. Anisidin ve totoks sayısının spektroskopik tayini

Anisidin sayısı (AV), uygun reaktif ve çözücü karışımında 1.00 g yağ içeren bir çözeltinin, 1 cm`lik ışın yoluna sahip bir küvette 350 nm`deki optik yoğunluğunun 100 katı olarak tanımlanmaktadır. AV, yağlardaki ikincil bozunma ürünlerinden olan aldehitler (2-alkenaller ve 2, 4-dienaller) ve ketonlar hakkında bilgi vermektedir. OODD ve EVOO yağı numunelerinin AV'nın tayini, AOCS'nin standart Cd 18-90 metodu (AOCS 2017) kullanılarak tayin edilmiştir.

Yenilebilir yağların oksidasyonunun belirlenmesi için en çok kullanılan değer PV'dir. Fakat yenilebilir yağların oksidasyonu sonucu ortaya çıkan peroksit türleri zamanla farklı aldehit ve keton türevlerine dönüşmekte ve aslında yüksek değerlerde olması gereken PV değeri gittikçe düşer gibi ya da sabit kalıyor gibi ölçülmektedir (Şekil 5.2). Bu sebeple AV ve özellikle totoks sayısı (TV) değeri yenilebilir yağların oksidasyon düzeylerinin belirlenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır. TV değeri, (AV + 2PV) formülü ile hesaplanmaktadır. TV değeri ne kadar düşük çıkarsa yenilebilir yağın kalitesi de o denli iyi olmaktadır. Yenilebilir yağların TV değerinin 10'dan küçük veya eşit olması önerilmektedir.



Şekil 5. 2. Yenilebilir bir yağın zamanla değişen oksidasyonunun PV, AV ve TV değerleri ile ölçümü (Miller 2016)

İlgili metoda göre ilk önce saflığından emin olunamayan p-anisidin saflaştırılmıştır. Saflaştırma işleminde 4.0 g p-anisidin 75 °C`de 100 mL suda çözülmüş, ardından 0.2 g sodyum sülfit ve 2.0 g aktif karbon ilave edilerek, aynı sıcaklıkta 5 dk boyunca karıştırılmıştır. Karıştırma işleminin ardından, elde edilen çözelti adi süzgeç kağıdından süzülmüştür. Süzüntü yaklaşık 0ºC'ye soğutulmuş ve bu sıcaklıkta bir gece boyunca beklemeye bırakılmıştır. Bekleme işlemi sonucunda elde edilen p-anisidin kristalleri, az miktarda saf suyla 0°C`de yıkanmış ve vakumlu etüvde kurutulduktan sonra, renkli bir cam şişeye konulmuştur. Saflaştırılan p-anisidin kristalleri, karanlıkta ve düşük bir sıcaklıkta (0-4ºC) saklamaya bırakılmıştır.

Hava ile teması önlenen virgülden sonra dördüncü hanesine kadar hassasiyetle tartılmış 0.5 g numune izo-oktanda çözülerek, hacmi 25 mL`ye tamamlanmıştır. Ultraviyole-görünür alan spektrofotometresinde (Şekil 5.5) gerçekleştirilen analizlerde; referans hücresine blank olarak çözücü (izo-oktan) konulmuş ve 350 nm`deki absorbansı (Ab) ölçülmüştür. İki adet test tüpü alınmış ve bir tanesine 5 ml numune çözeltisi, diğerine ise 5 ml çözücü konulmuş ve her iki tüpe de tam 1 ml p-anisidin reaktifi ilave edilerek, karıştırılmıştır. Reaksiyonun gerçekleşmesi için 10 dk beklenmiş ve çözücü-p-anisidin karışımını içeren çözelti referans hücresi bölmesine konarak numune çözeltisi-p-anisidin içeren çözeltinin 350 nm`deki absorbansı (As) ölçülmüştür. İki ölçüm arasındaki farktan faydalanarak yağ numunelerindeki AV değerleri Denklem 5.7'ye göre hesaplanmıştır:

$$AV = \frac{25.(1.2.As - Ab)}{m} \quad (5.7)$$

As: Yağ çözeltisinin p-anisidin ile reaksiyonundan sonra 350 nm'deki absorbansı
Ab: Çözücünün 350 nm'deki absorbansı
m: numunenin g ağırlığı

5.4.7. Yağ asidi kompozisyonunun gaz kromatografisi ile tayini

5.4.7.1. Numunelerin hazırlanması

OODD ve diğer numunelerin yağ asidi kompozisyonlarının tayininde, TG yapısında bulunabilen ve uçucu özellikte olmayan yağ asitleri, GC tekniği ile analiz edilebilmeleri için EC'nin 14105 nolu metoduna göre esterleştirme ön işlemine tabi tutulmuştur (EC 2011). İlgili metoda göre uygun ve temiz bir tüp içerisine analizi yapılacak numuneden yaklaşık 0.1 g tartılmış ve üzerine 0.1 mL 2 N metanollü KOH çözeltisi ilave edilmiştir. Bu şekilde KOH, TG'leri yağ asitlerine kadar parçalamıştır. Potasyum tuzu haline geçen yağ asitleri de metanolle birleşerek, metil esterlerini oluşturmuştur.



Şekil 5. 3. MSE Mistral 2000 santrifüj cihazı

Ardından 10 mL hekzan ilave edilerek 30 dk çalkalanmış ve santrifüj cihazında (Şekil 5.3) 2500 devir/dk santrifüjlenerek metil ester türevlerinin ayrılması sağlanmıştır. Esterleşen kısım dekantasyon işlemiyle başka bir tüpe alınmış ve yaklaşık 0.5 g susuz Na_2SO_4 ilave edilerek kalmış olabilecek nem absorplanmıştır. Esterleşen kısım tekrar

santrifüj cihazında 2500 devir/dk santrifüjlenerek Na_2SO_4'den ayrılmıştır. Yağ asidi metil esterlerini içeren kısım, 25 mm politetrafloroetilen (PTFE) şırınga filtreden geçirilmiş ve 1.5 mL hacme sahip kapaklı cam viallere doldurularak analize hazır hale getirilmiştir.

5.4.7.2. Kromatografik şartlar

Metil esteri türevlerine çevrilmiş olan numunelerin yağ asidi kompozisyonu analizleri, otomatik analiz yapabilen ve FID dedektörüne sahip Agilent 7890 (California (CA), Amerika Birleşik Devletleri (ABD)) GC cihazında (Şekil 5.4) gerçekleştirilmiştir.



Şekil 5. 4. Agilent 7890 GC sistemi

Cihaz, Chemstation (CA, ABD) yazılımı ile kontrol edilmiştir. Analize hazır numuneler HKara metoduna göre (Kara 2008) analiz edilmiştir. HKara metoduna ait kromatografik şartlar Çizelge 5.4'de verilmiştir.

Çizelge 5. 4. Yağ asit kompozisyonu tayini kromatografik şartları (Kara 2008)

Sabit Faz (Kolon)	Agilent HP-88 (100m, 0.25mm, 0.25 µm) (%88 siyanopropil)-metilarilpolisiloksan		
Hareketli Faz	He		
Hareketli Faz Akış Hızı (mL/dk)	1.3		
Dedeksiyon	FID Sıcaklık: 250 °C, Kuru hava: 300 mL/dk, Hidrojen: 30 mL/dk, Make up (He): 10 mL/dk		
Analiz Süresi (dk)	59.50		
Split	Splitless		
Enjeksiyon Miktarı (µL)	1		
Enjeksiyon Bloğu Sıcaklığı (°C)	280		
Kolon Fırını Sıcaklığı	°C/dk	°C	dk
		50	2
	4	240	10

5.4.7.3. Metodun kalibrasyonu

Analizlerden elde edilen sonuçların hesaplanması ve yağ asitlerinin yüzdelerinin tespit edilmesi amacıyla 37 adet yağ asidi metil-ester türevlerini (FAME) içeren standart FAME37 karışımı temin edilmiş ve Çizelge 5.4'deki parametrelere göre sisteme enjekte edilmiştir. Analiz sonucu elde edilen kromatogramdaki 37 adet standart yağ asidinin çıkış zamanları dikkate alınarak metot kalibre edilmiş ve pik alanları dikkate alınarak, yağ asidi yüzdeleri yazılım tarafından otomatik olarak tespit edilmiştir.

5.4.8. Trigliserit kompozisyonunun sıvı kromatografisi ile tayini

5.4.8.1. Numunelerin hazırlanması

OODD ve diğer numunelerin TG kompozisyonlarının tayini için AOCS'nin standart Ce 5b-89 metodu (AOCS 2017) kullanılmıştır. İlgili metoda göre uygun ve temiz bir tüp içerisine analizi yapılacak numuneden yaklaşık 1.0 g tartılmış ve 10 mL aseton içerisinde çözülmüştür. Ardından 25 mm PTFE şırınga filtreden geçirilmiş ve 1.5 mL hacme sahip kapaklı cam viallere doldurularak analize hazır hale getirilmiştir.

5.4.8.2. Kromatografik şartlar

Asetonda çözülerek analize hazır hale getirilmiş olan numunelerin TG kompozisyonu analizleri, otomatik analiz yapabilen ve ultraviyole-görünür alan dedektörüne (UV-VIS) sahip Agilent 1200 (CA, ABD) HPLC cihazında (Şekil 5.5) gerçekleştirilmiştir.



Şekil 5. 5. Agilent 1200 HPLC sistemi

Cihaz, Chemstation (CA, ABD) yazılımı ile kontrol edilmiştir. Analize hazır numuneler AOCS'nin standart Ce 5b-89 metoduna göre (AOCS 2017) analiz edilmiştir. İlgili metoda ait kromatografik şartlar Çizelge 5.5'de verilmiştir.

Çizelge 5. 5. TG kompozisyonu tayini kromatografik şartları (AOCS 2017)

Sabit Faz (Kolon)	ACE Excel 5 Super C18 4.6x250mm 2µm
Hareketli Faz	%50Aseton-%50Asetonitril
Hareketli Faz Akış Hızı (mL/dk)	1.5
Dedeksiyon	UV-VIS 210 nm
Analiz Süresi (dk)	100
Enjeksiyon Miktarı (µL)	10
Kolon Fırını Sıcaklığı (°C)	30
Ulaşılan Kolon Basıncı (Bar)	62

5.4.8.3. Metodun kalibrasyonu

TG kompozisyonları bilinen EVOO ve RSY, Çizelge 5.5'deki parametrelere göre sisteme enjekte edilerek TG türlerinin çıkış zamanları tespit edilmiş ve metot kalibre edilmiştir. Numunelerin analizi sonucu elde edilen kromatogramlardaki pik alanları dikkate alınarak, TG yüzdeleri yazılım tarafından otomatik olarak tespit edilmiştir.

5.4.9. Polar ve apolar madde miktarının sıvı kromatografisi ile tayini

5.4.9.1. Numunelerin hazırlanması

OODD ve diğer numunelerin polar ve apolar madde tayinleri için Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (IUPAC)'ın teknik raporu (Dobarganes ve ark 2000) kullanılmıştır. İlgili rapora göre numunelerin polar ve apolar kısımlarının ön ayrımı, hazırlanmış olan cam kolon vasıtası ile sağlanmıştır. Yaklaşık 5 g silika jel, 10 mL petrol eteri-dietil eter (90:10 v/v) içinde bulamaç haline getirilerek, cam kolona doldurulmuş ve ardından kolondan 5 mL petrol eteri-dietil eter (90:10 v/v) karışımı geçirilerek sabit faz temizlenmiştir. Daha sonra, 1 g numune, 8 mL petrol eteri-dietil eter (90;10 v/v) karışımında çözülmüş ve kolona verilmiştir. Oda sıcaklığında gerçekleştirilen ayırmalarda; kolondan ilk olarak apolar kısım elüe edilmeye çalışılmış, bu amaçla 60 mL petrol eteri-dietil eter (90:10 v/v) karışımı kolondan geçirilmiştir. Elüsyon işlemine, kolonda 1 mm çözücü kalana kadar devam edilmiş ve elüsyon sonunda toplanan çözeltinin döner buharlaştırıcı vasıtasıyla çözücüsü uzaklaştırılarak apolar kısım elde edilmiştir. Polar kısmın elüsyonu ise; 50 mL dietil eterin kolondan geçirilmesiyle sağlanmıştır. Elüsyon işlemine, kolonda 1 mm çözücü kalana kadar devam edilmiş ve elüsyon sonunda toplanan çözeltinin çözücüsü döner buharlaştırıcı vasıtasıyla uzaklaştırılarak polar kısmı elde edilmiştir. Elde edilen polar ve apolar kısımlar, 10 mL tetrahidrofuran (THF) ilavesi ile çözülmüş, 25 mm PTFE şırınga filtreden geçirilmiş ve 1.5 mL hacme sahip kapaklı cam viallere doldurularak analize hazır hale getirilmiştir.

5.4.9.2. Kromatografik şartlar

Hazırlanmış olan cam kolon vasıtası ile elde edilmiş polar ve apolar kısımlar, otomatik analiz yapabilen ve kırılma indisi dedektörüne (RID) sahip Agilent 1200 (CA,

ABD) HPLC cihazında (Şekil 5.5) gerçekleştirilmiştir. Cihaz, Chemstation (CA, ABD) yazılımı ile kontrol edilmiş ve yüksek performanslı boyut eleme kromatografisi (HPSEC) şartlarına göre hazırlanmıştır. Analize hazır numuneler IUPAC'ın teknik raporuna göre (Dobarganes ve ark 2000) analiz edilmiştir. İlgili teknik rapora ait kromatografik şartlar Çizelge 5.6'da verilmiştir.

Çizelge 5. 6. Polar ve apolar madde tayini kromatografik şartları (Dobarganes ve ark 2000)

Sabit Faz (Kolon)	Bir adet guard kolon ve iki adet seri bağlı 300x7,7 mm jel kolon: 500Å-100Å
Hareketli Faz	THF
Hareketli Faz Akış Hızı (mL/dk)	1.0
Dedeksiyon	RID 35 ºC
Analiz Süresi (dk)	20
Enjeksiyon Miktarı (µL)	20
Kolon Fırını Sıcaklığı (ºC)	30
Ulaşılan Kolon Basıncı (Bar)	62

5.4.9.3. Metodun kalibrasyonu

Polar ve apolar bileşenleri bilinen EVOO ve HPY, Çizelge 5.6'daki parametrelere göre sisteme enjekte edilerek polar ve apolar türlerinin çıkış zamanları tespit edilmiş ve metot kalibre edilmiştir. Numunelerin analizi sonucu elde edilen kromatogramlardaki pik alanları dikkate alınarak, polar ve apolar yüzdeleri yazılım tarafından otomatik olarak tespit edilmiştir.

5.4.10. Polimerik madde miktarının sıvı kromatografisi ile tayini

5.4.10.1. Numunelerin hazırlanması

OODD ve diğer numunelerin polimerik madde tayini için de IUPAC'ın teknik raporu (Dobarganes ve ark 2000) kullanılmıştır. İlgili metoda göre uygun ve temiz bir tüp içerisine analizi yapılacak numuneden yaklaşık 0.1 g tartılmış ve 10 mL THF içerisinde çözülmüştür. Ardından 25 mm PTFE şırınga filtreden geçirilmiş ve 1.5 mL hacme sahip kapaklı cam viallere doldurularak analize hazır hale getirilmiştir.

5.4.10.2. Kromatografik şartlar

THF içerisinde çözülerek analize hazırlanmış olan numuneler, otomatik analiz yapabilen ve RID dedektöre sahip Agilent 1200 (CA, ABD) HPLC cihazı (Şekil 5.5) kullanılarak analiz edilmiştir. Cihaz, Chemstation (CA, ABD) yazılımı ile kontrol edilmiş ve HPSEC şartlarına göre hazırlanmıştır. Analize hazır numuneler bir önceki analizde kullanılan IUPAC'ın teknik raporuna (Dobarganes ve ark 2000) göre analiz edilmiştir. İlgili metoda ait kromatografik şartlar Çizelge 5.6'da verilmiştir.

5.4.10.3. Metodun kalibrasyonu

Polimerik madde bileşenleri bilinen EVOO ve HPY, Çizelge 5.6'daki parametrelere göre sisteme enjekte edilerek polimerik türlerin çıkış zamanları tespit edilmiş ve metot kalibre edilmiştir. Numunelerin analizi sonucu elde edilen kromatogramlardaki pik alanları dikkate alınarak, polimerik madde yüzdeleri yazılım tarafından otomatik olarak tespit edilmiştir.

5.4.11. Tokoferol-tokotrienol miktarının sıvı kromatografisi ile tayini

5.4.11.1. Numunelerin hazırlanması

OODD ve diğer numunelerin tokoferol-tokotrienol miktarlarının tayini için AOCS'nin standart Ce 8-89 metodunun(AOCS 2017), Agilent tarafından EVOO'nın tokoferol-tokotrienol miktarlarının tayini için modifiye edilmiş hali (Agilent 2016) kullanılmıştır. İlgili metoda göre uygun ve temiz bir tüp içerisine analizi yapılacak OODD'den yaklaşık 0.2 g tartılmış ve 1000 mL n-heptan içerisinde çözülmüştür. Ardından 25 mm PTFE şırınga filtreden geçirilmiş ve 1.5 mL hacme sahip kapaklı cam viallere doldurularak analize hazır hale getirilmiştir.

5.4.11.2. Kromatografik şartlar

N-heptanda çözülerek analize hazır hale getirilmiş olan numunelerin analizi, otomatik analiz yapabilen ve FLD dedektöre sahip Agilent 1200 (CA, ABD) HPLC cihazında (Şekil 5.5) gerçekleştirilmiştir. Cihaz, Chemstation (CA, ABD) yazılımı ile

kontrol edilmiştir. Analize hazır numuneler Agilent'in metoduna göre (Agilent 2016) analiz edilmiştir. İlgili metoda ait kromatografik şartlar Çizelge 5.7'de verilmiştir.

Çizelge 5. 7. Tokoferol-tokotrienol tayini kromatografik şartları (Agilent 2016)

Sabit Faz (Kolon)	Teknokroma Lichrospher 100 Diol 5µm 250x4 mm
Hareketli Faz	%95n-Heptan-%5tersiyer bütil metil eter
Hareketli Faz Akış Hızı (mL/dk)	1.0
Dedeksiyon	FLD Uyarma: 298nm, Emisyon: 330nm
Analiz Süresi (dk)	45
Enjeksiyon Miktarı (µL)	10
Kolon Fırını Sıcaklığı (ºC)	35
Ulaşılan Kolon Basıncı (Bar)	45

5.4.11.3. Metodun kalibrasyonu

Tokoferol miktarının tayini için 0, 10, 25, 50, 75 ve 100 mg/L konsantrasyonlarına sahip α, β, γ ve δ tokoferolleri içeren standart çözeltiler hazırlanmış ve Çizelge 5.7'deki parametrelere göre sisteme enjekte edilerek kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. Kalibrasyon grafiği oluşturulurken tokoferol türlerinin pik alanları ile bilinen konsantrasyonları dikkate alınmıştır. Tokoferol miktarı belirlenmek istenen numunelerin analizi sonucu elde edilen kromatogramlardaki pik alanları dikkate alınarak ve kalibrasyon grafiği kullanılarak, tokoferol miktarları yazılım tarafından otomatik olarak hesap edilmiştir.

Tokotrienol miktarının tayini için, Çizelge 5.7'deki parametrelere göre tokotrienol içeriği bilinen palm yağı sisteme enjekte edilerek tokotrienol türlerinin çıkış zamanları tespit edilmiş ve metot kalibre edilmiştir. Numunelerin analizi sonucu elde edilen kromatogramlardaki pik çıkış zamanları dikkate alınarak, tokotrienol içerip içermediği tespit edilmiştir.

5.4.12. Sterol miktarının gaz kromatografisi ile tayini

5.4.12.1. Numunelerin hazırlanması

OODD ve diğer numunelerin sterol miktarlarının tayini için COI'nın standart COI/T.20 metodu (COI 2010) kullanılmıştır. İlgili metoda göre uygun ve temiz bir balon içerisine analizi yapılacak numuneden yaklaşık 10.0 g tartılmış ve iç standart olarak 500 µL α-kolestanol (10,000.00 mg/L) ilave edilmiştir. Ardından balona 1N 100 mL etanolde çözülmüş KOH ilave edilerek geri soğutucu ile 90 ^{o}C'de 1 saat kaynatılarak sabunlaştırılmıştır. Sabunlaştırılan numune dietileter ile ekstrakte edilmiş ve ayrılan organik faz 4 kez saf su ile ekstrakte edilerek yıkanmıştır. Elde edilen organik fazın çözücüsü döner buharlaştırıcı vasıtasıyla uzaklaştırılmış ve tartılmıştır. Kalan kısım 1 mL kloroformda çözülmüş ve 200 µL'lik kısmı alınarak tekrar çözücüsü uzaklaştırılmıştır. Çözücüsü uzaklaştırılan kısma 250 µL susuz piridin ve 250 µL bis(trimetilsilil)trifloroasetamit (BSTFA) ilave edilerek silillenmiştir. Silillenen numuneler 25 mm PTFE şırınga filtreden geçirilmiş ve 1.5 mL hacme sahip kapaklı cam viallere doldurularak analize hazır hale getirilmiştir.

5.4.12.2. Kromatografik şartlar

Sabunlaştırılan ve silillenen numuneleri ilk önce hangi sterol türlerini içerdiğini tespit etmek amacıyla otomatik analiz yapabilen ve MS dedektöre sahip Agilent 7890N-5975C (CA, ABD) GC cihazında (Şekil 5.6) analizi gerçekleştirilmiştir. GC-MS cihazında tespit edilen sterol türlerinin miktarlarının tayini ise otomatik analiz yapabilen ve FID dedektörüne sahip Agilent 7890 (CA, ABD) GC cihazında (Şekil 5.4) gerçekleştirilmiştir.



Şekil 5. 6. Agilent 7890N-5975C GC-MS sistemi

Her iki cihaz da Chemstation (CA, ABD) yazılımı ile kontrol edilmiştir. Analize hazır numuneler GC-MS ve GC-FID cihazlarında COI'nin standart metoduna göre (COI 2010) analiz edilmiştir. İlgili metoda ait kromatografik şartlar sırasıyla Çizelge 5.8 ve Çizelge 5.9'da verilmiştir.

Çizelge 5. 8. Sterol tayini GC-MS kromatografik şartları (COI 2010)

Sabit Faz (Kolon)	Agilent HP-5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm) (5%-Phenyl)-methylpolysiloxane		
Hareketli Faz	H_2		
Hareketli Faz Akış Hızı (mL/dk)	1.0		
Dedeksiyon	MS Kaynak sıcaklığı: 230 ºC eV: 70 amu: 10-700		
Analiz Süresi (dk)	60		
Split	Splitless		
Enjeksiyon Miktarı (µL)	1		
Enjeksiyon Bloğu Sıcaklığı (ºC)	280		
Kolon Fırını Sıcaklığı	ºC/dk	ºC	dk
		80	2
	15	280	20

Çizelge 5. 9. Sterol tayini GC-FID kromatografik şartları (COI 2010)

Sabit Faz (Kolon)	Agilent HP-88 (100m, 0.25mm, 0.25 µm) (%88 siyanopropil)-metilarilpolisiloksan		
Hareketli Faz	He		
Hareketli Faz Akış Hızı (mL/dk)	1.0		
Dedeksiyon	FID Sıcaklık: 250 ºC, Kuru hava: 300 mL/dk, Hidrojen: 30 mL/dk, Make up (He): 10 mL/dk		
Analiz Süresi (dk)	60		
Split	Splitless		
Enjeksiyon Miktarı (µL)	1		
Enjeksiyon Bloğu Sıcaklığı (ºC)	280		
Kolon Fırını Sıcaklığı	ºC/dk	ºC	dk
		80	2
	15	280	20

5.4.12.3. Metodun kalibrasyonu

Numunelerin içerdiği sterol türleri GC-MS cihazı ile tespit edildikten sonra miktarları GC-FID cihazı ile tespit edilmiştir. Sterol miktarları tayin edilmek istenen numunelerin, Çizelge 5.9'daki şartlara göre GC-FID cihazında enjeksiyonları yapılmış ve kromatogramları elde edilmiştir. Elde edilen kromatogramlarda, miktarı tam olarak bilinen α-kolestanol'ün pik alanından faydalanarak ve Denklem 5.8 kullanılarak diğer sterol türlerinin miktarları tespit edilmiştir.

$$Sterol\ mg/kg = \frac{\text{Ax.ms.1000}}{\text{As.m}} \qquad (5.8)$$

Ax: Sterol pikinin alanı
As: İç standart pik alanı
ms: Eklenen iç standardın mg miktarı
m: Numune g miktarı

5.4.13. Sterol miktarının sıvı kromatografisi ile tayini

5.4.13.1. En küçük kareler metodu ile sterol miktarının tayini

İlgili çalışmada, OODD numunesinin içerdiği sterol türlerinin sıvı kromatografisi tekniği ile tespit edilmesi ve en küçük kareler metodu kullanılarak tespit edilen türlerin miktarlarının hesaplanması gerçekleştirilmiştir.

5.4.13.1.1. Numunelerin hazırlanması

OODD ve diğer numunelerin sterol miktarlarının sıvı kromatografisi ile tayini için Holen'in yaptığı çalışma (Holen 1985) baz alınmış ve bazı modifikasyonlar yapılarak kalibrasyon grafiği metodu ile kullanılmıştır. İlgili metoda göre uygun ve temiz bir balon içerisine analizi yapılacak numuneden yaklaşık 10.01 g tartılmış ve 1 N 100 mL Et-KOH ile geri soğutucu altında 90^{o}C de 1 saat kaynatılmıştır. Ardından dietileter ve su ile ekstrakte edilmiş ve ayrılan organik faz su ile 4 kez yıkanmıştır. Geriye kalan organik fazın çözücüsü döner buharlaştırıcı ile uçurularak sabunlaşmayan madde 10 mL metanolde çözülmüş ve şırınga filtreden geçirilerek enjeksiyonlar yapılmıştır.

5.4.13.1.2. Kromatografik şartlar

Metanolde çözülerek analize hazır hale getirilmiş olan numunelerin analizi, otomatik analiz yapabilen ve UV-VIS dedektöre sahip Agilent 1200 (CA, ABD) HPLC cihazında (Şekil 5.5) gerçekleştirilmiştir. Cihaz, Chemstation (CA, ABD) yazılımı ile kontrol edilmiştir. Analize hazır numuneler Holen'in metoduna göre (Holen 1985) analiz edilmiştir. İlgili metoda ait kromatografik şartlar Çizelge 5.10'da verilmiştir.

Çizelge 5. 10. Sterol tayini kromatografik şartları (Holen 1985)

Sabit Faz (Kolon)	ACE Excel 5 Super C18 4.6x250mm 2µm
Hareketli Faz	%85Metanol-%15su
Hareketli Faz Akış Hızı (mL/dk)	1.0
Dedeksiyon	UV-VIS 206 nm
Analiz Süresi (dk)	8
Enjeksiyon Miktarı (µL)	10
Kolon Fırını Sıcaklığı (^{o}C)	30
Ulaşılan Kolon Basıncı (Bar)	128

5.4.13.1.3. Metodun kalibrasyonu

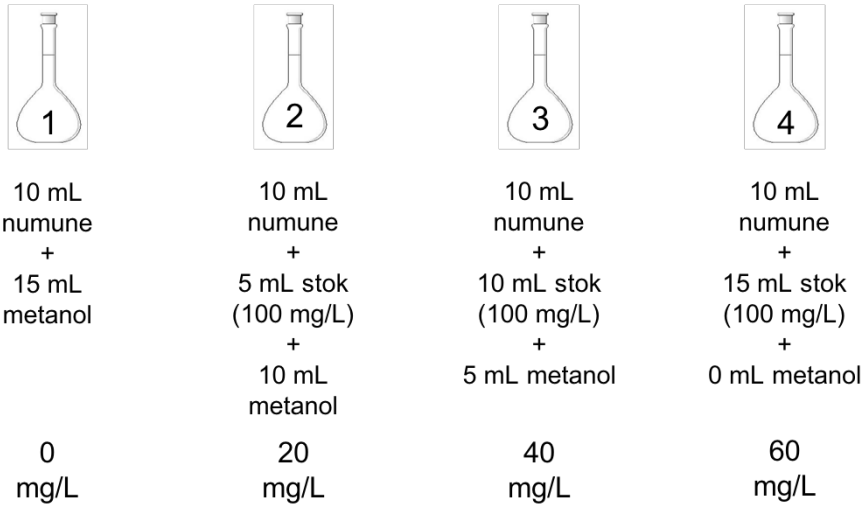
Sterol miktarının tayini için 5, 10, 25, 50, 75, 100 ve 125 mg/L konsantrasyonlarına sahip kampesterol, β-sitosterol ve stigmasterol içeren standart çözeltiler hazırlanmış ve Çizelge 5.10'daki parametrelere göre sisteme enjekte edilerek kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. Kalibrasyon grafiği oluşturulurken sterol türlerinin pik alanları ile bilinen konsantrasyonları dikkate alınmıştır. Sterol miktarı belirlenmek istenen numunelerin analizi sonucu elde edilen kromatogramlardaki pik alanları dikkate alınarak ve kalibrasyon grafiği kullanılarak, sterol miktarları yazılım tarafından otomatik olarak hesap edilmiştir.

5.4.13.2. Standart ekleme metodu ile sterol miktarının tayini

Kalibrasyon grafiği metodunun kullanıldığı bir önceki çalışmada, sabunlaştırma işleminden kaynaklanan bir negatif hata olup olmadığının kontrol edilmesi amacıyla OODD numunesinin içerdiği sterol türlerinin sıvı kromatografisi tekniği ile tespit edilmesi ve standart ekleme metodu kullanılarak tespit edilen türlerin miktarlarının hesaplanması gerçekleştirilmiştir.

5.4.13.2.1. Numunelerin hazırlanması

OODD ve diğer numunelerin sterol miktarlarının sıvı kromatografisi ile tayini için Holen'in yaptığı çalışma (Holen 1985) baz alınmış ve bazı modifikasyonlar yapılarak standart ekleme metodu ile kullanılmıştır. İlgili metoda göre uygun ve temiz bir balon içerisine analizi yapılacak numuneden yaklaşık 16.52 g tartılmış ve 10 mL metanolde çözülmüştür. Ardından 4 adet 25 mL'lik balonjoje alınmış ve her birine metanolde çözülmüş numuneden 10'ar mL ilave edilmiştir. Birinci balonjoje, metanol ile 25 mL'ye tamamlanmıştır. Ardından 100 mg/L kampesterol, β-sitosterol ve stigmasterol içeren standart çözelti hazırlanmıştır. İkinci balonjojeden başlamak üzere diğer balonjojelere, hazırlanmış olan standart çözeltiden sırasıyla 5, 10 ve 15'er mL ilave edilmiş ve üzerleri metanol ile 25 mL'ye tamamlanmıştır (Şekil 5.11).



Şekil 5. 7. Sterol tayini için standart ekleme metoduna göre hazırlanmış kalibrasyon çözeltileri

Hazırlanmış olan çözeltilere etanolde çözülmüş KOH ilave edilerek geri soğutucu ile 90 ^{o}C'de 1 saat kaynatılarak sabunlaştırılmıştır. Sabunlaştırılan numuneler dietileter ile ekstrakte edilmiş ve ayrılan organik faz 4 kez saf su ile ekstrakte edilerek yıkanmıştır. Elde edilen organik fazın çözücüsü döner buharlaştırıcı vasıtasıyla uzaklaştırılmış ve tartılmıştır. Kalan kısım 25 mL metanolde çözülmüş, 25 mm PTFE şırınga filtreden geçirilmiş ve 1.5 mL hacme sahip kapaklı cam viallere doldurularak analize hazır hale getirilmiştir.

5.4.13.2.2. Kromatografik şartlar

Metanolde çözülerek analize hazır hale getirilmiş olan numunelerin analizi, otomatik analiz yapabilen ve UV-VIS dedektöre sahip Agilent 1200 (CA, ABD) HPLC cihazında (Şekil 5.5) gerçekleştirilmiştir. Cihaz, Chemstation (CA, ABD) yazılımı ile kontrol edilmiştir. Analize hazır numuneler Holen'in metoduna göre (Holen 1985) analiz edilmiştir. İlgili metoda ait kromatografik şartlar Çizelge 5.10'da verilmiştir.

5.4.13.2.3. Metodun kalibrasyonu

Sterol miktarının tayini için standart ekleme metoduna göre 0, 25, 50 ve 75 mg/L konsantrasyonlarına sahip kampesterol, β-sitosterol ve stigmasterol türlerini içeren standart çözeltiler hazırlanmış ve Çizelge 5.10'daki parametrelere göre sisteme enjekte edilerek kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. Kalibrasyon grafiği oluşturulurken sterol

türlerinin pik alanları ile bilinen konsantrasyonları dikkate alınmıştır. Elde edilen kalibrasyon grafiğine ekstrapolasyon işlemi uygulanarak numunelerdeki sterol miktarı tespit edilmiştir.

5.4.14. Skualen miktarının sıvı kromatografisi ile tayini

5.4.14.1. En küçük kareler metodu ile skualen miktarının tayini

OODD ve diğer numunelerin skualen miktarlarının tayini için, Agilent tarafından EVOO'nın skualen miktarlarının tayini için geliştirdiği metot (Agilent 2016) baz alınmış ve en küçük kareler metodu ile kullanılmıştır.

5.4.14.1.1. Numunelerin hazırlanması

İlgili çalışmada, OODD numunesinin içerdiği skualenin sıvı kromatografisi tekniği ile tespit edilmesi ve kalibrasyon grafiği metodu kullanılarak miktarının hesaplanması gerçekleştirilmiştir. İlgili metoda göre 0.1688 g numune 20 mL aseton-metanol (3:7) karışımı içerisinde çözülmüştür. Hazırlanmış olan çözelti, 1.5 dk kuvvetlice çalkalanmış ve ağızları kapalı olacak şekilde -18 ^{o}C'de, 24 saat bekletilmiştir. Ardından çözeltiler kaba filtre kağıdında süzülmüş ve süzüntüler döner buharlaştırıcı vasıtasıyla 40 ^{o}C'de çözücüsünden uzaklaştırılmıştır. Geriye kalan kısımlar 25 mL aseton içerisinde çözülmüş, 25 mm PTFE şırınga filtreden geçirilmiş ve 1.5 mL hacme sahip kapaklı cam viallere doldurularak analize hazır hale getirilmiştir.

5.4.14.1.2. Kromatografik şartlar

Asetonda çözülerek analize hazır hale getirilmiş olan numunelerin analizi, otomatik analiz yapabilen ve UV-VIS dedektöre sahip Agilent 1200 (CA, ABD) HPLC cihazında (Şekil 5.5) gerçekleştirilmiştir. Cihaz, Chemstation (CA, ABD) yazılımı ile kontrol edilmiştir. Analize hazır numuneler Agilent'ın metoduna göre (Agilent 2016) analiz edilmiştir. İlgili metoda ait kromatografik şartlar Çizelge 5.11'de verilmiştir.

Çizelge 5. 11. Skualen tayini kromatografik şartları (Agilent 2016)

Sabit Faz (Kolon)	ACE Excel 5 Super C18 4.6x250mm 2µm
Hareketli Faz	%60-Aseton-%40Asetonitril
Hareketli Faz Akış Hızı (mL/dk)	1.0
Dedeksiyon	UV-VIS 206 nm
Analiz Süresi (dk)	25
Enjeksiyon Miktarı (µL)	5
Kolon Fırını Sıcaklığı (ºC)	30
Ulaşılan Kolon Basıncı (Bar)	43

5.4.14.1.3. Metodun kalibrasyonu

Skualen miktarının tayini için 0, 10, 100, 250, 500, 750 ve 1000 mg/L konsantrasyonlarına sahip skualen standart çözeltileri hazırlanmış ve Çizelge 5.11'deki parametrelere göre sisteme enjekte edilerek kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. Kalibrasyon grafiği oluşturulurken skualen türünün pik alanı ile bilinen konsantrasyonları dikkate alınmıştır. Skualen miktarı belirlenmek istenen numunelerin analizi sonucu elde edilen kromatogramlardaki pik alanları dikkate alınarak ve kalibrasyon grafiği kullanılarak, skualen miktarları yazılım tarafından otomatik olarak hesap edilmiştir.

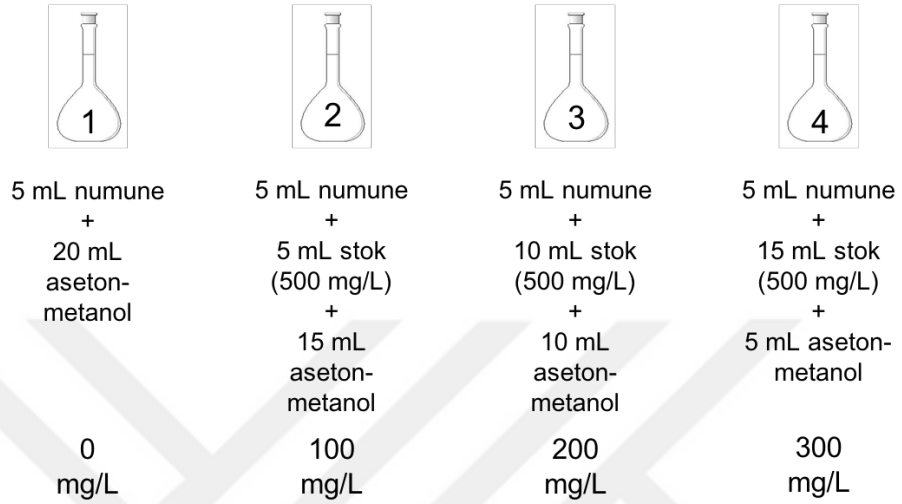
5.4.14.2. Standart ekleme metodu ile skualen miktarının tayini

Kalibrasyon grafiği metodunun kullanıldığı bir önceki çalışmada, dondurma işleminden kaynaklanan bir negatif hata olup olmadığının kontrol edilmesi amacıyla OODD numunesinin içerdiği skualen türünün sıvı kromatografisi tekniği ile tespit edilmesi ve standart ekleme metodu kullanılarak miktarının hesaplanması gerçekleştirilmiştir.

5.4.14.2.1. Numunelerin hazırlanması

OODD ve diğer numunelerin skualen miktarlarının tayini için, Agilent tarafından EVOO'nın skualen miktarlarının tayini için geliştirdiği metot (Agilent 2016) baz alınmış ve standart ekleme metodu ile kullanılmıştır. İlgili metoda göre uygun ve temiz bir balon içerisine analizi yapılacak numuneden yaklaşık 0.2090 g tartılmış ve 100 mL metanolde çözülmüştür. Ardından 4 adet 25 mL'lik balonjoje alınmış ve her birine metanolde

çözülmüş numuneden 5'er mL ilave edilmiştir. Birinci balonjoje, aseton-metanol (30:70 v/v) karışımı ile 25 mL'ye tamamlanmıştır. Ardından 500 mg/L skualen içeren standart çözelti hazırlanmıştır. İkinci balonjojeden başlamak üzere diğer balonjojelere, hazırlanmış olan standart çözeltiden sırasıyla 5, 10 ve 15'er mL ilave edilmiş ve üzerleri aseton-metanol (30:70 v/v) karışımı ile 25 mL'ye tamamlanmıştır (Şekil 5.12).



Şekil 5. 8. Skualen tayini için standart ekleme metoduna göre hazırlanmış kalibrasyon çözeltileri

Hazırlanmış olan çözeltiler, 1.5 dk kuvvetlice çalkalanmış ve ağızları kapalı olacak şekilde -18 ^{o}C'de, 24 saat bekletilmiştir. Ardından çözeltiler kaba filtre kağıdında süzülmüş ve süzüntüler döner buharlaştırıcı vasıtasıyla 40 ^{o}C'de çözücüsünden uzaklaştırılmıştır. Geriye kalan kısımlar 25 mL aseton içerisinde çözülmüş, 25 mm PTFE şırınga filtreden geçirilmiş ve 1.5 mL hacme sahip kapaklı cam viallere doldurularak analize hazır hale getirilmiştir.

5.4.14.2.2. Kromatografik şartlar

Asetonda çözülerek analize hazır hale getirilmiş olan numunelerin analizi, otomatik analiz yapabilen ve UV-VIS dedektöre sahip Agilent 1200 (CA, ABD) HPLC cihazında (Şekil 5.5) gerçekleştirilmiştir. Cihaz, Chemstation (CA, ABD) yazılımı ile kontrol edilmiştir. Analize hazır numuneler Agilent'ın metoduna göre (Agilent 2016) analiz edilmiştir. İlgili metoda ait kromatografik şartlar Çizelge 5.11'de verilmiştir.

5.4.14.2.3. Metodun kalibrasyonu

Skualen miktarının tayini için standart ekleme metoduna göre 0, 100, 200 ve 300 mg/L skualen konsantrasyonlarına sahip standart çözeltiler hazırlanmış ve Çizelge 5.11'deki parametrelere göre sisteme enjekte edilerek kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. Kalibrasyon grafiği oluşturulurken skualen türünün pik alanları ile bilinen konsantrasyonları dikkate alınmıştır. Elde edilen kalibrasyon grafiğine ekstrapolasyon işlemi uygulanarak numunelerdeki skualen miktarı tespit edilmiştir.

5.5. Zeytinyağı Deoderize Distilatı ve Natürel Sızma Zeytinyağları İçin Geliştirilen FT-IR Temelli Spektroskopik Metotlar

Başlık 5.5'de gerçekleştirilen FT-IR temelli spektroskopik çalışmaların tamamı, Tübitak 2214/A yurtdışı doktora sırası araştırma burs programı desteğiyle, 2015-2016 yılları arasında 12 ay süreyle Kanada McGill Üniversitesi, Tarım ve Çevre Bilimleri Fakültesi, Gıda Bilimi ve Tarım Kimyası Bölümünde, McGill IR Araştırma Grubu laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

5.5.1. Zeytinyağı deoderize distilatındaki serbest yağ asidi miktarının tayini için SB-ATR-FT-IR temelli metot geliştirilmesi

5.5.1.1. Spektroskopik şartlar

FT-IR spektrumları, Alpha model SB-ATR-FT-IR (Bruker, Almanya) spektrofotometre (Şekil 5.9) kullanılarak alınmıştır.



Şekil 5. 9. Alpha model SB-ATR-FT-IR (Bruker, Almanya) spektrofotometre

Spektrofotometre OPUS yazılımı ile kontrol edilmiştir. 0.10 mL numune ATR yüzeyine homojen bir şekilde yayılarak taramalar yapılmıştır. Tüm spektrumlar oda sıcaklığında, 4000-650 cm^{-1} dalga sayısı aralığında, 8 cm^{-1} çözünürlükte alınan 64 tarama sonucu elde edilmiştir. Her ölçümden önce ATR'nin elmas kristal yüzeyi etanol ile temizlenmiştir. Her 30 dakikada bir ATR yüzeyi etanol temizlenerek background spektrumu alınmış ve tüm numunelerin spektrumu, en son alınan background spektrumundan otomatik olarak çıkartılarak elde edilmiştir. Tüm ölçümler 3 tekrarlı olarak yapılmış ve 3 ölçümden elde edilen ortalama spektrumlar kullanılmıştır. Karboksil (CO-H) bağlarının orta IR bölgesindeki temel titreşim bandına tekabül eden 1708-1670 cm^{-1} dalga sayısı aralığındaki spektral bölge, PLS temelli kalibrasyon model oluşturmak için kullanılmıştır.

5.5.1.2. Kalibrasyon standartların hazırlanması

Yerel bir marketten temin edilen ELOO numunesinin FFA miktarı, Başlık 5.4.2'ye göre tespit edilmiştir ve %0.30 olarak bulunmuştur. Ardından ELOO (%0.30 FFA) numunesi ve saf oleik asit (%100.00 FFA) kullanılarak farklı FFA konsantrasyonlarına sahip kalibrasyon standartları gravimetrik olarak hazırlanmış ve Başlık 5.4.2'ye göre FFA miktarları tespit edilmiştir (Çizelge 5.12). Hazırlanmış olan kalibrasyon standartlarının SB-ATR-FT-IR spektrumlarındaki değişikliklerden faydalanılarak FFA tayini için PLS temelli bir metot geliştirilmiştir. Ardından geliştirilmiş olan PLS modeli kullanılarak OODD'nın SB-ATR-FT-IR spektrumundan FFA miktarı bulunmaya çalışılmıştır.

Çizelge 5. 12. ELOO (%0.30 FFA) ve saf oleik asit (%100 FFA) kullanılarak hazırlanan kalibrasyon standartları

Kalibrasyon standardı	%FFA
1	0.30
2	10.24
3	20.00
4	29.78
5	39.70
6	49.47
7	58.78
8	67.89
9	77.32
10	84.40
11	95.59

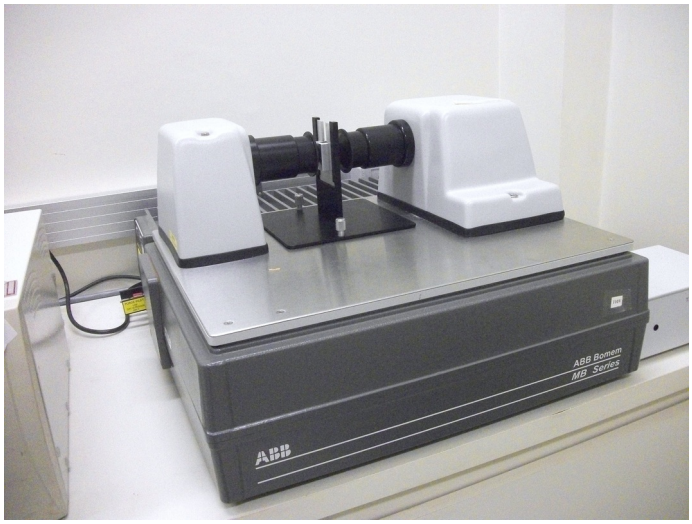
5.5.1.3. Verilerin işlenmesi

%0.30-95.59 aralığında FFA içeren 11 adet kalibrasyon standardı SB-ATR-FT-IR cihazında taranmış ve spektrumları alınmıştır. Kalibrasyon standartlarından elde edilen FT-IR verilerini ve kalibrasyon standartlarının %FFA değerlerini kullanan bir kalibrasyon modeli oluşturmak için çok değişkenli istatistiksel kemometrik metotlar kullanılmıştır. TQ Analyst 7.2 versiyon (Thermo-Nicolet, Madison, ABD) yazılımı kullanılarak, en iyi regresyon değerlerine sahip PLS kalibrasyon modeli geliştirilmiştir.

5.5.2. Zeytinyağı deoderize distilatındaki serbest yağ asidi miktarının tayini için FT-NIR temelli metot geliştirilmesi

5.5.2.1. Spektroskopik şartlar

FT-NIR spektrumları, döteryumlanmış triglisin sülfat detektöre sahip ve 14000-2000 cm^{-1} dalga sayısı aralığında ölçüm yapabilen Bomem FT-NIR (Bomem Inc., Quebec, Kanada) spektrofotometre (Şekil 5.10) kullanılarak alınmıştır.



Şekil 5. 10. Bomem FT-NIR (Bomem Inc., Quebec, Kanada) Spektrofotometre

Spektrofotometre, Bomem-Grams/32 (Galactic Industries Co., Salem, ABD) yazılımı ile kontrol edilmiştir. Numuneler, 10mm iç çapa sahip 6 mL'lik atılabilir cam viallere konmuş ve ısısı kontrol edilebilen bir başlığa yerleştirilerek transmisyon modunda spektrumları alınmıştır. Analiz yapılmak istenen numuneden 3 mL alınarak viale konmuş ve 50 ^{o}C'de, 14000-4000 cm^{-1} dalga sayısı aralığında, 8 cm^{-1}çözünürlükte ve 128 tarama ile spektrumu alınmıştır. Her 30 dakikada bir boş bir vial kullanarak background spektrumu alınmış ve tüm numunelerin spektrumu, en son alınan background spektrumundan otomatik olarak çıkartılarak elde edilmiştir. Karboksil (CO-H) bağlarının yakın IR bölgesindeki kombinasyon ve ilk overtone titreşim bantlarına tekabül eden 5320-4540 cm^{-1} dalga sayısı aralığındaki spektral bölge, PLS temelli kalibrasyon model oluşturmak için kullanılmıştır.

5.5.2.2. Kalibrasyon standartların hazırlanması

Başlık 5.5.1'de hazırlanmış olan aynı kalibrasyon standartlarının (Çizelge 5.12) FT-NIR spektrumlarındaki değişikliklerden faydalanılarak FFA tayini için PLS temelli bir metot geliştirilmiştir. Ardından geliştirilmiş olan PLS modeli kullanılarak OODD'nın FT-NIR spektrumundan FFA miktarı bulunmaya çalışılmıştır.

5.5.2.3. Verilerin işlenmesi

%0.30-95.59 aralığında FFA içeren 11 adet kalibrasyon standardı FT-NIR cihazında taranmış ve spektrumları alınmıştır. Kalibrasyon standartlarından elde edilen

FT-NIR verilerini ve kalibrasyon standartlarının %FFA değerlerini kullanan bir kalibrasyon modeli oluşturmak için çok değişkenli istatistiksel kemometrik metotlar kullanılmıştır. TQ Analyst 7.2 versiyon (Thermo-Nicolet, Madison, ABD) yazılımı kullanılarak, en iyi regresyon değerlerine sahip PLS kalibrasyon modeli geliştirilmiştir.

5.5.3. Zeytinyağı deoderize distilatının iyot sayısının tayini için SB-ATR-FT-IR temelli metot geliştirilmesi

5.5.3.1. Spektroskopik şartlar

FT-IR spektrumları, Alpha model SB-ATR-FT-IR (Bruker, Almanya) spektrofotometre (Şekil 5.9) kullanılarak alınmıştır. Spektrofotometre OPUS yazılımı ile kontrol edilmiştir. 0.10 mL numune ATR yüzeyine homojen bir şekilde yayılarak taramalar yapılmıştır. Tüm spektrumlar oda sıcaklığında, 4000-650 cm^{-1} dalga sayısı aralığında, 8 cm^{-1} çözünürlükte alınan 128 tarama sonucu elde edilmiştir. Her ölçümden önce ATR'nin elmas kristal yüzeyi etanol ile temizlenmiştir. Her 30 dakikada bir ATR yüzeyi etanol temizlenerek background spektrumu alınmış ve tüm numunelerin spektrumu, en son alınan background spektrumundan otomatik olarak çıkartılarak elde edilmiştir. Tüm ölçümler 3 tekrarlı olarak yapılmış ve 3 ölçümden elde edilen ortalama spektrumlar kullanılmıştır. Karbon çift (=CH, C=C) bağlarının orta IR bölgesindeki temel titreşim bandına tekabül eden 745-698 cm^{-1} dalga sayısı aralığındaki spektral bölge, PLS temelli kalibrasyon model oluşturmak için kullanılmıştır.

5.5.3.2. Kalibrasyon standartların hazırlanması

Yerel bir marketten temin edilen rafine mısır yağı ve ham hindistan cevizi yağlarının iyot sayıları Başlık 5.4.3'e göre tespit edilmiştir ve mısır yağı için 120.00; hindistan cevizi yağı için 10.00 olarak bulunmuştur. Ardından mısır yağı (120.00 IV) ve hindistan cevizi yağı (10.00 IV) kullanılarak farklı IV değerlerine sahip kalibrasyon standartları gravimetrik olarak hazırlanmış ve Başlık 5.4.3'e göre IV değerleri tespit edilmiştir (Çizelge 5.13). Hazırlanmış olan kalibrasyon standartlarının SB-ATR-FT-IR spektrumlarındaki değişikliklerden faydalanılarak IV tayini için PLS temelli bir metot geliştirilmiştir. Ardından geliştirilmiş olan PLS modeli kullanılarak OODD'nın SB-ATR-FT-IR spektrumundan IV bulunmaya çalışılmıştır.

Çizelge 5. 13. Mısır yağı (120.00 IV) ve hindistan cevizi yağı (10.00 IV) kullanılarak hazırlanan kalibrasyon standartları

Kalibrasyon standardı	**IV**
1	10.00
2	19.99
3	30.83
4	39.80
5	49.58
6	60.64
7	70.47
8	80.42
9	90.36
10	99.95
11	109.80
12	120.00

5.5.3.3. Verilerin işlenmesi

10.00-120.00 aralığında IV değerlerine sahip 12 adet kalibrasyon standardı SB-ATR-FT-IR cihazında taranmış ve spektrumları alınmıştır. Kalibrasyon standartlarından elde edilen FT-IR verilerini ve kalibrasyon standartlarının IV değerlerini kullanan bir kalibrasyon modeli oluşturmak için çok değişkenli istatistiksel kemometrik metotlar kullanılmıştır. TQ Analyst 7.2 versiyon (Thermo-Nicolet, Madison, ABD) yazılımı kullanılarak, en iyi regresyon değerlerine sahip PLS kalibrasyon modeli geliştirilmiştir.

5.5.4. Zeytinyağı deoderize distilatının iyot sayısının tayini için FT-NIR temelli metot geliştirilmesi

5.5.4.1. Spektroskopik şartlar

FT-NIR spektrumları, döteryumlanmış triglisin sülfat detektöre sahip ve 14000-2000 cm^{-1} dalga sayısı aralığında ölçüm yapabilen Bomem FT-NIR (Bomem Inc., Quebec, Kanada) spektrofotometre (Şekil 5.10) kullanılarak alınmıştır. Spektrofotometre, Bomem-Grams/32 (Galactic Industries Co., Salem, ABD) yazılımı ile kontrol edilmiştir. Numuneler, 10mm iç çapa sahip 6 mL'lik atılabilir cam viallere konmuş ve ısısı kontrol

edilebilen bir başlığa yerleştirilerek transmisyon modunda spektrumları alınmıştır. Analiz yapılmak istenen numuneden 3 mL alınarak viale konmuş ve 60 ºC'de, 14000-4000 cm^{-1} dalga sayısı aralığında, 8 cm^{-1}çözünürlükte ve 128 tarama ile spektrumu alınmıştır. Her 30 dakikada bir boş bir vial kullanarak background spektrumu alınmış ve tüm numunelerin spektrumu, en son alınan background spektrumundan otomatik olarak çıkartılarak elde edilmiştir. Karbon çift (=CH, C=C) bağlarının yakın IR bölgesindeki ikinci overtone titreşim bantlarına tekabül eden 8645-8545 cm^{-1} dalga sayısı aralığındaki spektral bölge, PLS temelli kalibrasyon model oluşturmak için kullanılmıştır.

5.5.4.2. Kalibrasyon standartların hazırlanması

Başlık 5.5.3'de hazırlanmış olan aynı kalibrasyon standartlarının (Çizelge 5.13) FT-NIR spektrumlarındaki değişikliklerden faydalanılarak IV tayini için PLS temelli bir metot geliştirilmiştir. Ardından geliştirilmiş olan PLS modeli kullanılarak OODD'nın FT-NIR spektrumundan IV bulunmaya çalışılmıştır.

5.5.4.3. Verilerin işlenmesi

%10.00-120.00 aralığında IV değerlerine sahip 12 adet kalibrasyon standardı FT-NIR cihazında taranmış ve spektrumları alınmıştır. Kalibrasyon standartlarından elde edilen FT-NIR verilerini ve kalibrasyon standartlarının IV değerlerini kullanan bir kalibrasyon modeli oluşturmak için çok değişkenli istatistiksel kemometrik metotlar kullanılmıştır. TQ Analyst 7.2 versiyon (Thermo-Nicolet, Madison, ABD) yazılımı kullanılarak, en iyi regresyon değerlerine sahip PLS kalibrasyon modeli geliştirilmiştir.

5.5.5. Kemometrik metotlar ve farklı absorpsiyon modlarına sahip FT-IR spektroskopisi kullanarak natürel sızma zeytinyağlarının serbest yağ asidi miktarının kantitatif olarak tayini

Bu çalışma, Science Citation Index Expanded'de taranan, International Journal of Food Properties adlı derginin 2017 Yılı 20. Sayısında yayınlanmıştır (Tarhan ve ark 2017).

5.5.5.1. Kalibrasyon standartlarının hazırlanması

EVOO'lar için FFA miktarı çok önemlidir ve bir zeytinyağının EVOO olarak tanımlanabilmesi için FFA miktarının ağırlıkça %0.8'e eşit ya da altında olması gerekmektedir. Yerel bir marketten temin edilen ELOO (%0.00 FFA) ve saf oleik asit (%100 FFA) kullanarak %0'dan %100'e kadar FFA içeren kalibrasyon standartları hazırlanmıştır. Ayrıca metodun validasyonu için yine yerel marketlerden 10 adet farklı markalarda EVOO temin edilmiş ve hazırlanmış olan kalibrasyon standartları ile beraber Başlık 5.4.2'ye göre FFA miktarları % oleik asit cinsinden tespit edilmiştir (Çizelge 5.14).

Çizelge 5. 14. ELOO (%0.00 FFA) ve saf oleik asit (%100 FFA) kullanılarak hazırlanan kalibrasyon standartları

Kalibrasyon standardı	**%FFA**	**Kalibrasyon standardı**	**%FFA**
1	0.30	9	0.70
2	0.37	10	0.77
3	0.40	11	0.80
4	0.47	12	0.85
5	0.50	13	0.92
6	0.55	14	0.95
7	0.62	15	1.00
8	0.65		

5.5.5.2. Yansıma modu ölçüm şartları

Hali hazırda %FFA miktarları belirlenmiş olan kalibrasyon standartları ve validasyon numunelerinin FT-IR spektrumları Alpha model SB-ATR-FT-IR (Bruker, Almanya) spektrofotometre (Şekil 5.9) kullanılarak alınmıştır. Spektrofotometre OPUS yazılımı ile kontrol edilmiştir. 0.10 mL numune ATR yüzeyine homojen bir şekilde yayılarak taramalar yapılmıştır. Tüm spektrumlar 4000-650 cm^{-1} dalga sayısı aralığında, 8 cm^{-1} çözünürlükte alınan 64 tarama sonucu elde edilmiştir. Her ölçümden önce ATR'nin elmas kristal yüzeyi etanol ile temizlenmiştir. Her 30 dakikada bir ATR yüzeyi etanol temizlenerek background spektrumu alınmış ve tüm numunelerin spektrumu, en son alınan background spektrumundan otomatik olarak çıkartılarak elde edilmiştir. Tüm ölçümler 3 tekrarlı olarak yapılmış ve 3 ölçümden elde edilen ortalama spektrumlar kullanılmıştır. Karboksil (CO-H) bağlarının orta IR bölgesindeki temel titreşim bandına

tekabül eden 1724-1646 cm^{-1} ve karboksil (C=O) bağlarının orta IR bölgesindeki temel titreşim bandına tekabül eden 3324-3023 cm^{-1}dalga sayısı aralığındaki spektral bölgeler, TQ Analyst 7.2 versiyon (Thermo-Nicolet, Madison, ABD) yazılımı kullanılarak PLS temelli kalibrasyon model oluşturmak için kullanılmıştır.

5.5.5.3. Transmisyon modu ölçüm şartları

Hali hazırda %FFA miktarları belirlenmiş olan kalibrasyon standartları ve validasyon numunelerinin FT-IR spektrumları ayrıca döteryumlanmış triglisin sülfat detektöre sahip ve 14000-2000 cm^{-1} dalga sayısı aralığında ölçüm yapabilen Bomem FT-NIR (Bomem Inc., Quebec, Kanada) spektrofotometre (Şekil 5.10) kullanılarak alınmıştır. Spektrofotometre, Bomem-Grams/32 (Galactic Industries Co., Salem, ABD) yazılımı ile kontrol edilmiştir. Numunelerin spektrumları, 100μm ışın yoluna sahip CaF_2 den imal edilmiş transmisyon akış hücresine (Dwight Analytical, Toronto, Kanada) doldurularak transmisyon modunda ve oda sıcaklığında alınmıştır. Tüm spektrumlar 4000-650 cm^{-1} dalga sayısı aralığında, 8 cm^{-1} çözünürlükte ve 128 tarama ile alınmıştır. Her 30 dakikada bir boş bir vial kullanarak background spektrumu alınmış ve tüm numunelerin spektrumu, en son alınan background spektrumundan otomatik olarak çıkartılarak elde edilmiştir. Yansıma modunda kullanılan aynı dalga sayısı aralığındaki spektral bölgeler, TQ Analyst 7.2 versiyon (Thermo-Nicolet, Madison, ABD) yazılımı kullanılarak PLS temelli kalibrasyon model oluşturmak için kullanılmıştır.

5.5.5.4. Metodun kalibrasyonu ve validasyonu

Yansıma ve transmisyon modlarından elde edilen veriler kullanılarak uygun bir kalibrasyon modeli oluşturmak için kemometrik metotlar kullanılmıştır. FFA miktarını tespit etmek için geliştirilecek olan PLS kalibrasyonları, TQ Analyst 7.2 versiyon (Thermo-Nicolet, Madison, ABD) yazılımı kullanılarak elde edilmiştir. Geliştirilecek olan PLS kalibrasyonlarının doğruluğu ve performansını tayin etmek için, korelasyon katsayıları (R^2), kalibrasyonun ortalama karekök hatası (RMSEC) ve çapraz validasyonun ortalama karekök hatası (RMSECV) gibi istatistiksel değerler dikkate alınmıştır. En iyi kalibrasyon modelinin seçilmesinde yüksek R^2 değeri ve düşük RMSEC ve RMSECV değerleri dikkate alınmıştır. Seçilmiş olan en iyi PLS kalibrasyon modelinin güvenilirliğini tespit etmek amacıyla 10 adet farklı EVOO validasyonda kullanılmıştır.

Önerilen FT-IR metodundan elde edilen FFA değerleri ile standart titrimetrik metottan elde edilen FFA değerleri karşılaştırılmıştır.

5.5.6. Orta, yakın ve raman spektroskopisinin natürel sızma zeytinyağlarının sınıflandırılması için kullanımının karşılaştırılması

5.5.6.1. SB-ATR-FT-IR ölçüm şartları

Yerel marketlerden temin edilen 1 adet ELOO, 10 adet EVOO ve 6 adet bitkisel rafine yağ (avokado, kanola, mısır, yerfıstığı, ayçiçek ve soya) numunelerinin sınıflandırma işlemi için, Alpha model SB-ATR-FT-IR (Bruker, Almanya) Spektrofotometre (Şekil 5.9) kullanılarak FT-IR spektrumları alınmıştır. Spektrofotometre OPUS yazılımı ile kontrol edilmiştir. 0.10 mL numune ATR yüzeyine homojen bir şekilde yayılarak taramalar yapılmıştır. Tüm spektrumlar 4000-650 cm^{-1} dalga sayısı aralığında, 8 cm^{-1} çözünürlükte alınan 64 tarama sonucu elde edilmiştir. Her ölçümden önce ATR'nin elmas kristal yüzeyi etanol ile temizlenmiştir. Her 30 dakikada bir ATR yüzeyi etanol temizlenerek background spektrumu alınmış ve tüm numunelerin spektrumu, en son alınan background spektrumundan otomatik olarak çıkartılarak elde edilmiştir. Tüm ölçümler 3 tekrarlı olarak yapılmış ve 3 ölçümden elde edilen ortalama spektrumlar kullanılmıştır. TQ Analyst 7.2 versiyon (Thermo-Nicolet, Madison, ABD) yazılımı kullanılarak PLS-DA temelli bir sınıflandırma modeli oluşturmak için yazılım tarafından otomatik olarak önerilen en iyi R^2 değerini verecek 3000-700 cm^{-1} dalga sayısı aralığındaki spektral bölge kullanılmıştır.

5.5.6.2. Transmisyon-FT-IR ölçüm şartları

Aynı yağ numunelerinin sınıflandırma işlemi için, döteryumlanmış triglisin sülfat detektöre sahip ve 14000-2000 cm^{-1} dalga sayısı aralığında ölçüm yapabilen Bomem FT-NIR (Bomem Inc., Quebec, Kanada) spektrofotometre (Şekil 5.10) kullanılmıştır. Spektrofotometre, Bomem-Grams/32 (Galactic Industries Co., Salem, ABD) yazılımı ile kontrol edilmiştir. Numunelerin spektrumları, 100µm ışın yoluna sahip CaF_2 den imal edilmiş transmisyon akış hücresine (Dwight Analytical, Toronto, Kanada) doldurularak transmisyon modunda ve oda sıcaklığında alınmıştır. Tüm spektrumlar 4000-650 cm^{-1} dalga sayısı aralığında, 8 cm^{-1} çözünürlükte ve 128 tarama ile alınmıştır. Her 30 dakikada

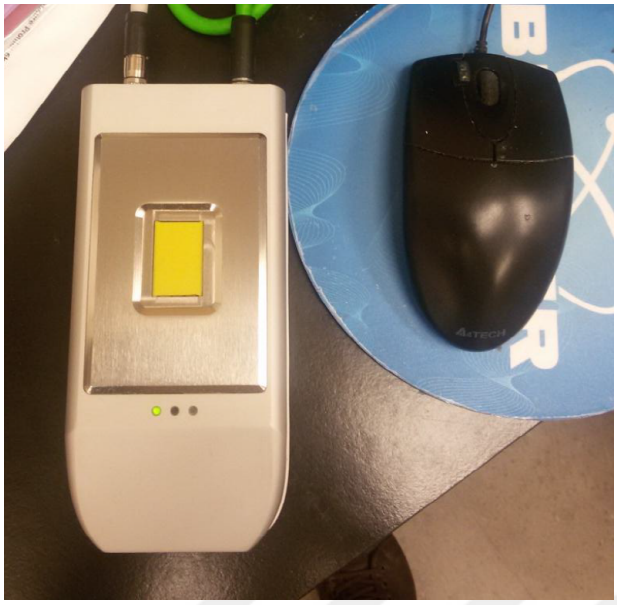
bir boş bir vial kullanarak background spektrumu alınmış ve tüm numunelerin spektrumu, en son alınan background spektrumundan otomatik olarak çıkartılarak elde edilmiştir. TQ Analyst 7.2 versiyon (Thermo-Nicolet, Madison, ABD) yazılımı kullanılarak PLS-DA temelli bir sınıflandırma modeli oluşturmak için yazılım tarafından otomatik olarak önerilen en iyi R^2 değerini verecek 1539, 1547, 1558-1566, 2430 ve 4590 cm^{-1} dalga sayısı aralığındaki spektral bölgeler kullanılmıştır.

5.5.6.3. FT-NIR ölçüm şartları

Aynı yağ numunelerinin sınıflandırma işlemi için, döteryumlanmış triglisin sülfat detektöre sahip ve 14000-2000 cm^{-1} dalga sayısı aralığında ölçüm yapabilen Bomem FT-NIR (Bomem Inc., Quebec, Kanada) spektrofotometre (Şekil 5.10) kullanılmıştır. Spektrofotometre, Bomem-Grams/32 (Galactic Industries Co., Salem, ABD) yazılımı ile kontrol edilmiştir. Numuneler, 10mm iç çapa sahip 6 mL'lik atılabilir cam viallere konmuş ve ısısı kontrol edilebilen bir başlığa yerleştirilerek transmisyon modunda spektrumları alınmıştır. Analiz yapılmak istenen numuneden 3 mL alınarak viale konmuş ve oda sıcaklığında, 14000-4000 cm^{-1} dalga sayısı aralığında, 8 cm^{-1}çözünürlükte ve 128 tarama ile spektrumu alınmıştır. Her 30 dakikada bir boş bir vial kullanarak background spektrumu alınmış ve tüm numunelerin spektrumu, en son alınan background spektrumundan otomatik olarak çıkartılarak elde edilmiştir. TQ Analyst 7.2 versiyon (Thermo-Nicolet, Madison, ABD) yazılımı kullanılarak PLS-DA temelli bir sınıflandırma modeli oluşturmak için yazılım tarafından otomatik olarak önerilen en iyi R^2 değerini verecek 6218, 6226-6241, 6461, 6473-6484, 7364, 7989-7996, 8710, 14704-15426, 15433 ve 15792-15795 cm^{-1} dalga sayısı aralığındaki spektral bölgeler kullanılmıştır.

5.5.6.4. Taşınabilir ATR-IR ölçüm şartları

Aynı yağ numunelerinin sınıflandırma işlemi için, IRSphinx marka taşınabilir ATR-IR spektrofotometre (Şekil 5.11) kullanılarak IR spektrumları alınmıştır.



Şekil 5. 11. IRSphinx marka taşınabilir ATR-IR Spektrofotometre

Spektrofotometre Sphinx yazılımı ile kontrol edilmiştir. 0.50 mL numune ATR yüzeyine homojen bir şekilde yayılarak taramalar yapılmıştır. Tüm spektrumlar 1780-930 cm^{-1} dalga sayısı aralığında, 8 cm^{-1} çözünürlükte alınan 128 tarama sonucu elde edilmiştir. Her ölçümden önce ATR'nin elmas kristal yüzeyi etanol ile temizlenmiştir. Her 30 dakikada bir ATR yüzeyi etanol temizlenerek background spektrumu alınmış ve tüm numunelerin spektrumu, en son alınan background spektrumundan otomatik olarak çıkartılarak elde edilmiştir. Tüm ölçümler 3 tekrarlı olarak yapılmış ve 3 ölçümden elde edilen ortalama spektrumlar kullanılmıştır. TQ Analyst 7.2 versiyon (Thermo-Nicolet, Madison, ABD) yazılımı kullanılarak PLS-DA temelli bir sınıflandırma modeli oluşturmak için yazılım tarafından otomatik olarak önerilen en iyi R^2 değerini verecek 1780-930 cm^{-1} dalga sayısı aralığındaki spektral bölge kullanılmıştır.

5.5.6.5. Taşınabilir raman ölçüm şartları

Aynı yağ numunelerinin sınıflandırma işlemi için, Bruker marka el tipi ve dokunmatik ekranlı Bravo model raman spektrofotometre (Bruker, Almanya) (Şekil 5.12) kullanılarak raman spektrumları alınmıştır.



Şekil 5. 12. Bruker marka el tipi ve dokunmatik ekranlı Bravo model raman Spektrofotometre

Numuneler, 12 mm iç çapa sahip 12 mL'lik atılabilir cam viallere konmuş ve raman spektrumları alınmıştır. Analiz yapılmak istenen numuneden 6 mL alınarak viale konmuş ve oda sıcaklığında, 300-3195 birim aralığında raman spektrumu alınmıştır. Her 30 dakikada bir boş bir vial kullanarak background spektrumu alınmış ve tüm numunelerin spektrumu, en son alınan background spektrumundan otomatik olarak çıkartılarak elde edilmiştir. TQ Analyst 7.2 versiyon (Thermo-Nicolet, Madison, ABD) yazılımı kullanılarak PLS-DA temelli bir sınıflandırma modeli oluşturmak için yazılım tarafından otomatik olarak önerilen en iyi R^2 değerini verecek 500-1700 birim aralığındaki spektral bölge kullanılmıştır.

5.6. Monolitik Kolon Çalışmaları

Gerçekleştirilen doktora tez çalışmasının bu bölümünde, her biri ayrı bir standart metotla tayin edilen FFA, TG, sterol, tokotrienol, tokoferol ve skualen biyoaktif bileşenlerinin, monolitik kolon kullanılarak tek bir analiz metoduyla tayin edilmesine imkân veren yeni kromatografik metotlar (Monolitik Ayırma1 (MA1) ve Monolitik Ayırma2 (MA2)) geliştirilmiştir. MA1 metodu, daha çok bir ön ayırma metodu olarak geliştirilmiş ve numunelerin genel TG yapısını tayin etmek için kullanılmış; MA2 metodu ise numunelere sabunlaştırma işleminin uygulandığı ve minör biyoaktif bileşenlerin kantitatif olarak tayin edildiği bir metot olmuştur.

Metoduna göre farklı çözücülerde çözülerek analize hazır hale getirilmiş olan numunelerin analizi, otomatik analiz yapabilen UV-VIS dedektöre sahip Agilent 1200

(CA, ABD) HPLC cihazında (Şekil 5.9) gerçekleştirilmiştir. Cihaz, Chemstation (CA, ABD) yazılımı ile kontrol edilmiştir. Geliştirilen metotların sabit parametreleri Çizelge 5.15'de verilmiştir.

Çizelge 5. 15. Monolitik kolon kullanılarak geliştirilen kromatografik metotların sabit parametreleri

Sabit Faz (Kolon)	Merck Chromolith Performance RP-18 100mmx4.6mm Monolitik kolon
Dedeksiyon	UV-VIS

5.6.1. Monolitik ayırma1

Monolitik kolon kullanılarak geliştirilen ilk metot MA1, numunelere herhangi bir ön işlem yapmadan direk enjeksiyonu ile TG ve TG harici yapıları (FFA, MG, DG, steroller, tokotrienoller, tokoferoller, skualen), tayin etmeye imkan veren kromatografik metot olmuştur. İlgili metoda göre uygun ve temiz bir tüp içerisine analizi yapılacak numuneden yaklaşık 1.0 g tartılmış ve 10 mL aseton içerisinde çözülmüştür. Ardından 25 mm PTFE şırınga filtreden geçirilmiş ve 1.5 mL hacme sahip kapaklı cam viallere doldurularak analize hazır hale getirilmiştir. İlgili metoda ait kromatografik şartlar Çizelge 5.16'da verilmiştir.

Çizelge 5. 16. MA1 metoduna ait kromatografik şartlar

Sabit Faz (Kolon)	Merck Chromolith Performance RP-18 100mmx4.6mm Monolitik kolon
Hareketli Faz	%40Aseton-%60Asetonitril
Hareketli Faz Akış Hızı (mL/dk)	2
Dedeksiyon	UV-VIS 210 nm
Analiz Süresi (dk)	100
Enjeksiyon Miktarı (µL)	10
Kolon Fırını Sıcaklığı (°C)	30
Ulaşılan Kolon Basıncı (Bar)	94

TG kompozisyonları bilinen EVOO, RSY ve HPY, Çizelge 5.16'daki parametrelere göre sisteme enjekte edilerek TG türlerinin çıkış zamanları tespit edilmiş ve metot kalibre edilmiştir. Numunelerin analizi sonucu elde edilen kromatogramlardaki pik alanları dikkate alınarak, TG yüzdeleri yazılım tarafından otomatik olarak tespit edilmiştir.

5.6.2. Monolitik ayırma2

Monolitik kolon kullanılarak geliştirilen ikinci ve en önemli metot ise MA2, her biri ayrı bir standart metotla tayin edilen sterol, tokotrienol, tokoferol ve skualen biyoaktif bileşenlerinin, monolitik kolon kullanılarak tek bir analiz metoduyla tayin edilmesine imkân veren yeni bir kromatografik metottur. Bu analiz metodunda numunelere sabunlaştırma işlemi uygulanarak, minör biyoaktif bileşenlerle aynı bölgede pik veren ve analizi engelleyen MG, DG ve FFA bileşenleri numuneden uzaklaştırılmıştır.

İlk aşamada sterol, tokotrienol, tokoferol ve skualen türlerini içeren standart bir karışım hazırlanmış ve bazı ön denemeler yapılmıştır. Bu karışım kullanılarak tüm biyoaktif bileşenlerin tek bir analiz metoduyla tayin edilebilmesi için en yüksek absorbans verdikleri ortak dalga boyu belirlenmiş ve tüm analizlerde bu dalga boyu kullanılmıştır.

Ardından yine aynı karışım kullanılarak farklı yüzdelerde ve farklı polaritelerde metanol-su karışımları hareketli faz olarak denenmiş ve yapılacak olan kemometrik tasarımlar için seviye değerleri tespit edilmeye çalışılmıştır.

İlgili metodun hareketli faz polaritesi (P'), hareketli faz akış hızı (mL/dk) ve kolon fırını sıcaklığı (^{o}C) gibi önemli parametreleri kemometrik yöntemler ve deneysel tasarımlardan faydalanılarak optimize edilmiştir. Hareketli faz olarak farklı oranlarda metanol-su kullanılmış ve bu şekilde hareketli fazın polaritesi değiştirilebilmiştir.

Geliştirilen metot ile 3 adet sterol (kampesterol, β-sitosterol ve stigmasterol), 3 adet tokotrienol (α, β+γ ve δ), 3 adet tokoferol (α, β+γ ve δ) ve 1 adet skualen olmak üzere toplamda 10 adet biyoaktif bileşenin ayrılması amaçlanmıştır. Bu sebeple sterol, tokotrienol ve tokoferol türlerinin her biri için ayrı birer kemometrik tasarım yapılmış ve kromatografik açıdan en iyi ayırma değerlerine sahip olan metot geliştirilmeye çalışılmıştır.

5.6.2.1. Sterol türlerinin ayrımı için geliştirilen deneysel tasarım

Faktöriyel tasarım yöntemleri, 2n, 3n, 4n,... gibi tam faktöriyel tasarım, 2n-k, 3n-k, 4n-k,...gibi fraksiyonel tasarım ve Taguchi deney tasarım yöntemleri olmak üzere üçe ayrılmaktadır. Parametre ve seviye sayısının artması durumunda tam faktöriyel tasarım yöntemlerinin kullanılması imkansız hale gelmektedir. Tam faktöriyel tasarım yöntemlerinden en fazla kullanılanı 22, 23 ve 24 olanlardır. Oysa bilimsel çalışmalarda

parametre sayısı genellikle 4'ten, seviye sayısı da 2'den fazla olmaktadır. Bu sebepten dolayı deneysel maliyetleri en az düzeyde tutabilmek için kesirli (kısmi) faktöriyel tasarım yöntemleri kullanılmaktadır (Havuz 2007).

Deneysel tasarım

Monolitik kolon kullanarak 3 sterol türünün (kampesterol, β-sitosterol ve stigmasterol) kantitatif olarak tayini için, hareketli faz polaritesi (P'), hareketli faz akış hızı (mL/dk) ve kolon fırını sıcaklığı (°C) parametrelerinin optimum değerleri kemometrik yöntemlerden faydalanılarak tespit edilmiştir. Çizelge 5.17'de optimizasyonu yapılacak parametreler ve kodlanmış seviye değerleri verilmiştir. 1.68 seviyesi, üç bağımsız değişken için ortogonal merkezi kompozit tasarımın eksen noktasını temsil etmektedir.

Çizelge 5. 17. Sterol türlerinin tayini için optimizasyonu yapılacak olan parametreler ve kodlanmış seviye değerleri

Seviye	**-1.68179**	**-1**	**0**	**+1**	**+1.68179**
Hareketli faz polaritesi (P')	6.16	6.50	7.00	7.50	7.84
Hareketli faz akış hızı (mL/dk)	1.66	2.00	2.50	3.00	3.34
Kolon Fırını Sıcaklığı (°C)	21.59	25.00	30.00	35.00	38.41

Çizelge 5.17'deki seviyeler, HPLC sisteminin çalışma prensipleri göz önünde bulundurularak seçilmiştir. HPLC sisteminde yüksek akış hızlarının, fazla çözücü harcaması sebebiyle deneysel tasarımın ikinci faktörü olan akış hızı için seviye değerleri 1.66 – 3.34 mL/dk olarak seçilmiştir. Ayrıca HPLC sisteminin kolon fırını bölmesinin uygun çalışma aralığı 20 – 40 °C olduğu için deneysel tasarımın sıcaklık faktörü için seviye değerleri 21.59- 38.41 °C olarak seçilmiştir.

Monolitik kolon kullanarak 3 sterol türünün (kampesterol, β-sitosterol ve stigmasterol) kantitatif olarak tayini için 5 seviyeli 3 faktörlü kısmi bir deneysel tasarım kullanılmıştır (Brereton 1997). İlgili tasarım Çizelge 5.18'de verilmiştir.

Çizelge 5. 18. Sterol türlerinin tayini için kullanılan deneysel tasarım ve her bir deneyde parametrelerin sahip olduğu seviye kodları

Tasarım Sırası	Hareketli faz polaritesi (P')	Hareketli faz akış hızı (mL/dk)	Kolon fırını sıcaklığı (°C)	Analiz Sırası
1	-1	-1	-1	2
2	1	-1	-1	16
3	-1	1	-1	4
4	1	1	-1	19
5	-1	-1	-1	3
6	1	-1	-1	17
7	-1	1	-1	5
8	1	1	-1	18
9	-1.68179	0	0	1
10	1.68179	0	0	20
11	0	-1.68179	0	6
12	0	1.68179	0	7
13	0	0	-1.68179	8
14	0	0	1.68179	9
15	0	0	0	10
16	0	0	0	11
17	0	0	0	12
18	0	0	0	13
19	0	0	0	14
20	0	0	0	15

Analizler tasarımdaki sıraya göre yapılmak istendiğinde bazı zorluklar meydana gelmektedir. Örneğin; faktörlerin seviyeleri arasındaki geçişler düşünüldüğünde, deney esnasında en çok zaman harcayan seviye geçişleri hareketli fazın polaritesine ait olmaktadır. Çünkü bu faktörün seviyesi değiştirilmek istendiğinde, tüm sistemin bu yeni polarite değerine sahip çözelti ile şartlandırılması gerekmekte ve bu da zaman kaybına sebebiyet vermektedir. Bu sebeple Çizelge 5.18'de verilmiş olan deney sıraları, tasarımın yapısı gözetilerek aşağıdaki şekilde değiştirilmiştir (Çizelge 5.19).

Çizelge 5. 19. Sterol türlerinin tayini için kullanılan deneysel tasarımın düzenlenmiş analiz sırası

Analiz Sırası	Hareketli faz polaritesi (P')	Hareketli faz akış hızı (mL/dk)	Kolon fırını sıcaklığı (°C)	Tasarım Sırası
1	-1.68179	0	0	2
2	-1	-1	-1	16
3	-1	-1	1	4
4	-1	1	-1	19
5	-1	1	1	3
6	0	-1.68179	0	17
7	0	1.68179	0	5
8	0	0	-1.68179	18
9	0	0	1.68179	1
10	0	0	0	20
11	0	0	0	6
12	0	0	0	7
13	0	0	0	8
14	0	0	0	9
15	0	0	0	10
16	1	-1	-1	11
17	1	-1	1	12
18	1	1	1	13
19	1	1	-1	14
20	1.68179	0	0	15

Çizelge 5.19'da verilmiş olan kodlanmış değerlere karşılık gelen gerçek parametre değerleri Çizelge 5.20'de verilmiştir.

Çizelge 5. 20. Sterol türlerinin tayini için kullanılan deneysel tasarımın gerçek parametre değerleri

Analiz Sırası	Hareketli faz polaritesi (P')	Hareketli faz akış hızı (mL/dk)	Kolon fırını sıcaklığı (°C)	Tasarım Sırası
1	6.16	2.50	30.00	2
2	6.50	2.00	25.00	16
3	6.50	2.00	35.00	4
4	6.50	3.00	25.00	19
5	6.50	3.00	35.00	3
6	7.00	1.66	30.00	17
7	7.00	3.34	30.00	5
8	7.00	2.50	21.59	18
9	7.00	2.50	38.41	1
10	7.00	2.50	30.00	20
11	7.00	2.50	30.00	6
12	7.00	2.50	30.00	7
13	7.00	2.50	30.00	8
14	7.00	2.50	30.00	9
15	7.00	2.50	30.00	10
16	7.50	2.00	25.00	11
17	7.50	2.00	35.00	12
18	7.50	3.00	35.00	13
19	7.50	3.00	25.00	14
20	7.84	2.50	30.00	15

Model eşitliği ve cevap değeri

Sistemlerin optimizasyonu için kullanılan ve etki-cevap ilişkisinin yorumlanmasına imkan tanıyan polinomal modeller 3 ana başlık altında incelenmektedir (Tarhan 2011):

- Lineer model,
- İkinci derece etkileşim modeli ve
- Kuadratik model

En basit polinomal model sadece lineer terimleri ve değişkenlerle cevap değerleri arasındaki lineer ilişkiyi içermektedir. Bir lineer model, X_1, X_2 ve X_3 ile tanımlanmış üç değişkenle aşağıdaki gibi ifade edilebilmektedir (Denklem 5.9):

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 \quad (5.9)$$

Polinomal modellerin bir diğeri olan ikinci derece etkileşim modeli, sadece değişkenlerle cevap değerleri arasındaki etkileşimleri ifade etmemekte ayrıca

değişkenlerin birbiri ile etkileşimlerini de ifade eden ilave terimleri içermektedir. Bu sebepten dolayı ikinci derece etkileşim modelleri aşağıdaki terimleri içermektedir (Denklem 5.10):

$$Y = \beta_0 + \beta_1X_1 + \beta_2X_2 + \beta_3X_3 + \beta_{12}X_1X_2 + \beta_{13}X_1X_3 + \beta_{23}X_2X_3 \qquad (5.10)$$

Yukarıda verilen bu iki model başlıca sağlamlık, görselleştirme çalışmaları gibi deneysel sistemlerin araştırılması amacıyla kullanılmaktadır (Tarhan 2011).

Optimum (maksimum ya da minimum) kuadratik terimleri elde edebilmek ve bunların görselleştirilmesi için bu terimlerin modelde verilmesi gerekmektedir. Değişkenlerle cevap değerleri arasındaki lineer olmayan etkileşimler, bu terimlerin model içersinde verilmesiyle mümkün olabilmektedir. Bu sebeple bir kuadratik model, Denklem 5.11'deki polinomal fonksiyon ile tanımlanmaktadır (Lundstedt ve ark 1998):

$$Y = \beta_0 + \beta_1X_1 + \beta_2X_2 + \beta_3X_3 + \beta_{11}X_1^2 + \beta_{22}X_2^2 + \beta_{33}X_3^2 + \beta_{12}X_1X_2 + \beta_{13}X_1X_3 + \beta_{23}X_2X_3 + \beta_{123}X_1X_2X_3 \qquad (5.11)$$

Kemometrik yöntemlerden faydalanarak sterol türlerinin tayini için 3 sterol türünü (kampesterol, β-sitosterol ve stigmasterol) içeren bir standart karışım hazırlanmış ve Çizelge 5.20'de verilen her bir deneysel koşula göre aynı anda ve 3 tekrarlı olarak HPLC sistemine enjekte edilmiştir. Her bir analizden elde edilen kromatogramlar kullanılarak o analize ait kromatografik ayırma gücü (R_s) hesaplanmıştır. Kromatografik ayırma gücü hesaplanırken, birbirine en yakın iki pik dikkate alınmıştır. Bu şekilde Çizelge 5.20'deki her bir deneysel koşuldan bir R_s değeri elde edilmiş ve Denklem 5.12 kullanılarak her bir deneysel koşul için cevap değeri oluşturulmuştur. Gerçekleştirilmiş olan bu çalışma kapsamında ayrılmaları sağlanan biyoaktif türlerin, preparatif seviyede de ayrımlarını başarabilmek için yapılmış olan tüm kromatografik ayırmalarda birbirine en yakın çıkan iki pik için R_s değerinin 3.6'ya eşit ya da yakın olması istenmiştir. Bu sebeple cevap değeri olarak, her bir deneysel tasarımdan elde edilen R_s değeri 3.6'dan çıkarılıp mutlak değeri alınmış ve elde edilen değerin de tersi bulunarak cevap değeri oluşturulmuştur. Bu sayede elde edilen R_s değerleri, artan değerlerle ifade edilmiştir. Cevap değeri en büyük değere sahip olan tasarım en iyi tasarım olarak değerlendirilmiştir.

Cevap değeri: $\frac{1}{\mathrm{I}Rs-3.6\mathrm{I}}$ (5.12)

Elde edilen cevap değerleri, yüzey grafiklerinin çizdirilmesine imkan veren kuadratik model eşitliğin hesaplanmasında ve normal dağılım grafiklerinin çizdirilmesinde kullanılmıştır. Kemometrik yöntemlerden faydalanarak sterol türlerinin

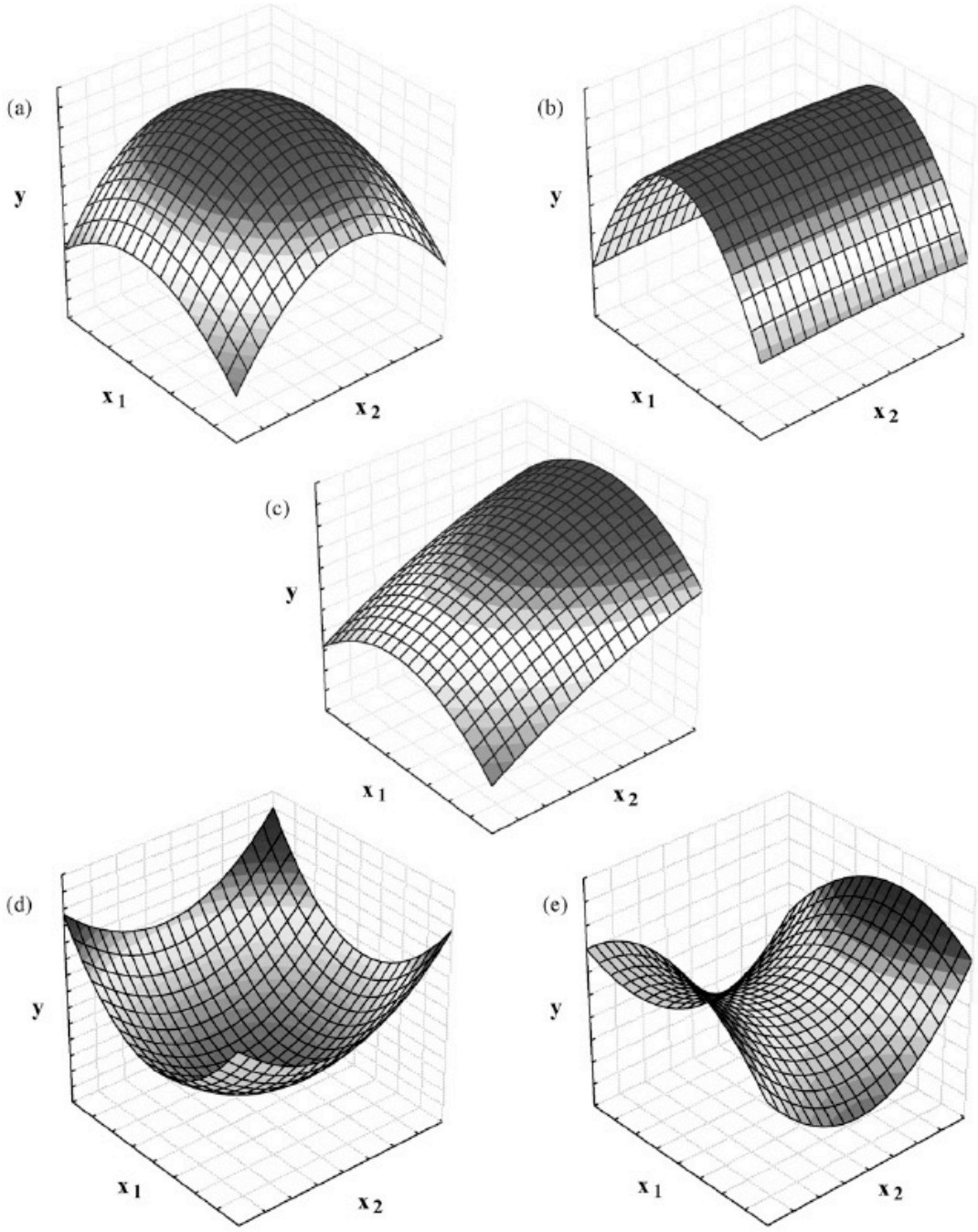
tayini için optimize edilen hareketli faz polaritesi, hareketli faz akış hızı ve kolon fırını sıcaklığı parametreleri için 3 adet yüzey grafiği çizdirilerek optimum değerler tespit edilmeye çalışılmıştır. Ayrıca normal dağılım grafikleri de çizdirilerek analiz sonucuna hangi etkinin daha anlamlı katkı sağladığı irdelenmiştir.

Yüzey Grafikleri

Cevap yüzeyleri metodolojisi, bir diğer adıyla yüzey grafikleri (RSM) 1950'li yıllarda Box ve meslektaşları tarafından geliştirilmiştir. Bu terim matematiksel modellerin oluşturulmasından sonra meydana gelen grafiksel görüşten kaynaklanmıştır ve kullanımı kemometri üzerine yayınlanan makalelerde geniş yer bulmuştur. RSM, deneysel tasarımlardan elde edilen deneysel dataların deneysel modellere uydurulmasıyla temellendirilmiş matematiksel ve istatistiksel tekniklerin bir bileşimidir (Tarhan 2011).

Lineer model ile meydana getirilmiş yüzeyler optimum şartları tespit etmek ve orijinal tasarımın hangi yöne doğru ilerleyeceğini göstermek için kullanılabilmektedir. Fakat deneysel alan fiziksel veya enstrümental sebeplerden dolayı yer değiştiremeyecekse araştırma görsel grafiklerle, çalışılan bu deneysel alandaki en iyi şartları belirlemek durumundadır. İşte bu noktada RSM, bir diğer adıyla yüzey grafikleri kullanılmaktadır. RSM, optimum değerlerin noktasal tespiti için kullanılmaktadır. Ayrıca faklı deneysel değişkenler ve cevap değerleri arasındaki ilişkiyi grafiksel olarak görselleştirmek için iyi bir yöntemdir. Optimum noktaların bu metotla tespit edilebilmesi için polinomal fonksiyonun kuadratik terimleri içermesi gerekmektedir (Bezerra ve ark 2008).

Model eşitliklerinin görsel grafiklerle temsili, (n+1) boyutlu uzayda n sayıda değişkenle gerçekleşmektedir. Bu sebeple de genellikle iki değişkene ait üç boyutlu yüzey grafikleri çizilmektedir ve eğer ikiden fazla değişken varsa yüzey grafiklerinin çizimi ancak fazla sayıda olan değişken değerlerinin β_0'a ilave edilmesiyle gerçekleşebilmektedir. Bu fonksiyonlarda β_i değerleri değiştikçe X_1 ve X_2 değişkeni için elde edilen yüzey grafikleri de değişmektedir. İki değişkenli sistemlerin optimizasyonunda kullanılan bazı kuadratik yüzey grafikleri Şekil 5.13'de verilmektedir (Bezerra ve ark., 2008).



Şekil 5. 13. İki değişkenli bir sistemin optimizasyonunda kullanılan kuadratik modelden elde edilen yüzey grafiklerinin bazı profilleri: (a) maksimum, (b) plato, (c) maksimum nokta deneysel alanın dışarısında, (d) minimum ve (e) eğri yüzey (Bezerra ve ark 2008).

Şekil 5.13 (a)'da maksimum yüzeyin deneysel alan içersinde bulunduğu bir yüzey grafiği görülmektedir. Şekil 5.13 (b)'de ise çalışılan sisteme X_2 faktörünün bir etkisinin olmadığı fakat X_1 faktörünün oldukça etkili olduğu görülmektedir. Şekil 5.13 (c)'deki yüzey grafiğinde ise maksimum noktanın deneysel alan dışarısında olduğu ve mümkünse başlangıç tasarımının seviyelerinin değiştirilmesi gerektiği görülmektedir. Şekil 5.13

(d)'deki yüzey grafiği minimum noktayı göstermekte ve Şekil 5.135 (e)'deki yüzey grafiği ise kritik noktayı göstermektedir. Kritik nokta, bağıl maksimum ve minimum nokta arasındaki bir kıvrılma noktasıdır. Eğer çalışılan sistemde amaç maksimum ya da minimum cevabı tespit etmekse, kritik nokta koordinatları optimum değer olarak kabul edilememektedir. Bu durumda optimum alanı tespit etmek için yüzey grafiği görsel olarak kontrol edilmekte ve buna göre karar verilmektedir (Bezerra ve ark 2008).

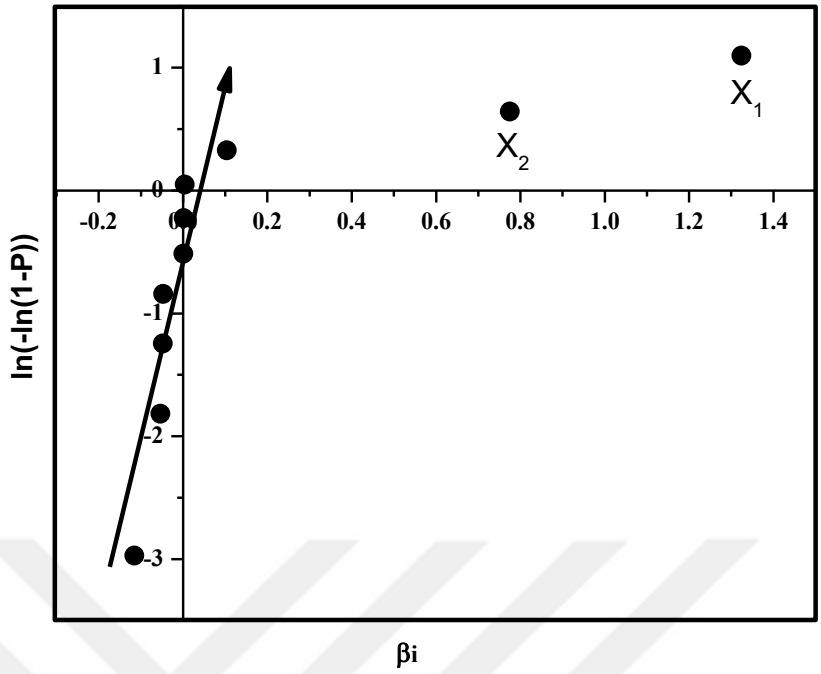
Normal dağılım grafikleri

İstatistiksel dağılımlar, deneysel hataların bağımsız bir tahmini yapılmak istediğinde (örneğin, tekrarlı yapılan bir deneyin standart sapmasının tespitinde), deneysel hatalarla birlikte farz edilen etkilerin karşılaştırılmasında kullanılabilmektedir. Bu çeşit bir karşılaştırma serbestlik derecesi genellikle düşük olduğu için çok verimli olmamaktadır. Çünkü görselleştirme çalışmalarında deneylerin tekrar sayısının az olması güven seviyelerinin tespit edilememesi anlamına gelmektedir (Tarhan 2011).

Deneysel hataların tespitinde kullanılan diğer bir metot normal dağılım grafiklerinin kullanılmasıdır. Bu grafiklerin kullanılması, normal dağılımdan önemli bir şekilde sapan etkiler varsa bunların hakkında bilgiler veren hızlı ve basit bir metottur (Lundstedt ve ark 1998).

Normal dağılım grafiklerinde, etki değerine (X) karşı toplam ihtimaliyet (P) grafiğe geçirildiğinde, normal eğrinin düz bir çizgi oluşturmasına yardımcı olur. Herhangi bir anlamlı etki, bu doğrudan sapmalara yol açar. Bu şekilde normal dağılım grafikleri, modellerdeki değişken terimlerinden etkili olanların ve etkili olmayanların (artıkların) tespitinde sıklıkla kullanılmaktadır. Bu teknik özellikle çok sayıda faktör içeren deneylerin izlenmesi için özellikle uygundur. İlgili örnek Şekil 5.14'de verilmiştir.

Şekil 5.14'de görüleceği gibi X_1 ve X_2 etkileri normal dağılımdan sapma göstermiştir. Bu grafiğe göre 10 tane deneysel tasarımdan X_1 ve X_2'nin diğerlerine göre cevap değerine daha anlamlı bir etki sergiledikleri ve X_1 faktörünün en anlamlı etkiye sahip olduğu söylenebilmektedir.



Şekil 5. 14. Etkilerin normal dağılım grafiği

5.6.2.2. Tokotrienol türlerinin ayrımı için geliştirilen deneysel tasarım

Deneysel tasarım

Monolitik kolon kullanarak 3 tokotrienol türünün (α, β+γ ve δ) kantitatif olarak tayini için, hareketli faz polaritesi (P'), hareketli faz akış hızı (mL/dk) ve kolon fırını sıcaklığı (°C) parametrelerinin optimum değerleri kemometrik yöntemlerden faydalanılarak tespit edilmiştir. Çizelge 5.21'de optimizasyonu yapılacak parametreler ve kodlanmış seviye değerleri verilmiştir.

Monolitik kolon kullanarak 3 tokotrienol türünün (α, β+γ ve δ) kantitatif olarak tayini için sterollerin tayininde kullanılan 5 seviyeli 3 faktörlü deneysel tasarımın aynısı kullanılmıştır (Çizelge 5.18). İlgili tasarımın tokotrienol türleri için belirlenen kodlanmış değerlere karşılık gelen gerçek değerlerini ve düzenlenmiş analiz sırasını içeren deneysel tasarım Çizelge 5.22'de verilmiştir.

Çizelge 5. 21. Tokotrienol türlerinin tayini için optimizasyonu yapılacak olan parametreler ve kodlanmış seviye değerleri

Seviye	**-1.68179**	**-1**	**0**	**+1**	**+1.68179**
Hareketli faz polaritesi (P')	5.16	5.50	6.00	6.50	6.84
Hareketli faz akış hızı (mL/dk)	1.66	2.00	2.50	3.00	3.34
Kolon Fırını Sıcaklığı (°C)	21.59	25.00	30.00	35.00	38.41

Çizelge 5. 22. Tokotrienol türlerinin tayini için kullanılan deneysel tasarımın gerçek parametre değerleri ve düzenlenmiş analiz sırası

Analiz Sırası	**Hareketli faz polaritesi (P')**	**Hareketli faz akış hızı (mL/dk)**	**Kolon fırını sıcaklığı (°C)**	**Tasarım Sırası**
1	5.16	2.50	30.00	2
2	5.50	2.00	25.00	16
3	5.50	2.00	35.00	4
4	5.50	3.00	25.00	19
5	5.50	3.00	35.00	3
6	6.00	1.66	30.00	17
7	6.00	3.34	30.00	5
8	6.00	2.50	21.59	18
9	6.00	2.50	38.41	1
10	6.00	2.50	30.00	20
11	6.00	2.50	30.00	6
12	6.00	2.50	30.00	7
13	6.00	2.50	30.00	8
14	6.00	2.50	30.00	9
15	6.00	2.50	30.00	10
16	6.50	2.00	25.00	11
17	6.50	2.00	35.00	12
18	6.50	3.00	35.00	13
19	6.50	3.00	25.00	14
20	6.84	2.50	30.00	15

Model eşitliği ve cevap değeri

Kemometrik yöntemlerden faydalanarak tokotrienol türlerinin tayini için 3 tokotrienol türünü (α, β+γ ve δ) içeren bir standart karışım hazırlanmış ve Çizelge 5.22'de verilen her bir deneysel koşula göre aynı anda ve 3 tekrarlı olarak HPLC sistemine enjekte edilmiştir. Her bir analizden elde edilen kromatogramlar kullanılarak o analize ait kromatografik ayırma gücü (R_s) hesaplanmıştır. Kromatografik ayırma gücü hesaplanırken, birbirine en yakın iki pik dikkate alınmıştır. Bu şekilde Çizelge 5.22'deki her bir deneysel koşuldan bir R_s değeri elde edilmiş ve Denklem 5.12 kullanılarak her bir deneysel koşul için cevap değeri oluşturulmuştur.

Elde edilen cevap değerleri, yüzey grafiklerinin çizdirilmesine imkan veren kuadratik model eşitliğin hesaplanmasında ve normal dağılım grafiklerinin çizdirilmesinde kullanılmıştır. Kemometrik yöntemlerden faydalanarak tokotrienol türlerinin tayini için optimize edilen hareketli faz polaritesi, hareketli faz akış hızı ve kolon fırını sıcaklığı parametreleri için 3 adet yüzey grafiği çizdirilerek optimum değerler tespit edilmeye çalışılmıştır. Ayrıca normal dağılım grafikleri de çizdirilerek analiz sonucuna hangi etkinin daha anlamlı katkı sağladığı irdelenmiştir.

5.6.2.3. Tokoferol türlerinin ayrımı için geliştirilen deneysel tasarım

Deneysel tasarım

Monolitik kolon kullanarak 3 tokoferol türünün (α, β+γ ve δ) kantitatif olarak tayini için, hareketli faz polaritesi (P'), hareketli faz akış hızı (mL/dk) ve kolon fırını sıcaklığı (^oC) parametrelerinin optimum değerleri kemometrik yöntemlerden faydalanılarak tespit edilmiştir. Çizelge 5.23'de optimizasyonu yapılacak parametreler ve kodlanmış seviye değerleri verilmiştir.

Monolitik kolon kullanarak 3 tokoferol türünün (α, β+γ ve δ) kantitatif olarak tayini için sterollerin tayininde kullanılan 5 seviyeli 3 faktörlü deneysel tasarımın aynısı kullanılmıştır (Çizelge 5.18). İlgili tasarımın tokoferol türleri için belirlenen kodlanmış değerlere karşılık gelen gerçek değerlerini ve düzenlenmiş analiz sırasını içeren deneysel tasarım Çizelge 5.24'de verilmiştir.

Çizelge 5. 23. Tokoferol türlerinin tayini için optimizasyonu yapılacak olan parametreler ve kodlanmış seviye değerleri

Seviye	**-1.68179**	**-1**	**0**	**+1**	**+1.68179**
Hareketli faz polaritesi (P')	4.86	5.20	5.70	6.20	6.54
Hareketli faz akış hızı (mL/dk)	1.66	2.00	2.50	3.00	3.34
Kolon Fırını Sıcaklığı (°C)	21.59	25.00	30.00	35.00	38.41

Çizelge 5. 24. Tokoferol türlerinin tayini için kullanılan deneysel tasarımın gerçek parametre değerleri ve düzenlenmiş analiz sırası

Analiz Sırası	**Hareketli faz polaritesi (P')**	**Hareketli faz akış hızı (mL/dk)**	**Kolon fırını sıcaklığı (°C)**	**Tasarım Sırası**
1	4.86	2.50	30.00	2
2	5.20	2.00	25.00	16
3	5.20	2.00	35.00	4
4	5.20	3.00	25.00	19
5	5.20	3.00	35.00	3
6	5.70	1.66	30.00	17
7	5.70	3.34	30.00	5
8	5.70	2.50	21.59	18
9	5.70	2.50	38.41	1
10	5.70	2.50	30.00	20
11	5.70	2.50	30.00	6
12	5.70	2.50	30.00	7
13	5.70	2.50	30.00	8
14	5.70	2.50	30.00	9
15	5.70	2.50	30.00	10
16	6.20	2.00	25.00	11
17	6.20	2.00	35.00	12
18	6.20	3.00	35.00	13
19	6.20	3.00	25.00	14
20	6.54	2.50	30.00	15

Model eşitliği ve cevap değeri

Kemometrik yöntemlerden faydalanarak tokoferol türlerinin tayini için 3 tokoferol türünü (α, β+γ ve δ) içeren bir standart karışım hazırlanmış ve Çizelge 5.24'de verilen her bir deneysel koşula göre aynı anda ve 3 tekrarlı olarak HPLC sistemine enjekte edilmiştir. Her bir analizden elde edilen kromatogramlar kullanılarak o analize ait kromatografik ayırma gücü (R_s) hesaplanmıştır. Kromatografik ayırma gücü hesaplanırken, birbirine en yakın iki pik dikkate alınmıştır. Bu şekilde Çizelge 5.24'deki her bir deneysel koşuldan bir R_s değeri elde edilmiş ve Denklem 5.12 kullanılarak her bir deneysel koşul için cevap değeri oluşturulmuştur.

Elde edilen cevap değerleri, yüzey grafiklerinin çizdirilmesine imkan veren kuadratik model eşitliğin hesaplanmasında ve normal dağılım grafiklerinin çizdirilmesinde kullanılmıştır. Kemometrik yöntemlerden faydalanarak tokoferol türlerinin tayini için optimize edilen hareketli faz polaritesi, hareketli faz akış hızı ve kolon fırını sıcaklığı parametreleri için 3 adet yüzey grafiği çizdirilerek optimum değerler tespit edilmeye çalışılmıştır. Ayrıca normal dağılım grafikleri de çizdirilerek analiz sonucuna hangi etkinin daha anlamlı katkı sağladığı irdelenmiştir.

5.6.2.4. Monolitik ayırma2 metodunun kalibrasyonu

MA2 metodunun kromatografik parametrelerinin optimizasyonu gerçekleştirildikten sonra, içeriği bilinmeyen OODD numunelerinin kantitatif olarak tayini için ilgili metodun kalibrasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla sterol, tokotrienol, tokoferol ve skualen türlerinden hazırlanan kalibrasyon standartları geliştirilmiş olan MA2 metoduna göre HPLC sistemine enjeksiyonları yapılmış ve her bir tür için kalibrasyon grafikleri olulturulmuştur.

5.6.2.5 Monolitik ayırma2 metodunun validasyonu ve istatistiksel analizi

MA2 metodunun validasyonu için tez kapsamında temin edilen OODD numunesi sabunlaştırma işlemine tabi tutulmuş ve içerdiği biyoaktif türlerin miktar analizi gerçekleştirilmiştir. OODD numunesinin MA2 metodundan ve standart metotlardan elde edilen sonuçları karşılaştırılarak geliştirilen metodun doğruluğu kontrol edilmiştir.

Monolitik kolon kullanarak biyoaktif bileşenlerin kantitatif olarak tayini için geliştirilecek olan metodun valide edilmesinde aşağıdaki parametreler kullanılacaktır:

- Standart sapma (SD)
- Bağıl standart sapma (RSD)
- Varyans (s^2)
- Varyasyon katsayısı (cv)
- Tayin limiti (Limit of detection, LOD)
- Ölçüm limiti (Limit of quantitation, LOQ)
- Doğruluk (Bağıl hata)

Geliştirilmiş olan metotların, standart metotlarla karşılaştırılmasında; alternatif T testi kullanılmıştır. T testleri P: 0.05 olasılık düzeyinde (%95 güven seviyesinde) gerçekleştirilmiştir.

6. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

6.1. Zeytinyağı Deoderize Distilatının Fiziksel ve Kimyasal Bileşenlerinin Uluslararası Standart Metotlarla Tayini

6.1.1. Nem miktarının tayini

OODD numunesinin nem tayini, AOAC'nin nem tayini metoduna göre (AOAC 1990) yapılmış ve %0.87 ± 0.01 olarak bulunmuştur.

6.1.2. Serbest yağ asidi miktarının titrimetrik tayini

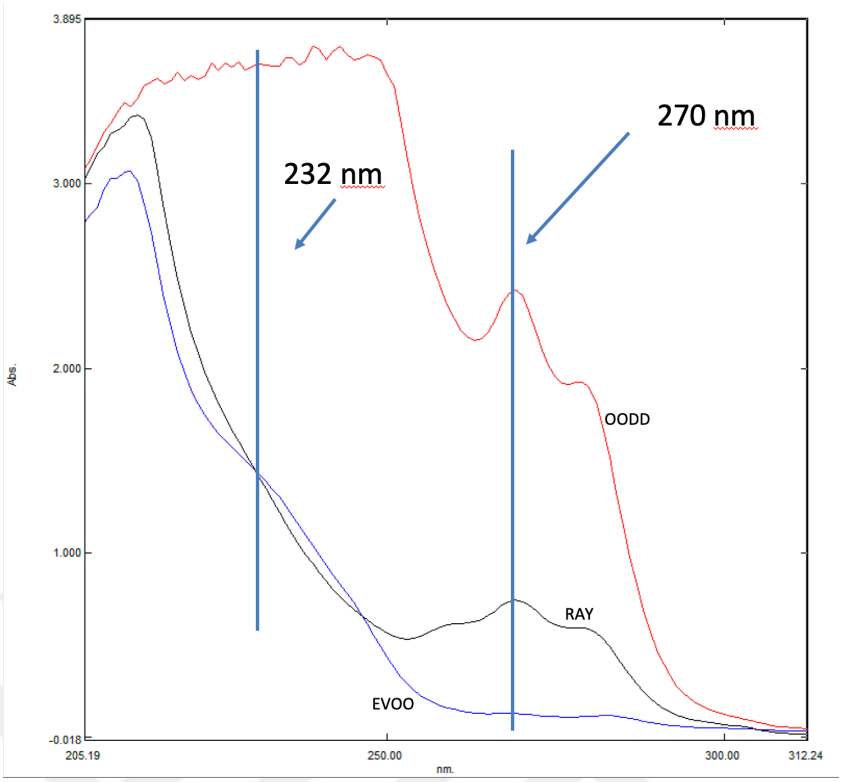
OODD numunesinin FFA miktarı, AOCS'nin Ca 5a-40 kodlu standart titrasyon metoduna göre (AOCS 2017) gerçekleştirilmiş ve oleik asit cinsinden kütlece %88.57 ± 0.28 olarak bulunmuştur.

6.1.3. İyot sayısının titrimetrik tayini

OODD numunesinin IV, AOCS'nin Cd 1-25 kodlu standart titrasyon metoduna göre (AOCS 2017) gerçekleştirilmiş ve 78.78 ± 0.82 olarak bulunmuştur.

6.1.4. Birincil ve ikincil oksidasyon ürünlerinin spektroskopik tayini

Çalışma kapsamında EVOO, OODD ve RAY numunelerinin birincil ve ikincil oksidayon ürünleri tayin edilmiştir. Şekil 6.1'de ilgili numunelerinin Ultraviyole-görünür alan spektrumları verilmiştir.



Şekil 6. 1. EVOO, OODD ve RAY numunelerinin Ultraviyole-görünür alan spektrumları

EVOO, OODD ve RAY numunelerinin 232 ve 270 nm'deki absorbans değerlerinden, birincil ve ikincil oksidasyon ürünleri hakkında yorumlama imkanı veren As_{232} ve As_{270} indeks değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 6.1)

Çizelge 6. 1. EVOO, OODD ve RAY numunelerinin As_{232} ve As_{272} indeks değerleri

	OODD		**EVOO**		**RAY**	
	As_{232} ± SD	**As_{270} ± SD**	**As_{232} ± SD**	**As_{270} ± SD**	**As_{232} ± SD**	**As_{270} ± SD**
Ortalama ± s	6.52 ± 0.01	4.27 ± 0.01	2.28 ± 0.01	0.20 ± 0.01	2.47 ± 0.01	0.13 ± 0.01

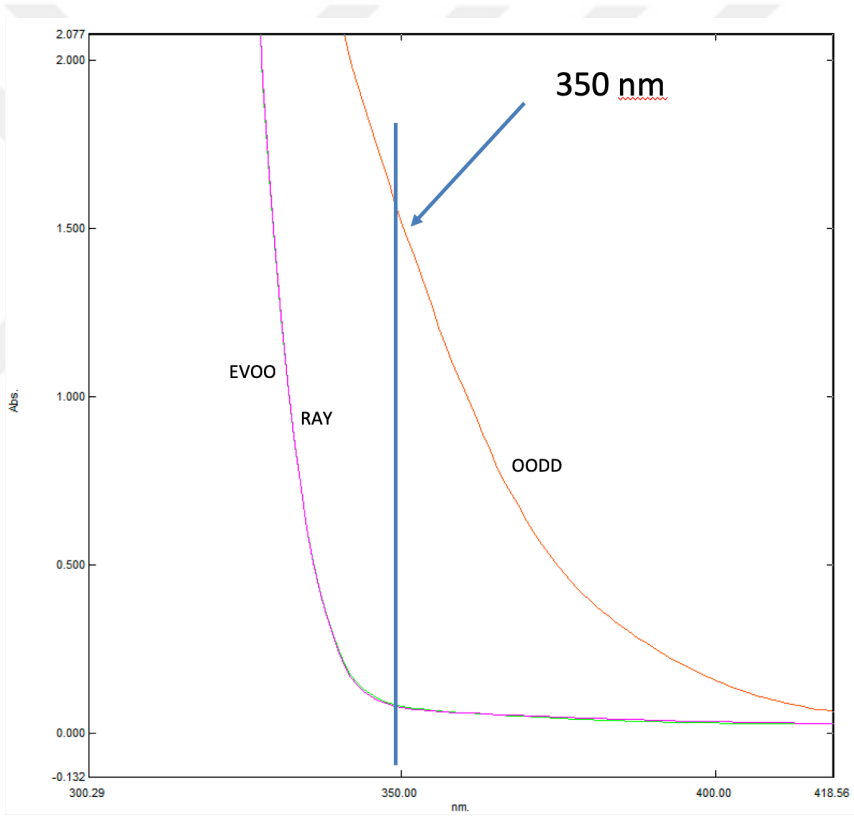
Bitkisel yağların rafinasyonunda birçok safsızlığın yanı sıra hiperoksitler ve keton türevleri de yağdan uzaklaştırılmakta ve deoderizasyon kademesinde toplanmaktadır. Uzaklaştırılan bu türlerin 232 ve 270 nm'deki verdikleri absorbans ile miktarları hakkında yorumlamalar yapılabilmektedir. Çizelge 6.10'daki değerler incelendiğinde, en yüksek değerler beklenildiği gibi OODD numunesinde görülmüştür. OODD numunesinin As_{232} değeri diğer numunelere göre yaklaşık 3 kat; As_{270} değeri ise yaklaşık 26 kat fazla çıkmıştır. Bu durum OODD numunesinin rafinasyon işlemi gereği hiperoksit ve keton türevlerini çokça bulundurduğunu göstermektedir.

6.1.5. Peroksit sayısının titrimetrik tayini

OODD numunesinin PV, AOCS'nin Cd 8b-90 kodlu standart titrasyon metoduna göre gerçekleştirilmiş ve 15.74 ± 0.33 olarak bulunmuştur.

6.1.6. Anisidin ve totoks sayılarının spektroskopik tayini

Çalışma kapsamında EVOO, OODD ve RAY numunelerinin AV ve TV değerleri tayin edilmiştir. Şekil 6.2'de ilgili numunelerinin Ultraviyole-görünür alan spektrumları verilmiştir.



Şekil 6. 2. EVOO, OODD ve RAY numunelerinin Ultraviyole-görünür alan spektrumları

EVOO, OODD ve RAY numunelerinin 350 nm'deki absorbans değerlerinden, AV değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 6.2).

Çizelge 6. 2. EVOO, OODD ve RAY numunelerinin AV ve TV değerleri

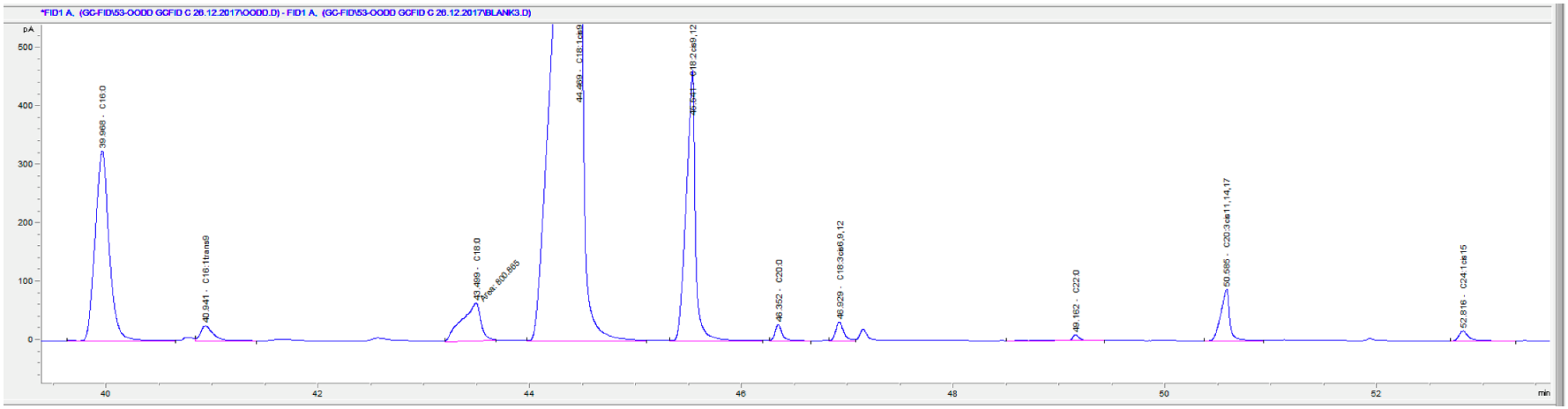
	OODD ± SD	**EVOO ± SD**	**RAY ± SD**
AV	85.37 ± 0.01	3.41 ± 0.00	3.72 ± 0.01
TV	116.85 ± 0.67	-	-

Bitkisel yağların rafinasyonunda birçok safsızlığın yanı sıra alfa-beta doymamış aldehitler de yağdan uzaklaştırılmakta ve deoderizasyon kademesinde toplanmaktadır. Uzaklaştırılan bu türlerin ön işlemlerden sonra 350 nm'de verdikleri absorbans ile miktarları hakkında yorumlamalar yapılabilmektedir. Çizelge 6.11'daki değerler incelendiğinde, en yüksek AV değeri beklenildiği gibi OODD numunesinde görülmüştür. OODD numunesinin AV değeri diğer yağlara göre yaklaşık 22 kat fazla çıkmıştır. Bu durum OODD numunesinin rafinasyon işlemi gereği alfa-beta doymamış aldehit türevlerini çokça bulundurduğunu göstermektedir. Ayrıca OODD numunesi için TV değeri de hesaplanmış ve beklenildiği gibi yüksek bir değer tespit edilmiştir.

6.1.7. Yağ asidi kompozisyonunun gaz kromatografisi ile tayini

Çalışma kapsamında OODD numunesinin ve karşılaştırma yapabilmek için EVOO numunesinin yağ asitleri, metil türevlerine dönüştürülerek analiz edilmiştir. Şekil 6.3'de OODD numunesinin yağ asitlerinin kromatogramı verilmiştir. OODD ve EVOO numunelerinin yağ asidi analizleri gerçekleştirildikten sonra her bir yağ asidinin toplam yağ asidi miktarına göre yüzdesi hesaplanmış ve literatür (Kara 2008) literatür sonuçlarına göre karşılaştırılmıştır (Çizelge 6.3).

Çizelge 6.3 incelendiğinde yağ asidi analizi yapılmış olan OODD ve EVOO numunelerinin yağ asidi yüzdelerinin birbiri ile ve literatürle uyumlu olarak tespit edildiği görülmüştür. Özellikle zeytinyağları için belirleyici bir oran olan C18:1 yağ asidi oranı, beklendiği gibi diğer yağ asitlerine göre yüksek bir yüzdede tespit edilmiştir. OODD numunesinin yağ asidi yüzdeleri, analizi yapılan distilat örneğinin zeytinyağına ait bir distilat olduğunu göstermektedir.



Şekil 6. 3. OODD numunesinin yağ asit kompozisyonu kromatogramı

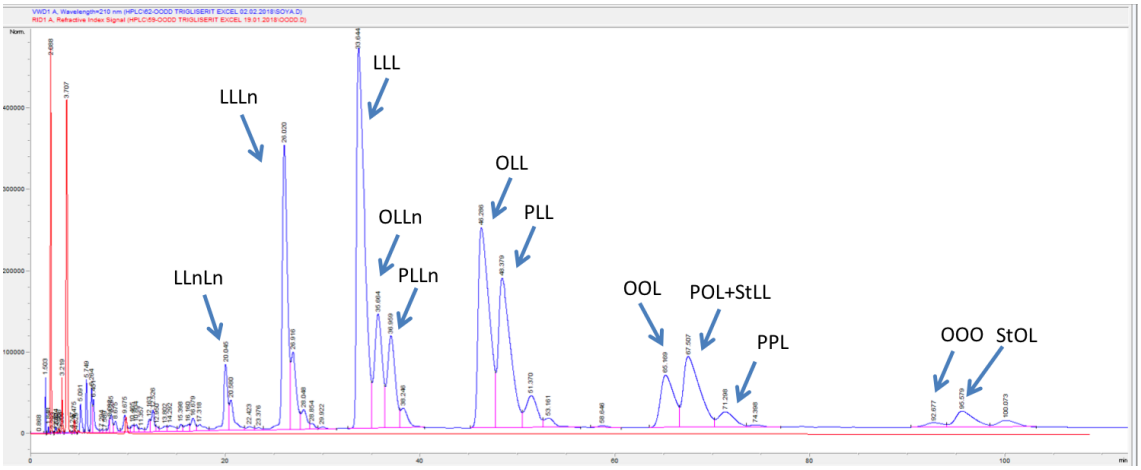
Çizelge 6. 3. OODD ve EVOO numunelerinin yağ asidi kompozisyonu

Yağ Asidi (%)	**OODD ± SD**	**EVOO ± SD**	**Literatür (Kara 2008)**
C14:0	te	te	0.02
C16:0	10.42 ± 0.01	11.41 ± 0.02	12.37
C16:1 cis9	0.74 ± 0.01	0.84 ± 0.01	0.90
C18:0	2.81 ± 0.02	3.07 ± 0.03	2.61
C18:1 cis9	72.90 ± 0.01	74.80 ± 0.01	71.18
C18:2 cis9,12	9.71 ± 0.02	8.19 ± 0.01	11.6
C20:0	0.44 ± 0.04	0.43 ± 0.03	0.44
C18:3 cis6,9,12	0.59 ± 0.01	0.54 ± 0.01	0.88
C22:0	0.22 ± 0.02	0.11 ± 0.03	-
C20:3 cis11.14.17	1.81 ± 0.01	0.61 ± 0.01	-
C24:1cis15	0.36 ± 0.03	-	-
ΣSFA	13.89 ± 0.09	15.02 ± 0.11	15.44
ΣMUFA	74.00 ± 0.05	75.64 ± 0.02	72.08
ΣPUFA	12.11 ± 0.04	9.34 ± 0.03	12.48

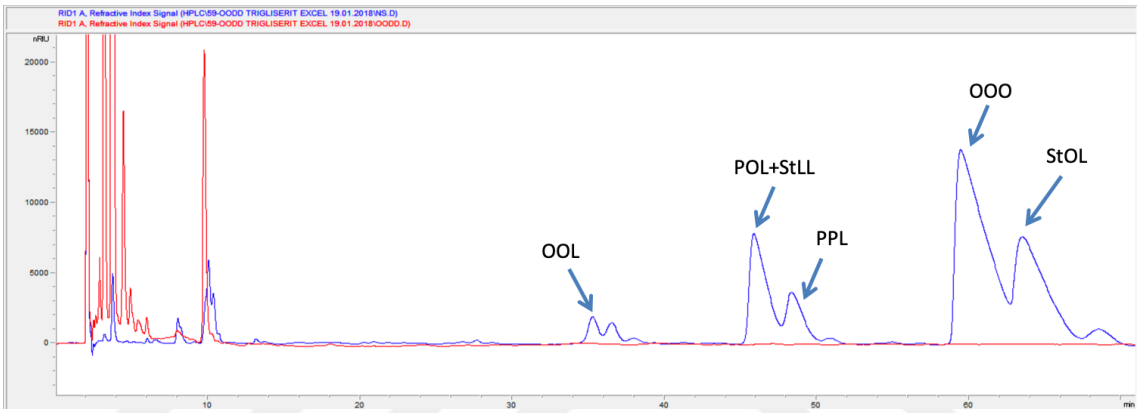
te: Tespit edilemedi

6.1.8. Trigliserit kompozisyonunun sıvı kromatografisi ile tayini

Çalışma kapsamında OODD numunesinin ve karşılaştırma yapabilmek için RSY numunesinin TG analizleri gerçekleştirilmiştir. TG analizi için kullanılmış olan standart metot (AOCS 2017) RSY ile kalibre edilmiştir. Bu sebeple TG türlerinin doğru analiz edilip edilmediğinin kontrolü için RSY kullanılmıştır. Şekil 6.4 a) da OODD ve RSY; b) de ise OODD ve EVOO numunelerinin TG kromatogramları verilmiştir.



a)



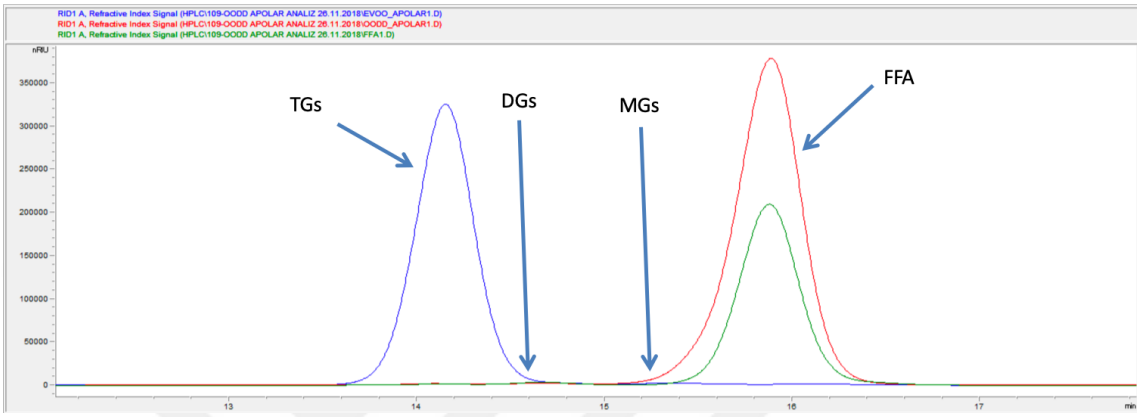
b)

Şekil 6. 4. OODD (Kırmızı)-RSY (Mavi) (a) ve OODD (Kırmızı)-EVOO (Mavi) (b) numunelerinin TG kromatogramları

Şekil 6.4'de görüldüğü üzere kullanılan standart TG analiz metodu RSY'nın TG kompozisyonunu vermiştir. Fakat OODD numunesinde tespit edilebilen herhangi bir TG türü olmamıştır. Rafinasyon prosesinin deoderizasyon basamağında deoderize distilat kısmına TG kaçakları olmaktadır. Deoderizasyon basamağının sahip olduğu yüksek sıcaklık ve basınç şartları TG moleküllerinin çoğunu MG ve DG'lere parçalamaktadır. Ancak geride az da olsa TG kalmaktadır. Yapılan literatür araştırmalarında sadece bir çalışmada kullanılan OODD'nin TG yüzdesi kütlece %0.8 olarak verilmiştir (Gutiérrez ve ark 2014). Tarafımızca yapılan TG analizinde OODD numunesinde herhangi bir TG yapısı tespit edilememesinin sebebi olarak OODD numunesinin düşük TG yüzdesinin, kullanılan metodun tayin limitinin altında kaldığı düşünülmektedir.

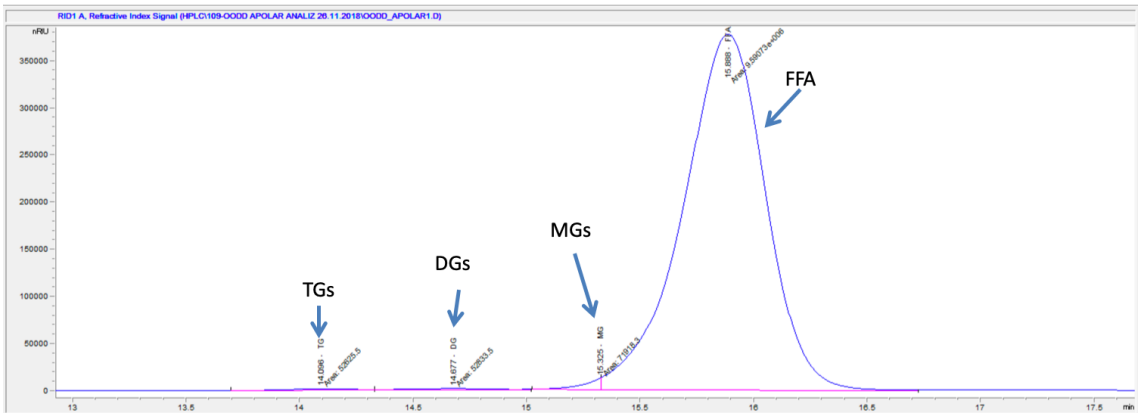
6.1.9. Polar ve apolar madde miktarının sıvı kromatografisi ile tayini

Çalışma kapsamında OODD numunesinin ve karşılaştırma yapabilmek için EVOO numunesinin polar ve apolar madde tayini analizleri gerçekleştirilmiştir. Şekil 6.5'de OODD, EVOO ve FFA numunelerinin apolar fraksiyon kromatogramları verilmiştir.



Şekil 6. 5. OODD (kırmızı), EVOO (mavi) ve FFA (Yeşil) numunelerinin apolar fraksiyon kromatogramları (PTGs: Politrigliseritler, TGs: Trigliseritler, DGs: Digliseritler, MGs: Monogliseritler, FFA: Serbest yağ asitleri)

Kullanılmış olan kromatografik metoda göre apolar fraksiyonların çıkış sırası politrigliseritler (PTG), TG, DG, MG ve FFA şeklinde olmaktadır. Yemeklik yağların neredeyse %98'i TG'lerden meydana geldiği için EVOO numunesinin apolar fraksiyonunda beklenildiği gibi en yüksek pik TGs'den elde edilmiştir. EVOO numunesinden elde edilen diğer apolar fraksiyon ise düşük miktarda FFA olmuştur. EVOO'ları rafine edilmeden kullanıldığı için Uluslararası kuruluşlara göre en fazla %0.8 oranında FFA içermelidir. Yapılmış olan apolar fraksiyon analizinde EVOO numunesinin bu değere yakın bir FFA oranı içerdiği tespit edilmiştir.



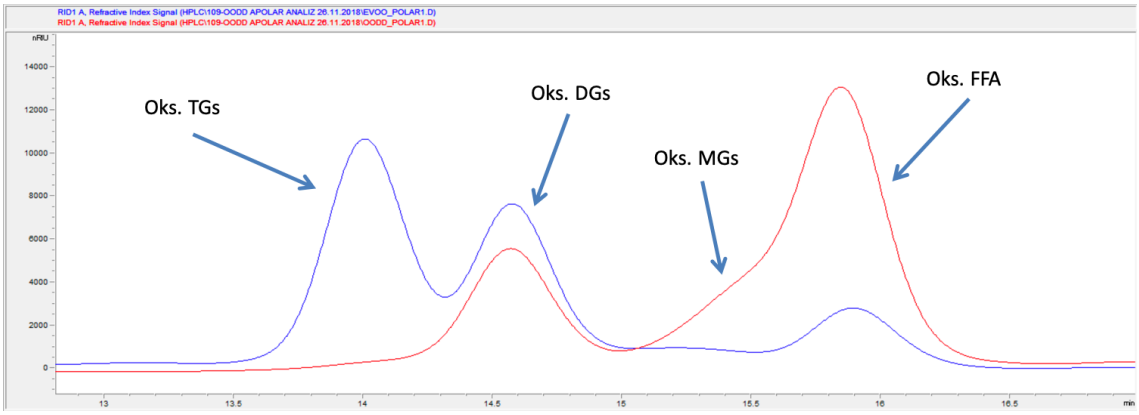
Şekil 6. 6. OODD numunesinin apolar fraksiyon kromatogramı

Özellikle fiziksel rafinasyon sonucu elde edilen deoderize distilatlar yüksek FFA oranlarına sahip olmaktadır. OODD numunesinin apolar fraksiyonları incelendiğinde beklenildiği gibi en yüksek pik FFA'dan elde edilmiştir (Şekil 6.6). OODD numunesinin apolar ve polar fraksiyonlarının yüzdeleri Çizelge 6.4'de verilmiştir.

Çizelge 6. 4. OODD numunesinin apolar fraksiyonlarının yüzdeleri

	OODD		**EVOO**	
	%Genel Oranı	**%Fraksiyon Oranı**	**%Genel Oranı**	**%Fraksiyon Oranı**
PTGs	94.40	te	93.68	te
TGs		0.54 ± 0.20		%91.74 ± 0.18
DGs		0.54± 0.21		%3.91 ± 0.25
MGs		0.74 ± 0.17		2.51 ± 0.25
FFA		98.18 ± 0.24		1.84 ± 0.24
Oks. PTGs	5.60	te	6.32	te
Oks. TGs		1.80 ± 0.20		%46.34 ± 0.12
Oks. DGs		25.06 ± 0.21		%33.76 ± 0.11
Oks. MGs		5.11 ± 0.17		%5.15 ± 0.09
Oks. FFA		68.03 ± 0.24		%14.73 ± 0.21

Şekil 6.7'de OODD ve EVOO numunelerinin polar fraksiyon kromatogramları verilmiştir.

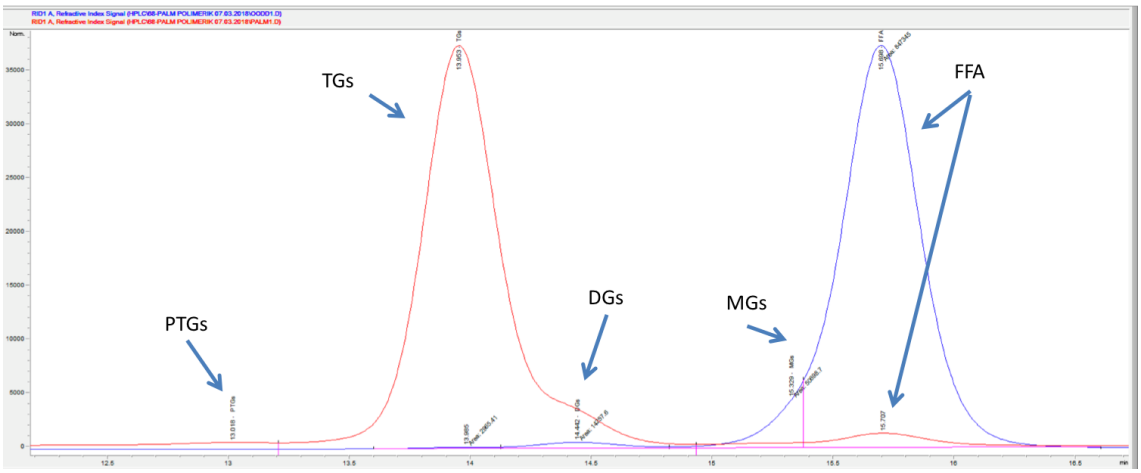


Şekil 6. 7. OODD (kırmızı) ve EVOO (mavi) numunelerinin polar fraksiyon kromatogramları (Oks. PTGs: Oksidatif poliTG'ler, Oks. TGs: Oksidatif TG'ler, Oks. DGs: Oksidatif digliseritler, Oks. MGs: Oksidatif monogliseritler)

Kullanılmış olan kromatografik metoda göre polar fraksiyonların çıkış sırası Oks. PTGs, Oks. TGs, Oks. DGs ve Oks. MGs şeklinde olmaktadır. OODD numunesindeki oksidatif tüm türler tespit edilmiş ve en büyük miktarın oksidatif FFA dan geldiği görülmüştür. OODD numunesinin apolar ve polar fraksiyonlarının yüzdeleri Çizelge 6.4'de verilmiştir.

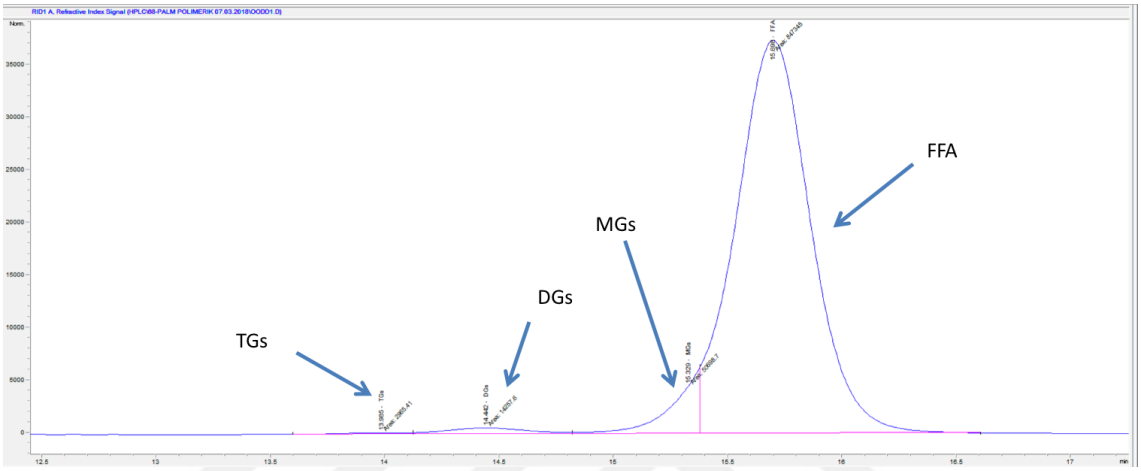
6.1.10. Polimerik madde miktarının sıvı kromatografisi ile tayini

Çalışma kapsamında OODD numunesinin ve karşılaştırma yapabilmek için HPY numunesinin polimerik madde tayini analizleri gerçekleştirilmiştir. Şekil 6.8'de OODD ve HPY numunelerinin polimerik madde kromatogramları verilmiştir.



Şekil 6. 8. OODD (mavi) ve HPY (kırmızı) numunelerinin polimerik madde kromatogramları

Kullanılmış olan kromatografik metoda göre polimerik madde çıkış sırası PTGs, TGs, DGs, MGs ve FFA şeklinde olmaktadır. Yemeklik yağların neredeyse %98'i TG'lerden meydana geldiği için HPY numunesinin polimerik madde profilinde beklenildiği gibi en yüksek pik TGs'den elde edilmiştir. HPY numunesinden elde edilen bir diğer polimerik madde ise DGs olmuştur. Çalışmada kullanılan HPY numunesi ham bir yağ olduğu için ve nispeten yüksek FFA içerdiği için çalışmada tespit edilebilmiştir.



Şekil 6. 9. OODD numunesinin polimerik madde kromatogramı

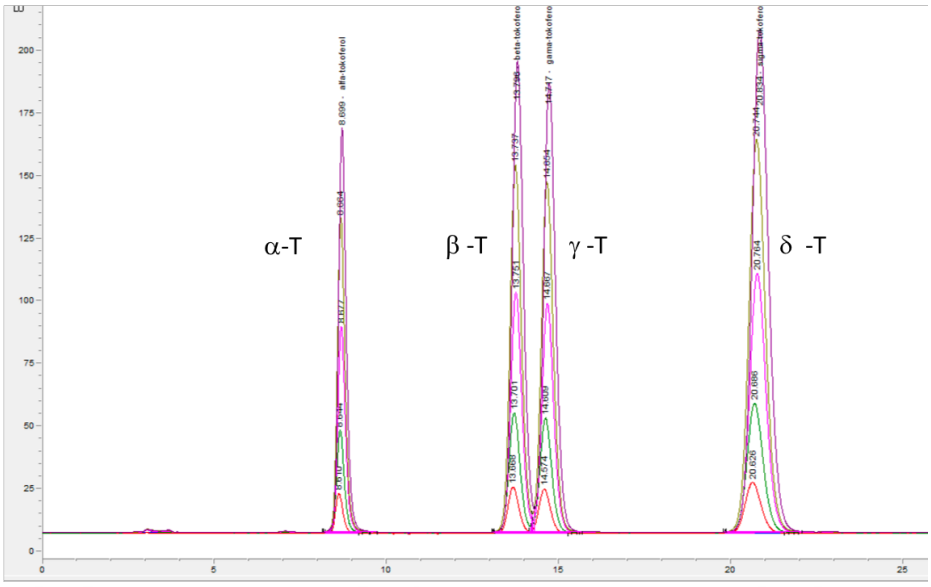
Özellikle fiziksel rafinasyon sonucu elde edilen deoderize distilatlar yüksek FFA oranlarına sahip olmaktadır. OODD numunesinin polimerik madde içeriği incelendiğinde beklenildiği gibi en yüksek pik FFA'dan elde edilmiştir (Şekil 6.9). OODD numunesinin polimerik madde yüzdeleri Çizelge 6.5'de verilmiştir.

Çizelge 6. 5. OODD numunesinin polimerik madde yüzdeleri

OODD	PTGs ± SD	TGs ± SD	DGs ± SD	MGs ± SD	FFAs ± SD
% Oran	te	0.29 ± 0.26	1.79 ± 0.22	9.12 ± 0.23	88.80 ± 0.20

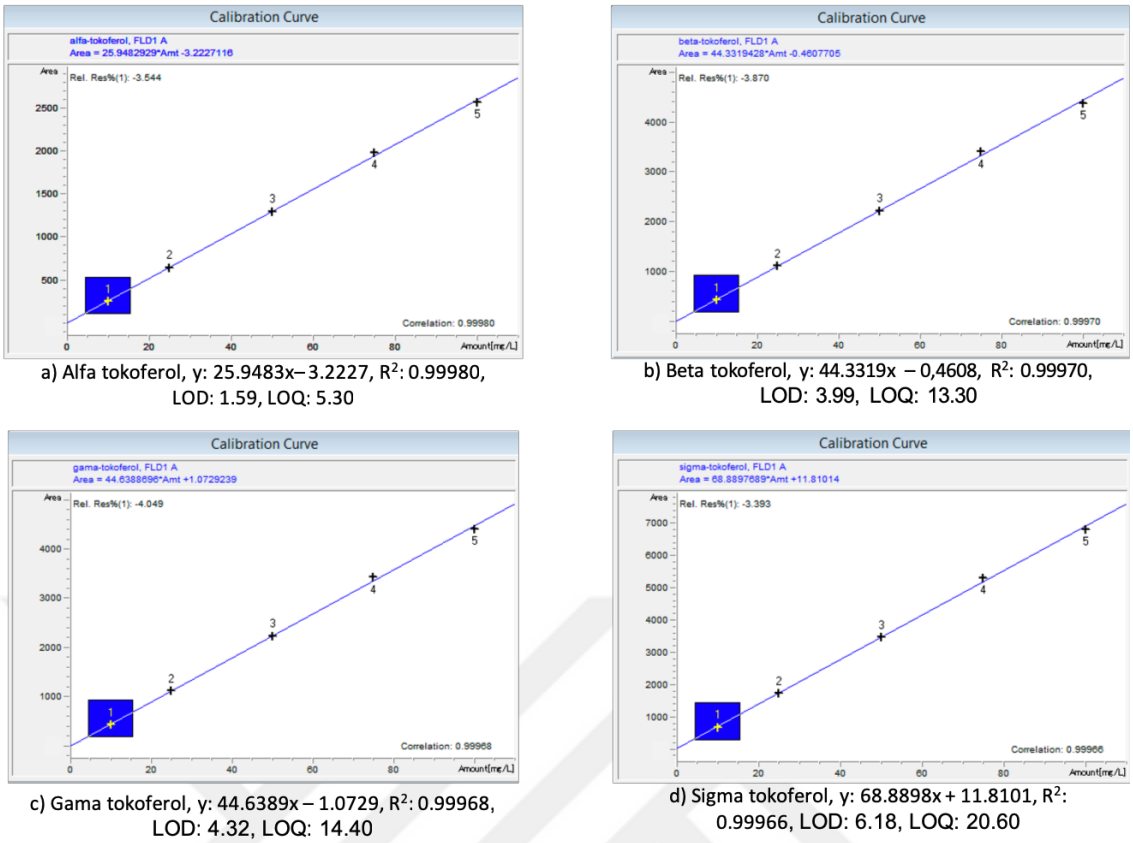
6.1.11. Tokoferol-tokotrienol miktarının sıvı kromatografisi ile tayini

OODD numunesinin tokoferol-tokotrienol miktarının tayini kapsamında yapılmış olan çalışmalarda ilk önce tokoferol miktarı belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla hazırlanmış olan tokoferol kalibrasyon standartlarının kromatogramı Şekil 6.10'da verilmiştir.



Şekil 6. 10. Alfa, beta, gama ve sigma tokoferol içeren 10, 25, 50, 75 ve 100 mg/L'lik kalibrasyon standartlarının kromatogramı (α-T: α-tokoferol, β-T: β-tokoferol, γ-T: γ-tokoferol, δ-T: δ-tokoferol)

Kullanılmış olan kromatografik metoda göre tokoferol türlerinin çıkış sırası α-tokoferol, β-tokoferol, γ-tokoferol ve δ-tokoferol şeklinde olmuştur. Hazırlanmış olan kalibrasyon standartları HPLC sisteminde okutulmuş ve pik alanlarından elde edilen değerleri ile konsantrasyon değerleri kullanılarak yazılım tarafından kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. Her bir tokoferol türüne ait olan ve yüksek birer R^2 değerinin elde edildiği kalibrasyon grafikleri Şekil 6.11'de verilmiştir.



a) Alfa tokoferol, y: 25.9483x– 3.2227, R^2: 0.99980, LOD: 1.59, LOQ: 5.30

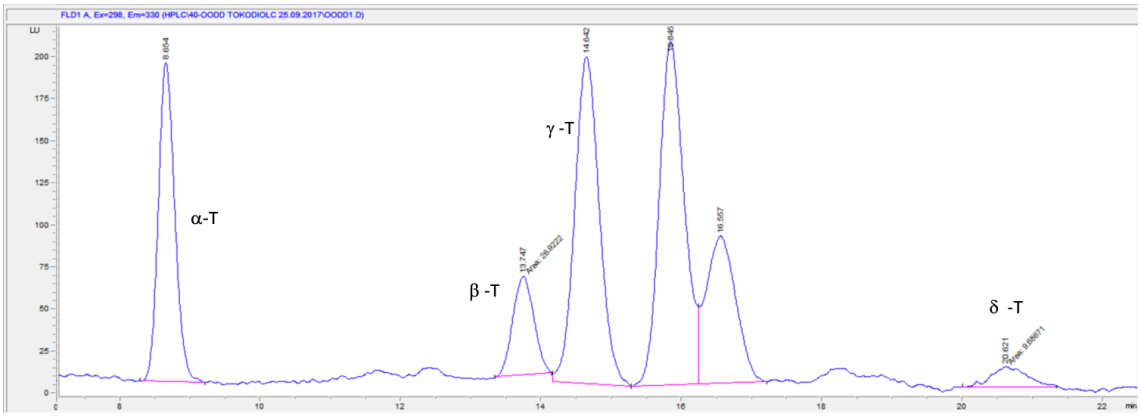
b) Beta tokoferol, y: 44.3319x – 0,4608, R^2: 0.99970, LOD: 3.99, LOQ: 13.30

c) Gama tokoferol, y: 44.6389x – 1.0729, R^2: 0.99968, LOD: 4.32, LOQ: 14.40

d) Sigma tokoferol, y: 68.8898x + 11.8101, R^2: 0.99966, LOD: 6.18, LOQ: 20.60

Şekil 6. 11. OODD numunesinin tokoferol miktarının tespitinde kullanılan kalibrasyon grafikleri

Tokoferol miktarının tayini için kullanılan standart metot kalibre edildikten sonra OODD numunesinin analizi yapılmış ve içerdiği tokoferol türleri tespit edilmiştir. OODD numunesinin tokoferol türlerine ait kromatogramı Şekil 6.12'da verilmiştir.



Şekil 6. 12. OODD numunesinin tokoferol türlerine ait kromatogramı

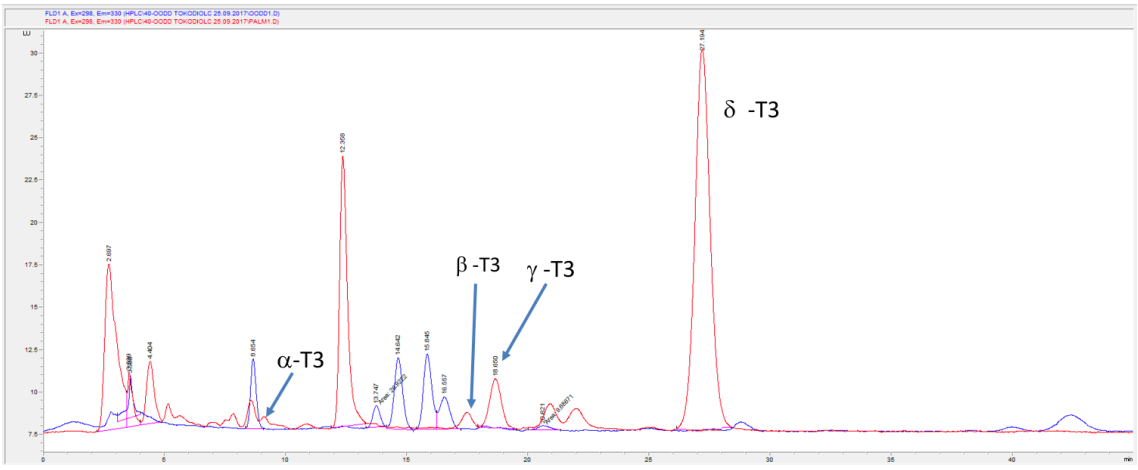
OODD numunesinin tokoferol içeriğinin tespiti amacıyla yapılmış olan 3 tekrarlı analizler sonucunda alfa, beta ve gama tokoferol türlerini içerdiği tespit edilmiştir. Tespit edilen tokoferol türlerinin miktarları Çizelge 6.6'da verilmiştir.

Çizelge 6. 6. OODD numunesinin tokoferol miktarları

	α-tokoferol (mg/kg)	**β-tokoferol (mg/kg)**	**γ-tokoferol (mg/kg)**	**δ-tokoferol (mg/kg)**	**Toplam tokoferol (mg/kg)**
OODD ± SD	15413.14 ± 0.53	3705.20 ± 1.33	12968.11 ± 1.44	361.92 ± 2.06	32449.17 ± 0.83
Literatür	-	-	-		20000-150000 (Verleyen ve ark 2001)

Yenilebilir yağlarda oksidasyonu engelleyen ve insan sağlığı için son derece faydalı olan tokoferol türleri, rafinasyon prosesinin deoderizasyon basamağının sahip olduğu yüksek sıcaklık ve basınç gibi zorlu şartlar sebebiyle yağdan uzaklaşmakta ve deoderize distilatta birikmektedir. Özellikle yüksek oranda tokoferol içeren yenilebilir yağların deoderize distilatları tokoferol miktarınca zengin olmaktadır. Yapılmış olan çalışmada kullanılan OODD numunesinin tokoferol miktarı da beklenildiği gibi literatüre uygun bir aralıkta çıkmıştır. En yüksek değer özellikle E vitamini etkinliği ile bilinen α-tokoferolden elde edilmiştir.

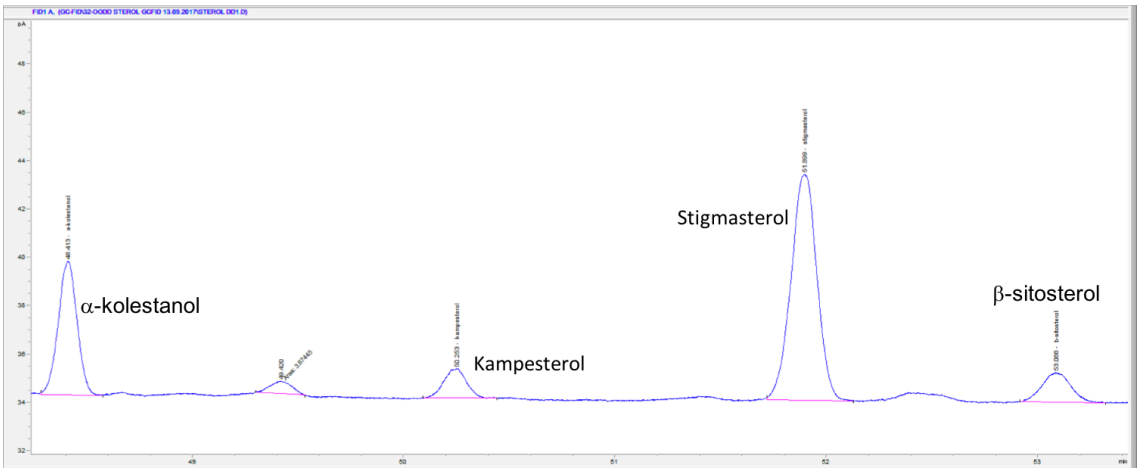
Çalışmanın ikinci kısmında, tokoferol türleri tespit edilen OODD numunesinin tokotrienol türleri tespit edilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla, yüksek tokotrienol içeriğine sahip olduğu bilinen HPY numunesi analiz edilerek tokotrienol türlerinin çıkış zamanları tespit edilmiş ve OODD numunesinin kromatogramı ile karşılaştırılmıştır (Şekil 6.13). Yapılmış olan çalışmalar neticesinde OODD numunesinde herhangi bir tokotrienol türü tespit edilememiştir.



Şekil 6. 13. HPY (kırmızı) ve OODD (mavi) numunelerinin tokotrienol türlerine ait kromatogramı (α-T3: Alfa tokotrienol, β-T3: Beta tokotrienol, γ-T3: Gama tokotrienol, δ -T3: Sigma tokotrienol)

6.1.12 Sterol miktarının gaz kromatografisi ile tayini

Çalışma kapsamında sabunlaştırılan ve silillenen OODD numunesinin içerdiği sterol türleri, GC-MS cihazı ile tespit edildikten sonra miktar tayini için daha hassas bir detektöre sahip GC-FID cihazı kullanılmıştır. Şekil 6.14'de OODD numunesinin sterol türlerinin kromatogramı verilmiştir.



Şekil 6. 14. OODD numunesinin sterol türlerine ait kromatogramı

Kullanılmış olan kromatografik metoda göre sterol türlerinin çıkış sırası alfa kolestanol, kampesterol, stigmasterol ve beta-sitosterol şeklinde olmuştur. Elde edilen kromatogramda, miktarı tam olarak bilinen iç standart α-kolestanol'ün pik alanından faydalanarak diğer sterol türlerinin miktarları tespit edilmiş ve Çizelge 6.7'de verilmiştir.

Çizelge 6. 7. OODD numunesinin sterol miktarları

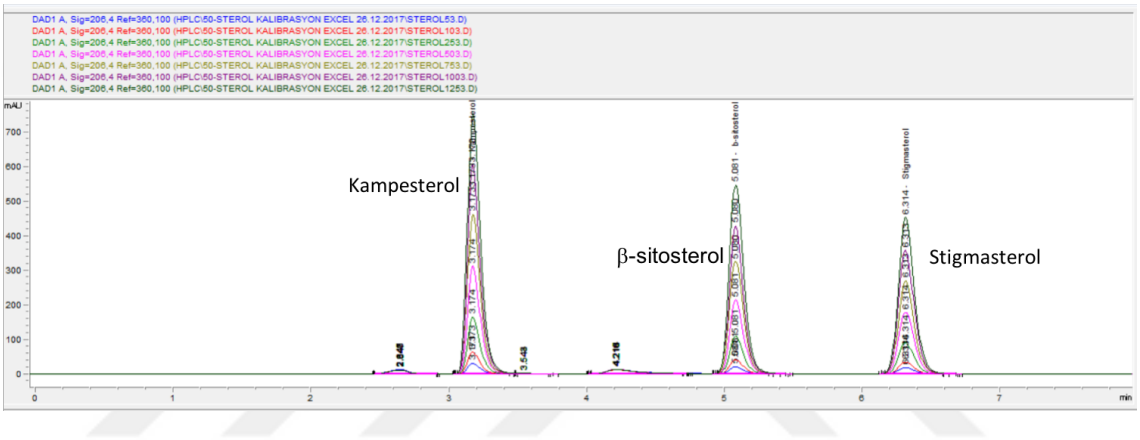
	Kampesterol (mg/kg)	**Stigmasterol (mg/kg)**	**β-sitosterol (mg/kg)**	**Toplam sterol (mg/kg)**
OODD ± SD	12.73 ± 0.54	109.92 ± 2.04	15.76 ± 0.40	138.41 ± 2.67
Literatür	-	-	-	120-250 (Gutiérrez ve ark 2014)

Yapılmış olan çalışmada kullanılan OODD numunesinin sterol miktarı literatüre uygun bir aralıkta çıkmıştır. En yüksek değer stigmasterol türünden elde edilmiştir.

6.1.13. Sterol miktarının sıvı kromatografisi ile tayini

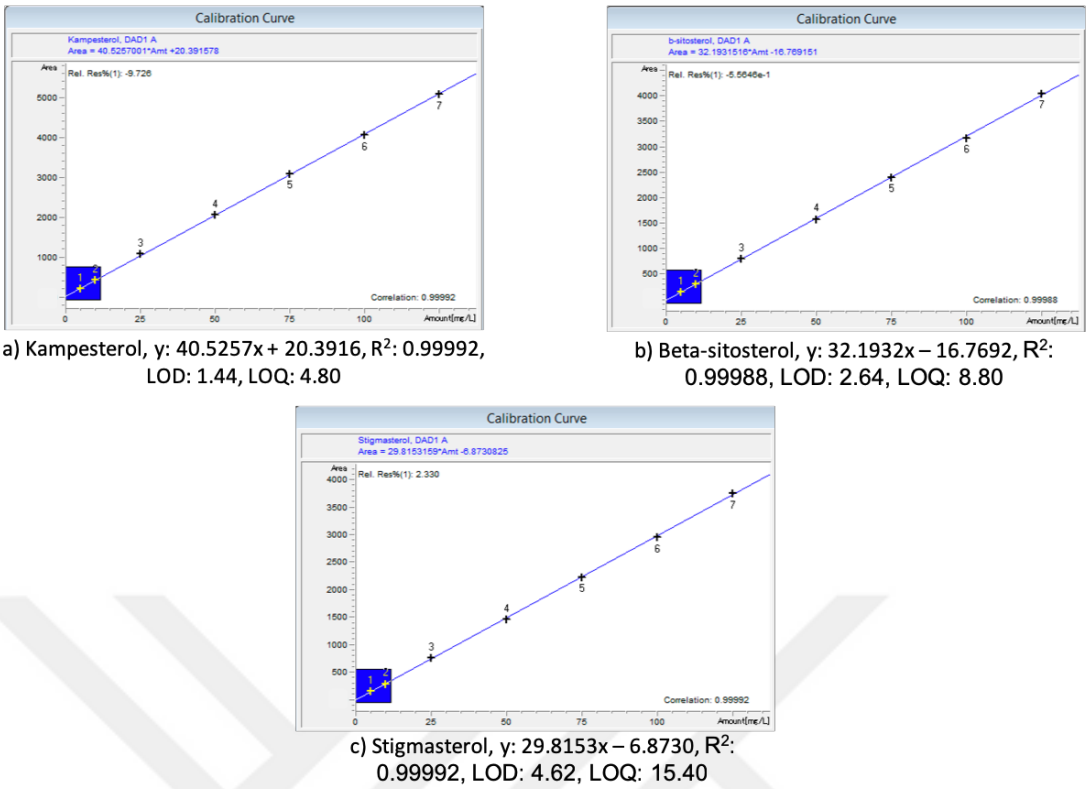
6.1.13.1. En küçük kareler metodu ile sterol miktarının tayini

OODD numunesinin sıvı kromatografisi ile sterol miktarının tayini kapsamında yapılmış olan çalışmalarda ilk önce en küçük kareler metodu kullanılmıştır. Bu amaçla hazırlanmış olan sterol kalibrasyon standartlarının kromatogramı Şekil 6.15'de verilmiştir.



Şekil 6. 15. Kampesterol, β-sitosterol ve stigmasterol içeren 5, 10, 25, 50, 75, 100, 125 mg/L'lik kalibrasyon standartlarının kromatogramı

Kullanılmış olan kromatografik metoda göre sterol türlerinin çıkış sırası kampesterol, beta-sitosterol ve stigmasterol şeklinde olmuştur. Hazırlanmış olan kalibrasyon standartları HPLC sisteminde okutulmuş ve pik alanlarından elde edilen değerleri ile konsantrasyon değerleri kullanılarak yazılım tarafından kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. Her bir sterol türüne ait olan ve yüksek birer R^2 değerinin elde edildiği kalibrasyon grafikleri Şekil 6.16'da verilmiştir.



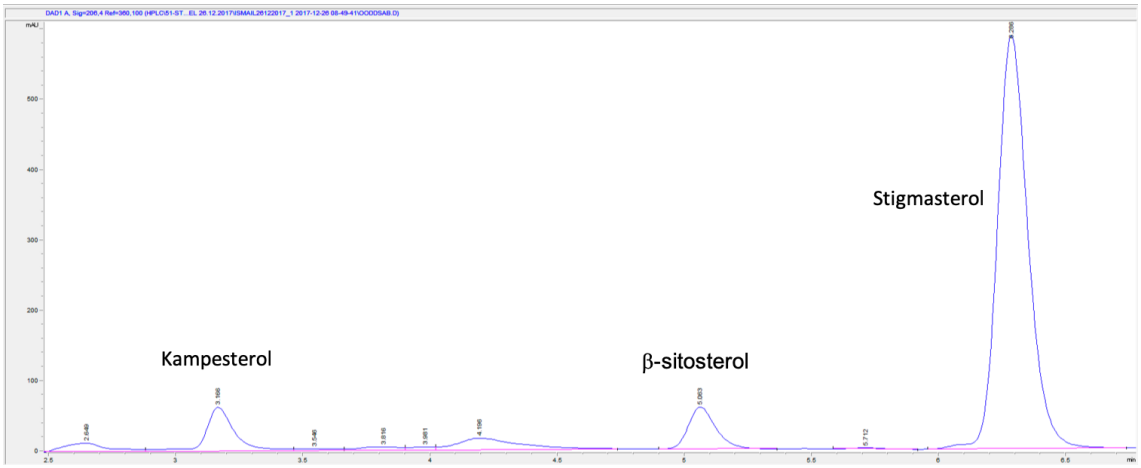
a) Kampesterol, y: 40.5257x + 20.3916, R^2: 0.99992, LOD: 1.44, LOQ: 4.80

b) Beta-sitosterol, y: 32.1932x – 16.7692, R^2: 0.99988, LOD: 2.64, LOQ: 8.80

c) Stigmasterol, y: 29.8153x – 6.8730, R^2: 0.99992, LOD: 4.62, LOQ: 15.40

Şekil 6. 16. OODD numunesinin sterol miktarının tespitinde kullanılan kalibrasyon grafikleri

Sterol miktarının tayini için kullanılan standart metot kalibre edildikten sonra OODD numunesinin analizi yapılmış ve içerdiği sterol türleri tespit edilmiştir. OODD numunesinin sterol türlerine ait kromatogramı Şekil 6.17'de verilmiştir.



Şekil 6. 17. OODD numunesinin sterol türlerine ait kromatogramı

OODD numunesinin sterol içeriğinin tespiti amacıyla yapılmış olan 3 tekrarlı analizler sonucunda, gaz karomatografisi ile elde edilen sonuçlara uygun olarak

kampesterol, beta-sitosterol ve stigmasterol türlerini içerdiği tespit edilmiştir. Tespit edilen sterol türlerinin miktarları Çizelge 6.8'de verilmiştir.

Çizelge 6. 8. OODD numunesinin sterol miktarları

	Kampesterol (mg/kg)	**β-sitosterol (mg/kg)**	**Stigmasterol (mg/kg)**	**Toplam sterol (mg/kg)**
OODD ± SD	11.67 ± 0.48	14.55 ± 0.88	107,77 ± 1.54	133.99 ± 1.98
Literatür	-	-	-	120-250 (Gutiérrez ve ark 2014)

Çizelge 6.9'da, OODD numunesinin GC'den ve en küçük kareler metodu kullanılan sıvı kromatografisinden elde edilen sterol sonuçları ve Denklem 6.1 kullanılarak ede edilen T testi sonuçları karşılaştırmalı olarak verilmiştir.

$$T_d = \frac{2\left|\overline{y_1} - \overline{y_2}\right|}{w_1 + w_2} \qquad (6.1)$$

Td: Hesaplanan T değeri
y_1: Birinci veri grubunun ortalaması
y_2: İkinci veri grubunun ortalaması
w_1: Birinci veri grubunun dağılımı
w_2: İkinci veri grubunun dağılımı

Çizelge 6. 9. OODD numunesinin GC'den ve en küçük kareler metodu kullanılan sıvı kromatografisinden elde edilen sterol sonuçları

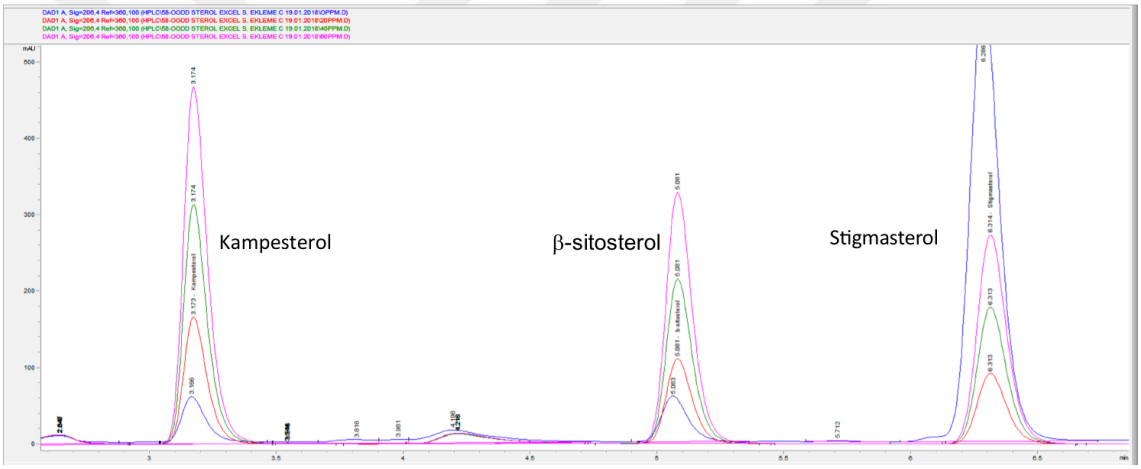
	Kampesterol (mg/kg)	**β-sitosterol (mg/kg)**	**Stigmasterol (mg/kg)**	**Toplam sterol (mg/kg)**
GC ± SD	12.73 ± 0.54	15.76 ± 0.40	109.92 ± 2.04	138.41 ± 2.67
Sıvı kromatografisi-en küçük kareler metodu ± SD	11.67 ± 0.48	14.55 ± 0.88	107,77 ± 1.54	133.99 ± 1.98
T_d Değeri (T_d Kritik: 1.27; P: 0.05)	1.04	0.94	0.60	0.95

Çizelge 6.9'da OODD numunesinin hem GC'den hem de en küçük kareler metodu kullanılan sıvı kromatografisinden bulunan sterol değerleri karşılaştırılmıştır. Ayrıca her

iki metottan elde edilen sonuçlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olup olmadığının kontrolü için T testi uygulanmıştır. Tüm değerler için hesaplanan T_d değeri, kritik T_d değerinden küçük çıkmıştır ve sıfır hipotezi reddedilemez. Bu sebeple iki metottan elde edilen ortalama değerlerin, P: 0.05 ihtimaliyet seviyesinde birbirinden farklı olmadığı tespit edilmiştir.

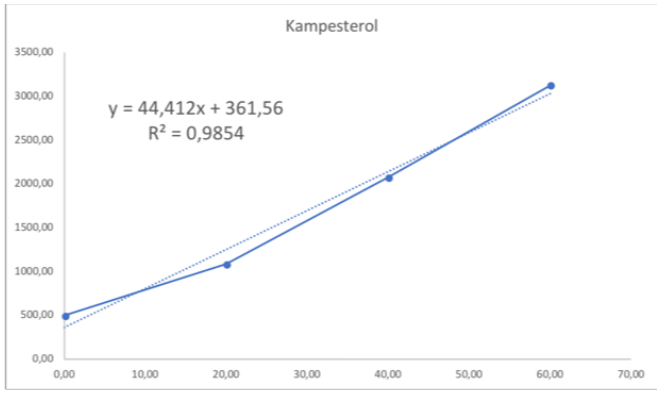
6.1.13.2 Standart ekleme metodu ile sterol miktarının tayini

OODD numunesinin sıvı kromatografisi ile sterol miktarının tayini kapsamında yapılmış olan diğer çalışmada standart ekleme metodu kullanılmıştır. Bu amaçla hazırlanmış olan sterol standartlarının kromatogramı Şekil 6.18'de verilmiştir.

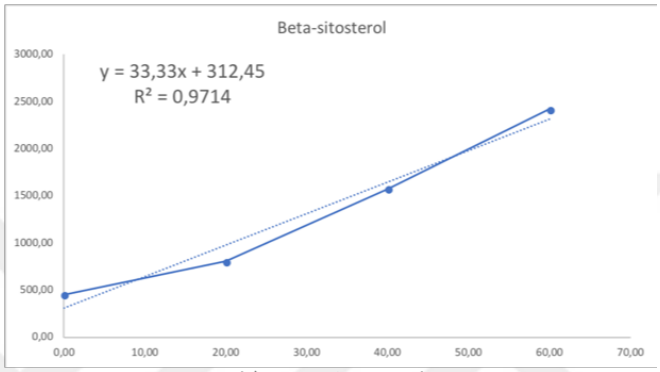


Şekil 6. 18. Numune, kampesterol, beta-sitosterol ve stigmasterol karışımlarından oluşan standart ekleme çözeltilerinin kromatogramı

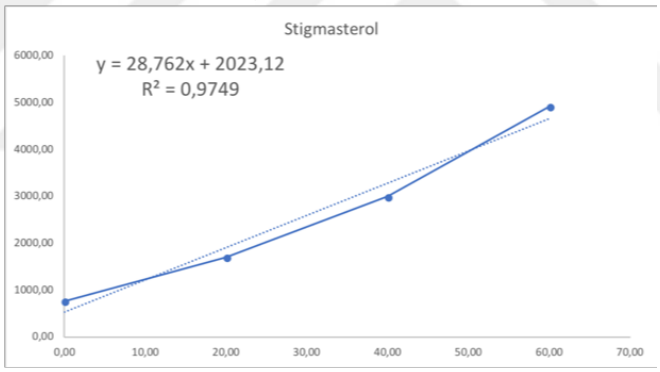
Standart ekleme metoduna göre hazırlanmış olan çözeltiler, HPLC sisteminde okutulmuş ve pik alanlarından elde edilen değerleri ile konsantrasyon değerleri kullanılarak her bir sterol türü için standart ekleme grafikleri oluşturulmuştur (Şekil 6.19). Ardından her bir grafikte ekstrapolasyon işlemi uygulanarak OODD numunesinin sterol miktarı tespit edilmiş ve Çizelge 6.10'da verilmiştir.



a) Kampesterol



b) Beta-sitosterol



c) Stigmasterol

Şekil 6. 19. OODD numunesinin sterol miktarının tespitinde kullanılan standart ekleme grafikleri

Çizelge 6. 10. OODD numunesinin sterol miktarları

	Kampesterol (mg/kg)	**β-sitosterol (mg/kg)**	**Stigmasterol (mg/kg)**	**Toplam sterol (mg/kg)**
OODD ± SD	12.32 ± 0.46	14.19 ± 0.45	106.45 ± 1.54	132.96 ± 1.98
Literatür	-	-	-	120-250 (Gutiérrez ve ark 2014)

Çizelge 6.11'de, OODD numunesinin GC'den ve standart ekleme metodu kullanılan sıvı kromatografisinden elde edilen sterol ve T testi sonuçları karşılaştırmalı olarak verilmiştir.

Çizelge 6. 11. OODD numunesinin GC'den ve standart ekleme metodu kullanılan sıvı kromatografisinden elde edilen sterol sonuçları

	Kampesterol (mg/kg)	**β-sitosterol (mg/kg)**	**Stigmasterol (mg/kg)**	**Toplam sterol (mg/kg)**
GC ± SD	12.73 ± 0.54	15.76 ± 0.40	109.92 ± 2.04	138.41 ± 2.67
Sıvı kromatografisi-standart ekleme metodu ± SD	12.32 ± 0.46	14.19 ± 0.45	106.45 ± 1.54	132.96 ± 1.98
T_d Değeri (T_d Kritik: 1.27; P: 0.05)	0.41	0.54	0.97	1.17

Çizelge 6.11'de OODD numunesinin hem GC'den hem de standart ekleme metodu kullanılan sıvı kromatografisinden bulunan sterol değerleri karşılaştırılmıştır. Ayrıca her iki metottan elde edilen sonuçlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olup olmadığının kontrolü için Denklem 6.1 kullanılarak T testi uygulanmıştır. Tüm değerler için hesaplanan T_d değeri, kritik T_d değerinden küçük çıkmıştır ve sıfır hipotezi reddedilemez. Bu sebeple iki metottan elde edilen ortalama değerlerin, P: 0.05 ihtimaliyet seviyesinde birbirinden farklı olmadığı tespit edilmiştir.

Çizelge 6.12'de, OODD numunesinin en küçük kareler ve standart ekleme metodu kullanılan sıvı kromatografisinden elde edilen sterol sonuçları ve Denklem 6.1 kullanılarak ede edilen T testi sonuçları karşılaştırmalı olarak verilmiştir.

Çizelge 6. 12. OODD numunesinin en küçük kareler ve standart ekleme metodu kullanılan sıvı kromatografisinden elde edilen sterol sonuçları

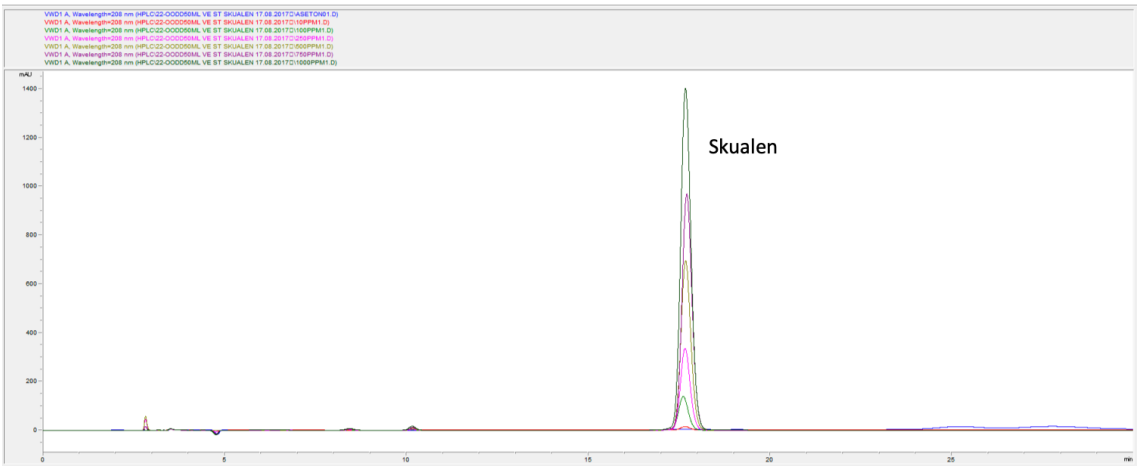
	Kampesterol (mg/kg)	**β-sitosterol (mg/kg)**	**Stigmasterol (mg/kg)**	**Toplam sterol (mg/kg)**
Sıvı kromatografisi-en küçük kareler metodu ± SD	11.67 ± 0.48	14.55 ± 0.88	107,77 ± 1.54	133.99 ± 1.98
Sıvı kromatografisi-standart ekleme metodu ± SD	12.32 ± 0.46	14.19 ± 0.45	106.45 ± 1.54	132.96 ± 1.98
T_d Değeri (T_d Kritik: 1.27; P: 0.05)	0.69	0.27	0.43	0.26

Çizelge 6.12'de OODD numunesinin hem en küçük kareler hem de standart ekleme metodu kullanılan sıvı kromatografisinden bulunan sterol değerleri karşılaştırılmıştır. Ayrıca her iki metottan elde edilen sonuçlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olup olmadığının kontrolü için T testi uygulanmıştır. Tüm değerler için hesaplanan T_d değeri, kritik T_d değerinden küçük çıkmıştır ve sıfır hipotezi reddedilemez. Bu sebeple iki metottan elde edilen ortalama değerlerin, P: 0.05 ihtimaliyet seviyesinde birbirinden farklı olmadığı tespit edilmiştir.

6.1.14. Skualen miktarının sıvı kromatografisi ile tayini

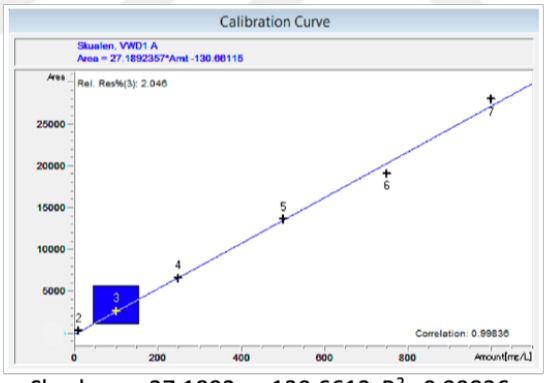
6.1.14.1. En küçük kareler metodu ile skualen miktarının tayini

OODD numunesinin sıvı kromatografisi ile skualen miktarının tayini kapsamında yapılmış olan çalışmalarda ilk önce en küçük kareler metodu kullanılmıştır. Bu amaçla hazırlanmış olan skualen kalibrasyon standartlarının kromatogramı Şekil 6.20'de verilmiştir.



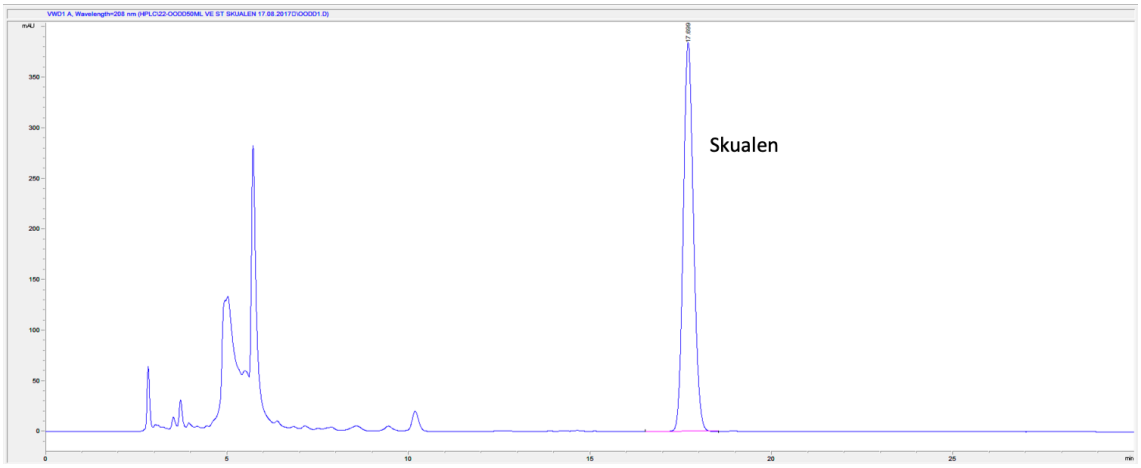
Şekil 6. 20. Skualen içeren 10, 100, 250, 500, 750 ve 1000 mg/L'lik kalibrasyon standartlarının kromatogramı

Hazırlanmış olan kalibrasyon standartları HPLC sisteminde okutulmuş ve pik alanlarından elde edilen değerleri ile konsantrasyon değerleri kullanılarak yazılım tarafından kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. Yüksek R^2 değerinin elde edildiği kalibrasyon grafiği Şekil 6.21'de verilmiştir.



Şekil 6. 21. OODD numunesinin skualen miktarının tespitinde kullanılan kalibrasyon grafiği, R^2: 0.99836

Skualen miktarının tayini için kullanılan standart metot kalibre edildikten sonra OODD numunesinin analizi yapılmış ve içerdiği skualen miktarı tespit edilmiştir. OODD numunesinin skualen türüne ait kromatogramı Şekil 6.22'de verilmiştir.



Şekil 6. 22. OODD numunesinin skualen türüne ait kromatogramı

OODD numunesinin skualen içeriğinin tespiti amacıyla yapılmış olan 3 tekrarlı analizler sonucunda skualen miktarı Çizelge 6.13'de verilmiştir.

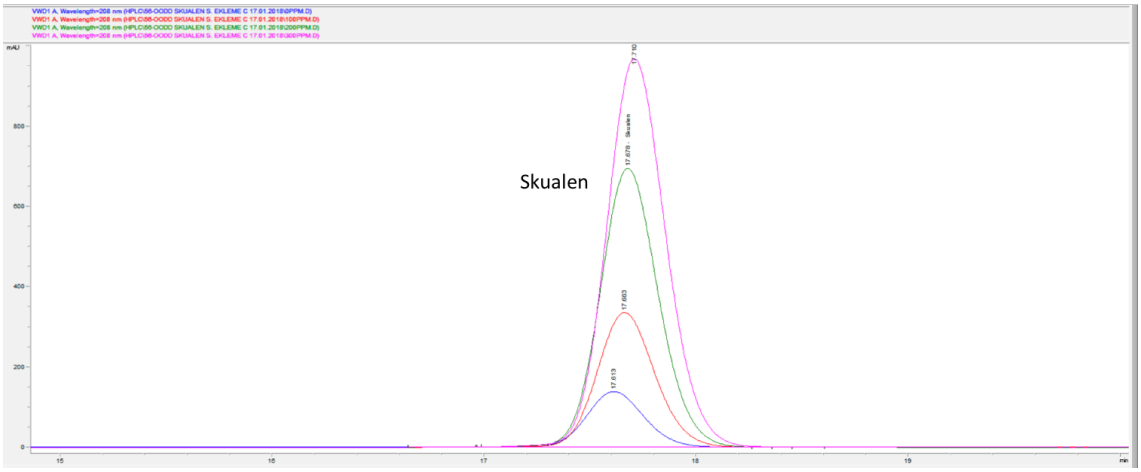
Çizelge 6. 13. OODD numunesinin skualen miktarı

	Skualen (mg/kg)
OODD ± SD	83454.84 ± 1.51
Literatür	70.000-200.000 (Cruz ve ark 2016)

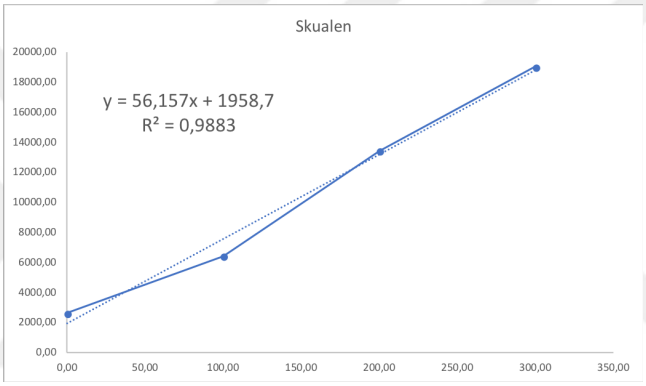
6.1.14.2. Standart ekleme metodu ile skualen miktarının tayini

OODD numunesinin sıvı kromatografisi ile skualen miktarının tayini kapsamında yapılmış olan diğer çalışmada standart ekleme metodu kullanılmıştır. Bu amaçla hazırlanmış olan sterol standartlarının kromatogramı Şekil 6.23'de verilmiştir.

Standart ekleme metoduna göre hazırlanmış olan çözeltiler, HPLC sisteminde okutulmuş ve pik alanlarından elde edilen değerleri ile konsantrasyon değerleri kullanılarak skualen türü için standart ekleme grafiği oluşturulmuştur (Şekil 6.24). Ardından elde edilen grafikte ekstrapolasyon işlemi uygulanarak OODD numunesinin skualen miktarı tespit edilmiş ve Çizelge 6.14'de verilmiştir.



Şekil 6. 23. Numune ve skualen karışımlarından oluşan standart ekleme çözeltilerinin kromatogramı



Şekil 6. 24. OODD numunesinin skualen miktarının tespitinde kullanılan standart ekleme grafiği

Çizelge 6. 14. OODD numunesinin skualen miktarı

	Skualen (mg/kg)
OODD ± SD	83455.72 ± 2.56
Literatür	70.000-200.000 (Cruz ve ark 2016)

Çizelge 6.15'de, OODD numunesinin en küçük kareler ve standart ekleme metodu kullanılan sıvı kromatografisinden elde edilen skualen ve T testi sonuçları karşılaştırmalı olarak verilmiştir.

Çizelge 6. 15. OODD numunesinin en küçük kareler ve standart ekleme metodu kullanılan sıvı kromatografisinden elde edilen skualen sonuçları

	Skualen (mg/kg)
Sıvı kromatografisi- en küçük kareler metodu ± SD	83454.84 ± 1.51
Sıvı kromatografisi-standart ekleme metodu ± SD	83455.72 ± 2.56
T_d Değeri (T_d Kritik: 1.27; P: 0.05)	0.22

Çizelge 6.15'de OODD numunesinin hem en küçük kareler hem de standart ekleme metodu kullanılan sıvı kromatografisinden bulunan skualen değerleri karşılaştırılmıştır. Ayrıca her iki metottan elde edilen sonuçlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olup olmadığının kontrolü için Denklem 6.1 kullanılarak T testi uygulanmıştır. Hesaplanan T_d değeri, kritik T_d değerinden küçük çıkmıştır ve sıfır hipotezi reddedilemez. Bu sebeple iki metottan elde edilen ortalama değerlerin, P: 0.05 ihtimaliyet seviyesinde birbirinden farklı olmadığı tespit edilmiştir.

Yenilebilir yağlarda yüksek miktarlarda bulunan ve insan sağlığı için son derece faydalı olan skualen türü, rafinasyon prosesinin deoderizasyon basamağının sahip olduğu yüksek sıcaklık ve basınç gibi zorlu şartlar sebebiyle yağdan uzaklaşmakta ve deoderize distilatta birikmektedir. Özellikle yüksek oranda skualen içeren zeytin yağlarının deoderize distilatları skualen miktarınca zengin olmaktadır. Yapılmış olan çalışmada kullanılan OODD numunesinin skualen miktarı da beklenildiği gibi literatüre uygun bir aralıkta çıkmıştır.

6.1.15. Zeytinyağı deoderize distilatının uluslararası standart metotlarla tayin edilen bileşimi

Yapılmış olan bu doktora tezinin birinci basamağında, uluslararası standart metotlar kullanılarak OODD numunesinin kimyasal bileşimi tayin edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, ulusal ve uluslararası kuruluşların standart değerleri ve literatür değerleri ile birlikte Çizelge 6.16'da verilmiştir. TSE, COI ve CAC değerleri EVOO için; literatür değerleri ise OODD için verilmiş değerlerdir.

Çizelge 6. 16. OODD numunesinin uluslararası standart metotlar kullanılarak tespit edilen kimyasal bileşimi ve karşılaştırılması

Kullanılan standart metot	**Bileşen**	**OODD ± SD** (Bu çalışmada)	**EVOO ± SD** (Bu çalışmada)	**TSE** (TSE 2004)	**COI** (COI 2015)	**CAC** (CAC 2015)	**OODD** (Literatürde)
AOAC1990	Nem miktarı	%0.87 ± 0.01	-	≤ %0.2	≤ %0.2	≤ %0.2	-
AOCS, Ca 5a-40	FFA	%88.57 ± 0.28	%0.76 ± 0.33	≤ %1.00	≤ %0.80	≤ %0.80	%50-90 (Naz ve ark 2012)
AOCS, Cd 1-25	IV	78.78 ± 0.82	-	78-88	-	75-94	-
Alfa Laval	Birincil ve ikincil oksidasyon ürünleri						
	As_{232}	6.52 ± 0.01	2.28 ± 0.01	-	≤ 2.50	≤ 2.50	-
	As_{270}	4.27 ± 0.00	0.20 ± 0.01	≤ 0.25	≤ 0.22	≤ 0.22	-
AOCS, Cd 8b-90	PV	15.74 ± 0.33	-	≤ 20.0	≤ 20.0	-	-
AOCS, Cd 18-90	AV	85.37 ± 0.01	3.41 ± 0.00	-	-	-	-
AOCS, Cd 8b-90, Cd 18-90	TV	116.85 ± 0.67	-	-	-	-	-
AOCS, Ce 5b-89	TG	te	-	-	-	-	-
EC, 14105	Yağ asit kompozisyonu						
	C14:0	-	-	≤ %0.05	≤ %0.03	%0.0-%0.05	Uygun (Gutiérrez ve ark 2014)
	C16:0	%10.42 ± 0.01	%11.41 ± 0.15	%7.5-%20.0	%7.5-%20.0	%7.5-%20.0	
	C16:1 cis9	%0.74 ± 0.01	%0.84 ± 0.11	%0.3-%3.5	%0.3-%3.5	%0.3-%3.5	
	C17:0	-	-	≤ %0.3	≤ %0.3	%0.0-%0.3	
	C17:1	-	-	≤ %0.3	≤ %0.3	%0.0-%0.3	
	C18:0	%2.81 ± 0.02	%3.07 ± 0.09	%0.5-%5.0	%0.5-%5.0	%0.5-%5.0	
	C18:1 cis9	%72.90 ± 0.00	%74.80 ± 0.13	%55.0-%83.0	%55.0-%83.0	%55.0-%83.0	
	C18:2 cis9,12	%9.71 ± 0.02	%8.19 ± 0.14	%3.5-%21.0	%2.5-%21.0	%3.5-%21.0	
	C20:0	%0.44 ± 0.04	%0.43 ± 0.10	≤ %0.6	≤ %0.6	%0.0-%0.6	
	C18:3 cis6,9,12	%0.59 ± 0.01	%0.54 ± 0.12	≤ %0.9	≤ %1.0	-	
	C22:0	%0.22 ± 0.02	%0.11 ± 0.13	≤ %0.2	≤ %0.2	%0.0-%0.2	

	C20:1	-	-	≤ %0.4	≤ %0.4	%0.0-%0.4	
	C20:3 cis11.14.17	%1.81 ± 0.00	%0.60 ± 0.08	-	-	-	
	C24:0	-	-	≤ %0.2	≤ %0.2	%0.0-%0.2	
	C24:1cis15	%0.36 ± 0.03	-	-	-	-	
	ΣSFA	%13.89	%15.02	-	-	-	
	ΣMUFA	%74.00	%75.64	-	-	-	
	ΣPUFA	%12.11	%9.33	-	-	-	
IUPAC	Apolar madde fraksiyonu						
	Fraksiyon Oranı	%94.40	%93.68	-	-	-	-
	PTGs	te	te	-	-	-	
	TGs	%0.54 ± 0.20	%91.74 ± 0.18	-	-	-	
	DGs	%0.54± 0.21	%3.91 ± 0.25	-	-	-	
	MGs	%0.74 ± 0.17	%2.51 ± 0.25	-	-	-	
	FFA	%98.18 ± 0.24	1.84 ± 0.24	-	-	-	
IUPAC	Polar madde fraksiyonu						
	Fraksiyon Oranı	%5.60	%6.32	-	-	-	-
	Oks. PTGs	te	te	-	-	-	
	Oks. TGs	%1.80 ± 0.20	%46.34 ± 0.12	-	-	-	
	Oks. DGs	%25.06 ± 0.21	%33.76 ± 0.11	-	-	-	
	Oks. MGs	%5.11 ± 0.17	%5.15 ± 0.09	-	-	-	
	Oks. FFA	%68.03 ± 0.24	%14.73 ± 0.21	-	-	-	
IUPAC	Polimerik madde türleri						
	PTGs	te	te	-	-	-	-
	TGs	%0.29 ± 0.26	%91.25 ± 0.31	-	-	-	
	DGs	%1.79 ± 0.22	%5.57 ± 0.21	-	-	-	
	MGs	%9.12 ± 0.23	%1.51 ± 0.23	-	-	-	

	FFA	%88.80 ± 0.20	%1.67 ± 0.18	-	-	-	
AOCS, Ce 8-89 / Agilent, 5991-2180EN	Tokoferol kompozisyonu						
	α-tokoferol	15413.14 ± 0.53 mg/kg	-	-	-	-	-
	β-tokoferol	3705.20 ± 1.33 mg/kg	-	-	-	-	-
	γ-tokoferol	12968.11 ± 1.44 mg/kg	-	-	-	-	-
	δ-tokoferol	361.92 ± 2.06 mg/kg	-	-	-	-	-
	Toplam tokoferol	32449.17 ± 0.83 mg/kg	219.57 ± 13.41	*	*	-	20000-150000 mg/kg (Verleyen ve ark 2001)
AOCS, Ce 8-89 / Agilent, 5991-2180EN	Tokotrienol kompozisyonu						
	α-tokotrienol	te	te	-	-	-	-
	β-tokotrienol	te	te	-	-	-	
	γ-tokotrienol	te	te	-	-	-	
	δ-tokotrienol	te	te	-	-	-	
	Toplam tokotrienol	te	te	-	-	-	
COI/T.20	Sterol kompozisyonu						
	Kampesterol	12.73 ± 0.54 mg/kg	3.53 ± 0.10	≤ %4.0 **	≤ %4.0 **	≤ %4.0 **	-
	Stigmasterol	109.92 ± 2.04 mg/kg	0.62 ± 0.10	***	***	****	-
	β-sitosterol	15.76 ± 0.40 mg/kg	66.91 ± 0.51	-	-	-	-
	Toplam sterol	138.41 ± 2.67 mg/kg	70.82 ± 0.68	≥ 1000.0 mg/kg	≥ 1000.0 mg/kg	≥ 1000.0 mg/kg	120-250 mg/kg (Gutiérrez ve ark 2014)
Agilent, 5991-2774EN	Skualen miktarı	83454.84 ± 1.51 mg/kg	2.090.51 ± 2.44	-	-	-	70.000-200.000 mg/kg

							(Cruz ve ark 2016)

te: Tespit edilemedi
*: Katılmasına izin verilmez
**: Toplam sterolün kütlece yüzdesi
***: Kampesterol için bulunan değer
****: Kampesterol kadar

6.2. Zeytinyağı Deoderize Distilatı ve Natürel Sızma Zeytinyağları İçin Geliştirilen FT-IR Temelli Spektroskopik Metotlar

Başlık 6.2'de gerçekleştirilen FT-IR temelli spektroskopik çalışmaların tamamı, Tübitak 2214/A yurtdışı doktora sırası araştırma burs programı desteğiyle, 2015-2016 yılları arasında 12 ay süreyle Kanada McGill Üniversitesi, Tarım ve Çevre Bilimleri Fakültesi, Gıda Bilimi ve Tarım Kimyası Bölümünde, McGill IR Araştırma Grubu laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

6.2.1. Zeytinyağı deoderize distilatındaki serbest yağ asidi miktarının tayini için SB-ATR-FT-IR temelli metot geliştirilmesi

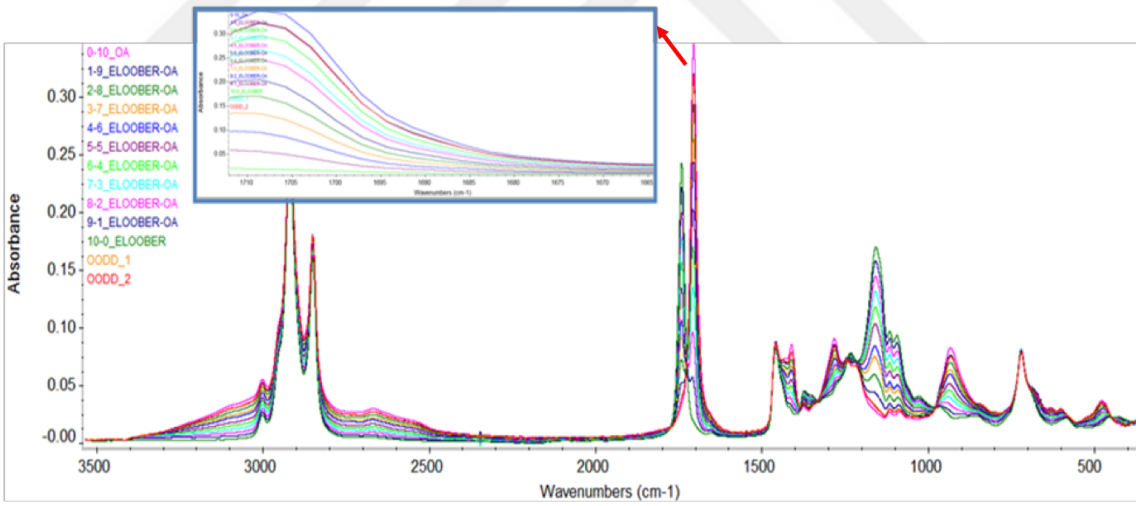
FFA'ların standart titrimetrik metotla tayini, standartların hazırlanması, sonuçların analizi, uzun analiz süreleri ve ihtiyaç duyulan çokça cam malzeme sebebiyle kolay olmayan bir analiz yöntemidir ve alternatif bir metoda ihtiyaç duyulmaktadır (Man ve Moh 1998). Yapılmış olan bu çalışmada, FT-IR tekniği kullanılarak FFA'ların tayini için hızlı, aşırı kimyasala ihtiyaç duymayan ve basit bir metot geliştirilmeye çalışılmıştır.

Hazırlanmış olan kalibrasyon standartlarının ve OODD numunesinin FFA miktarları ilk önce AOCS'nin standart titrasyon metoduna göre (AOCS 2017) tespit edilmiştir (Çizelge 6.17).

Kalibrasyon standartları ve OODD numunesinin standart titrimetrik metoda göre FFA miktarları bulunduktan sonra, çalışma kapsamında kullanılan SB-ATR-FT-IR sisteminde analiz edilmişlerdir. Şekil 6.25'de kalibrasyon standartlarının ve OODD numunesinin spektrumları verilmiştir.

Çizelge 6. 17. ELOO (%0.30 FFA) ve saf oleik asit (%100 FFA) kullanılarak hazırlanan kalibrasyon standartları

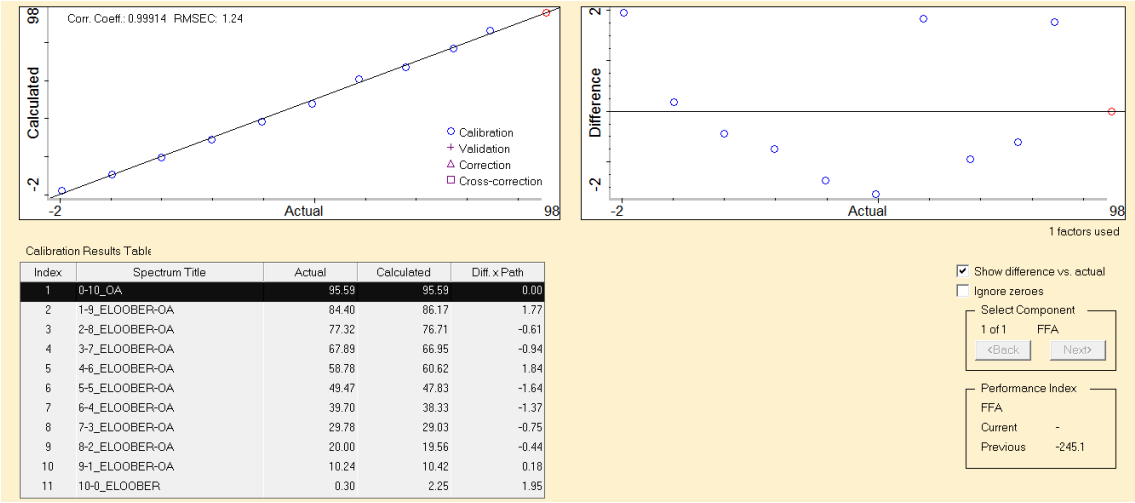
Kalibrasyon standardı	**%FFA ± SD**
1	0.30 ± 0.01
2	10.24 ± 0.18
3	20.00 ± 0.24
4	29.78 ± 0.15
5	39.70 ± 0.29
6	49.47 ± 0.24
7	58.78 ± 0.75
8	67.89 ± 0.28
9	77.32 ± 0.54
10	84.40 ± 0.44
11	95.59 ± 0.07
OODD	88.57 ± 0.28



Şekil 6. 25. Kalibrasyon standartlarının ve OODD numunesinin SB-ATR-FT-IR spektrumları

PLS, kantitatif IR spektroskopisinde geniş bir uygulama alanı bulan çok değişkenli analiz tekniğidir (Fuller ve ark 1988, Haaland ve Thomas 1988). Ayrıca PLS, klasik en küçük kareler metodu ve ters en küçük kareler metotlarının bir birleşimidir ve spektral analizler için bu iki metodun avantajlarına sahipken dezavantajlarına sahip değildir (Haaland ve Thomas 1988).

Çalışma kapsamında geliştirilen SB-ATR-FT-IR metodu ile FFA miktarının tayini için, 1708-1670 cm^{-1} aralığı kullanılarak PLS kalibrasyon modeli geliştirmiştir. Geniş bir konsantrasyon aralığına sahip standartlar ile hazırlanan kalibrasyon grafiğinin korelasyon katsayısı (R^2) 0.99914 olarak bulunmuştur (Şekil 6.26). Standart titrimetrik metottan elde edilen FFA değerleri ile SB-ATR-FT-IR metodundan elde edilen FFA değerleri karşılaştırılarak çalışma kapsamında geliştirilen kalibrasyon modelinin RMSEC değeri hesaplanmış ve düşük bir değer olan 1.24 bulunmuştur. RMSEC değeri ile kalibrasyon modelinin doğru sonuç verme başarısı ters orantılı olarak değerlendirilmektedir.



Şekil 6. 26. Standart titrimetrik metottan elde edilen FFA değerleri ve SB-ATR-FT-IR metodundan elde edilen FFA değerlerinin karşılaştırılmasıyla oluşturulan kalibrasyon grafiği

Ardından OODD numunesinin FFA miktarı, FT-IR spektrumu ve çalışma kapsamında geliştirilen kalibrasyon modeli kullanılarak tespit edilmiş ve oleik asit cinsinden ağırlıkça 86.27 ± 0.14 bulunmuştur. Çizelge 6.18'de OODD numunesinin hem standart titrimetrik metotla hem de SB-ATR-FT-IR metoduyla bulunan FFA değerleri karşılaştırılmıştır. Ayrıca her iki metottan elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark olup olmadığının kontrolü için T testi uygulanmıştır. Bu test için her iki veri grubunun ortalama değeri (y) ve dağılımı (w) hesaplanmış ve Denklem 6.1'e göre T_d değeri bulunmuştur.

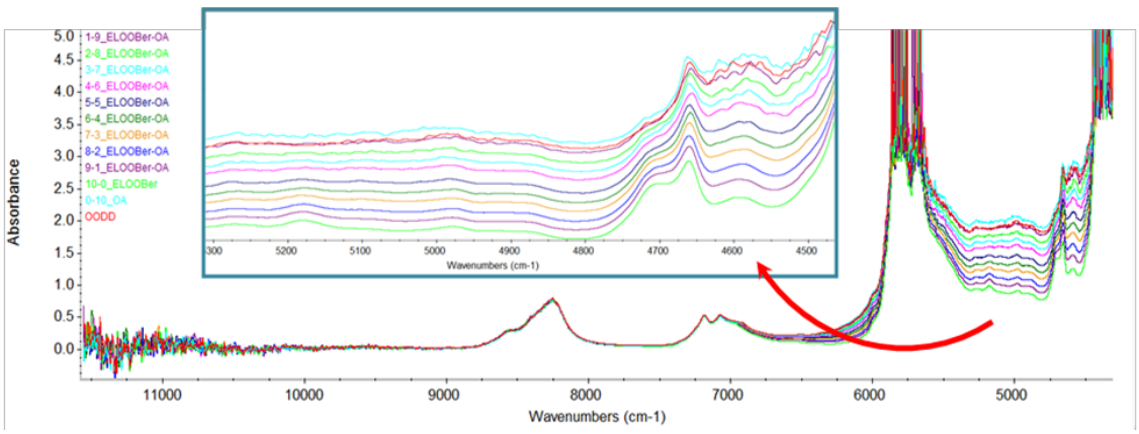
Çizelge 6. 18. OODD numunesinin standart titrimetrik metot ve SB-ATR-FT-IR metoduyla bulunan FFA değerleri

Metot	**%FFA ± SD**	**T_d**	**T_d kritik (P:0.05)**
Standart titrimetrik metot (AOCS 2017)	88.57 ± 0.28	5.48	1.27
SB-ATR-FT-IR metot	86.27 ± 0.14		

3 tekrarlı yapılan analizler için kritik T_d değeri 1.27'dir (Morgan 1991). Hesaplanan T_d değeri ise, kritik T_d değerinden büyük çıkmıştır. Bu sebeple iki metottan elde edilen ortalama değerlerin, P: 0.05 ihtimaliyet seviyesinde birbirinden farklı olduğu görülmektedir.

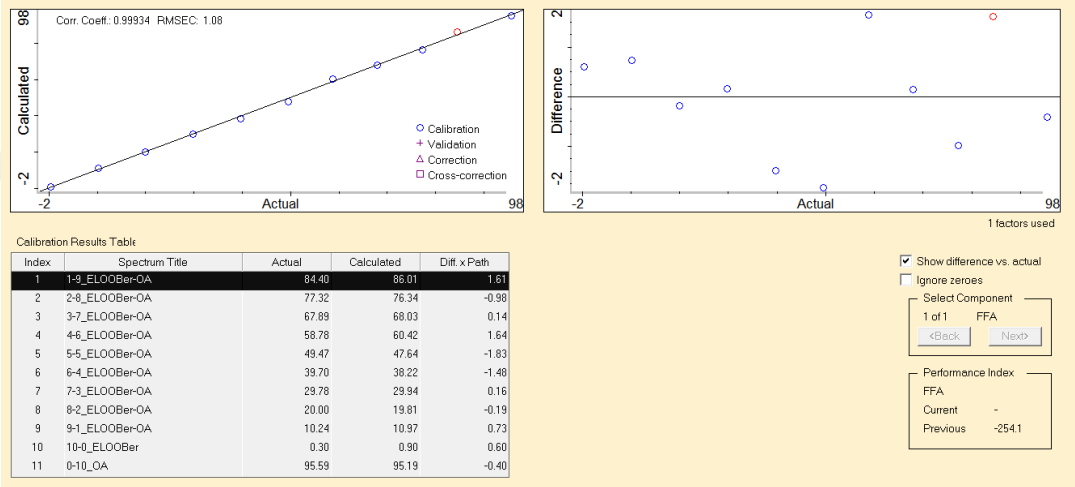
6.2.2. Zeytinyağı deoderize distilatındaki serbest yağ asidi miktarının tayini için FT-NIR temelli metot geliştirilmesi

Bir önceki çalışmada OODD numunesinin FFA miktarı, orta IR bölgesinin 1708-1670 cm^{-1} dalga sayısı aralığına tekabül eden karboksilik asit (C=OH) bandı kullanılarak tespit edilmişti. Yapılan bu çalışmada ise FFA miktarının tayini için yakın IR bölgesindeki karboksilik asit (C=OH) grubuna ait kombinasyon ve ilk overtone titreşim bantlarına tekabül eden 5320-4540 cm^{-1} dalga sayısı aralığındaki spektral bölge kullanılmıştır. Hazırlanmış olan kalibrasyon standartları ve OODD numunesi, çalışma kapsamında kullanılan FT-NIR sisteminde analiz edilmişlerdir. Şekil 6.27'de kalibrasyon standartlarının ve OODD numunesinin spektrumları verilmiştir.



Şekil 6. 27. Kalibrasyon standartlarının ve OODD numunesinin FT-NIR spektrumları

Çalışma kapsamında geliştirilen FT-NIR metodu ile FFA miktarının tayini için, 5320-4540 cm^{-1} aralığı kullanılarak PLS kalibrasyon modeli geliştirmiştir. Geniş bir konsantrasyon aralığına sahip standartlar ile hazırlanan kalibrasyon grafiğinin R^2 değeri 0.99934 olarak bulunmuştur (Şekil 6.28). Standart titrimetrik metottan elde edilen FFA değerleri ile FT-NIR metodundan elde edilen FFA değerleri karşılaştırılarak çalışma kapsamında geliştirilen kalibrasyon modelinin RMSEC değeri hesaplanmış ve SB-ATR-FT-IR metodundan daha düşük bir değer olan 1.08 bulunmuştur.



Şekil 6. 28. Standart titrimetrik metottan elde edilen FFA değerleri ve FT-NIR metodundan elde edilen FFA değerlerinin karşılaştırılmasıyla oluşturulan kalibrasyon grafiği

Ardından OODD numunesinin FFA miktarı, FT-NIR spektrumu ve çalışma kapsamında geliştirilen kalibrasyon modeli kullanılarak tespit edilmiş ve oleik asit cinsinden ağırlıkça 88.52 ± 0.18 bulunmuştur. Çizelge 6.19'da OODD numunesinin hem standart titrimetrik metotla hem de FT-NIR metoduyla bulunan FFA değerleri karşılaştırılmıştır. Ayrıca her iki metottan elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark olup olmadığının kontrolü için Denklem 6.1 kullanılarak T testi uygulanmıştır.

Çizelge 6. 19. OODD numunesinin standart titrimetrik metot ve FT-NIR metoduyla bulunan FFA değerleri

Metot	**%FFA ± SD**	**T_d**	**T_d kritik (P:0.05)**
Standart titrimetrik metot (AOCS 2017)	88.57 ± 0.28	0.11	1.27
FT-NIR metot	88.52 ± 0.18		

Hesaplanan T_d değeri, kritik T_d değerinden küçük çıkmıştır ve sıfır hipotezi reddedilemez. Bu sebeple iki metottan elde edilen ortalama değerlerin, P:0.05 ihtimaliyet seviyesinde birbirinden farklı olmadığı görülmektedir. Tez çalışması kapsamında geliştirilen iki farklı IR tekniğinden FT-NIR tekniğinin, SB-ATR-FT-IR tekniğine göre OODD numunesinin FFA miktarının tespitinde daha doğru değerler verdiği tespit edilmiştir.

6.2.3. Zeytinyağı deoderize distilatının iyot sayısının tayini için SB-ATR-FT-IR temelli metot geliştirilmesi

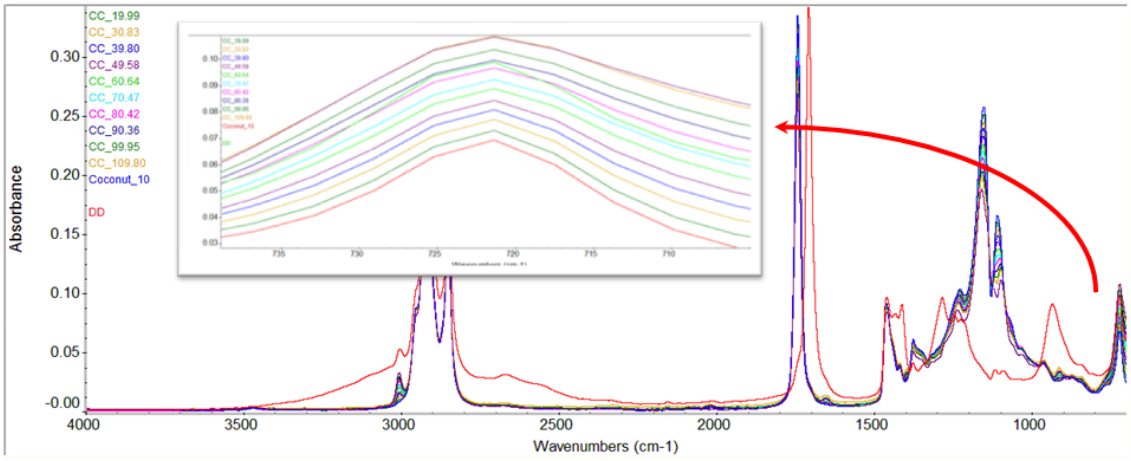
IV değerinin standart titrimetrik metotla tayini de FFA miktarının tayinin de olduğu gibi titrimetrik bir metottur ve kolay olmayan bir analiz yöntemidir. Yapılmış olan bu çalışmada da FT-IR tekniği kullanılarak IV değerinin tayini için hızlı, aşırı kimyasala ihtiyaç duymayan ve basit bir metot geliştirilmeye çalışılmıştır.

Hazırlanmış olan kalibrasyon standartlarının ve OODD numunesinin IV değerleri ilk önce AOCS'nin standart titrasyon metoduna göre (AOCS 2017) tespit edilmiştir (Çizelge 6.20). Ardından mısır yağı (120.00 IV) ve hindistan cevizi yağı (10.00 IV) kullanılarak farklı IV değerlerine sahip kalibrasyon standartları hazırlanmıştır.

Çizelge 6. 20. Hindistan cevizi yağı (10.00 IV) ve mısır yağı (120.00 IV) kullanılarak hazırlanan kalibrasyon standartları

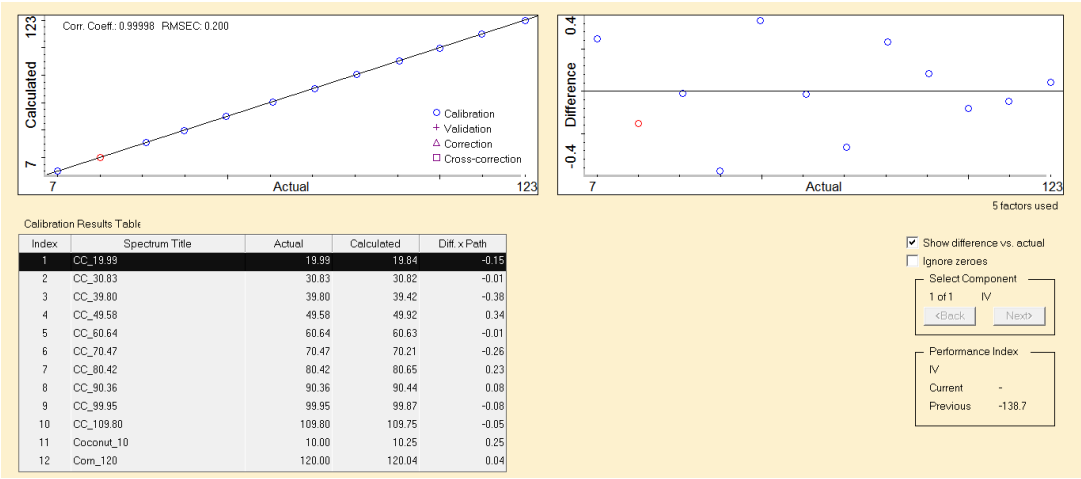
Kalibrasyon standardı	**IV ± SD**
1	10.21 ± 0.11
2	19.99 ± 0.43
3	30.83 ± 0.71
4	39.80 ± 0.60
5	49.58 ± 0.21
6	60.64 ± 0.22
7	70.47 ± 0.43
8	80.42 ± 0.23
9	90.36 ± 0.40
10	99.95 ± 0.34
11	109.80 ± 0.15
OODD	79.78 ± 0.25

Kalibrasyon standartları ve OODD numunesinin standart titrimetrik metoda göre IV değerleri bulunduktan sonra, çalışma kapsamında kullanılan SB-ATR-FT-IR sisteminde analiz edilmişlerdir. Şekil 6.29'da kalibrasyon standartlarının ve OODD numunesinin spektrumları verilmiştir.



Şekil 6. 29. Kalibrasyon standartlarının ve OODD numunesinin SB-ATR-FT-IR spektrumları

Çalışma kapsamında geliştirilen SB-ATR-FT-IR metodu ile IV değerlerinin tayini için, 745-698 cm^{-1} aralığı kullanılarak PLS kalibrasyon modeli geliştirmiştir. Geniş bir konsantrasyon aralığına sahip standartlar ile hazırlanan kalibrasyon grafiğinin korelasyon katsayısı (R^2) 0.99998 olarak bulunmuştur (Şekil 6.30). Standart titrimetrik metottan elde edilen IV değerleri ile SB-ATR-FT-IR metodundan elde edilen IV değerleri karşılaştırılarak çalışma kapsamında geliştirilen kalibrasyon modelinin RMSEC değeri hesaplanmış ve düşük bir değer olan 0.20 bulunmuştur.



Şekil 6. 30. Standart titrimetrik metottan elde edilen IV değerleri ve SB-ATR-FT-IR metodundan elde edilen IV değerlerinin karşılaştırılmasıyla oluşturulan kalibrasyon grafiği

Ardından OODD numunesinin IV değeri, FT-IR spektrumu ve çalışma kapsamında geliştirilen kalibrasyon modeli kullanılarak tespit edilmiş ve 77,60 ± 0.12 bulunmuştur. Çizelge 6.21'de OODD numunesinin hem standart titrimetrik metotla hem de SB-ATR-FT-IR metoduyla bulunan IV değerleri karşılaştırılmıştır. Ayrıca her iki metottan elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark olup olmadığının kontrolü için Denklem 6.1 kullanılarak T testi uygulanmıştır.

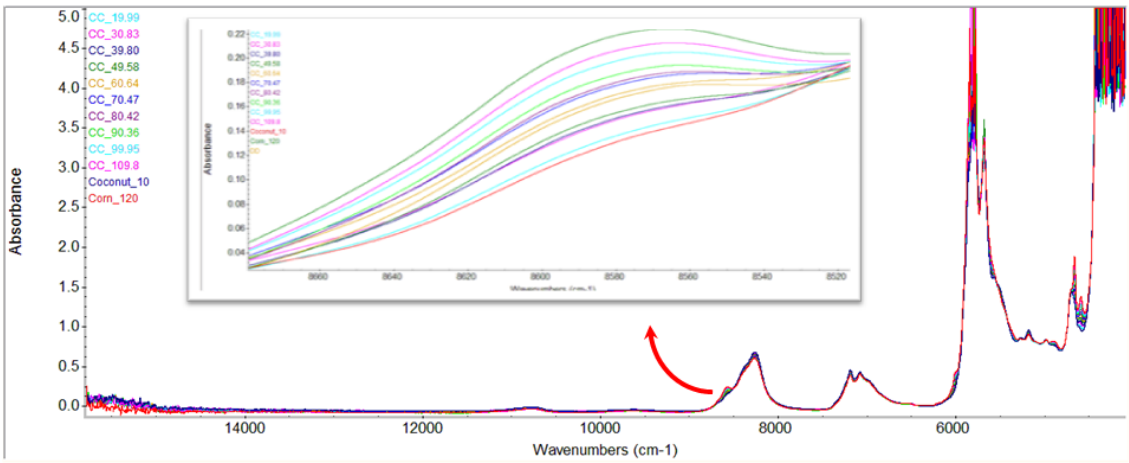
Çizelge 6. 21. OODD numunesinin standart titrimetrik metot ve SB-ATR-FT-IR metoduyla bulunan IV değerleri

Metot	**IV ± SD**	**T_d**	**T_d kritik (P:0.05)**
Standart titrimetrik metot (AOCS 2017)	78.78 ± 0.82	1.25	1.27
SB-ATR-FT-IR metot	77,60 ± 0.12		

Hesaplanan T_d değeri, kritik T_d değerinden küçük çıkmıştır ve sıfır hipotezi reddedilemez. Bu sebeple iki metottan elde edilen ortalama değerlerin, P:0.05 ihtimaliyet seviyesinde birbirinden farklı olmadığı görülmektedir.

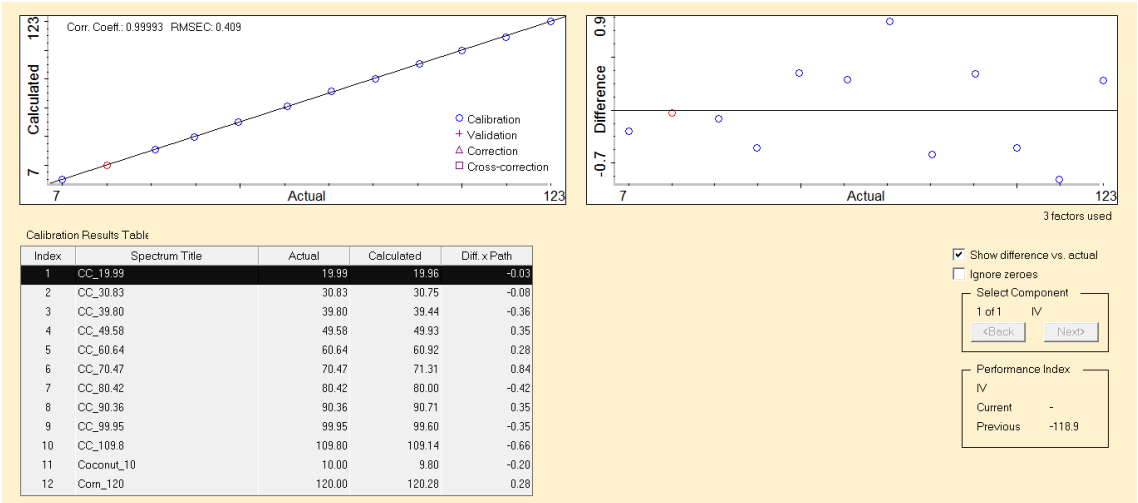
6.2.4. Zeytinyağı deoderize distilatının iyot sayısının tayini için FT-NIR temelli metot geliştirilmesi

Bir önceki çalışmada OODD numunesinin IV değeri, orta IR bölgesinin 745-698 cm^{-1} dalga sayısı aralığına tekabül eden karbon çift bağ (=CH, C=C) bandı kullanılarak tespit edilmişti. Yapılan bu çalışmada ise IV değerinin tayini için yakın IR bölgesindeki karbon çift bağ (=CH) grubuna ait ikinci overtone titreşim bantlarına tekabül eden 8645-8545 cm^{-1} dalga sayısı aralığındaki spektral bölge kullanılmıştır. Hazırlanmış olan kalibrasyon standartları ve OODD numunesi, çalışma kapsamında kullanılan FT-NIR sisteminde analiz edilmişlerdir. Şekil 6.31'de kalibrasyon standartlarının ve OODD numunesinin spektrumları verilmiştir.



Şekil 6. 31. Kalibrasyon standartlarının ve OODD numunesinin FT-NIR spektrumları

Çalışma kapsamında geliştirilen FT-NIR metodu ile IV değerinin tayini için, 8645-8545 cm^{-1} aralığı kullanılarak PLS kalibrasyon modeli geliştirmiştir. Geniş bir konsantrasyon aralığına sahip standartlar ile hazırlanan kalibrasyon grafiğinin R^2 değeri 0.99993 olarak bulunmuştur (Şekil 6.32). Standart titrimetrik metottan elde edilen IV değerleri ile FT-NIR metodundan elde edilen IV değerleri karşılaştırılarak çalışma kapsamında geliştirilen kalibrasyon modelinin RMSEC değeri hesaplanmış ve SB-ATR-FT-IR metodundan daha büyük bir değer olan 0.409 bulunmuştur.



Index	Spectrum Title	Actual	Calculated	Diff. x Path
1	CC_19.99	19.99	19.96	-0.03
2	CC_30.83	30.83	30.75	-0.08
3	CC_39.80	39.80	39.44	-0.36
4	CC_49.58	49.58	49.93	0.35
5	CC_60.64	60.64	60.92	0.28
6	CC_70.47	70.47	71.31	0.84
7	CC_80.42	80.42	80.00	-0.42
8	CC_90.36	90.36	90.71	0.35
9	CC_99.95	99.95	99.60	-0.35
10	CC_109.8	109.80	109.14	-0.66
11	Coconut_10	10.00	9.80	-0.20
12	Corn_120	120.00	120.28	0.28

Şekil 6. 32. Standart titrimetrik metottan elde edilen IV değerleri ve FT-NIR metodundan elde edilen IV değerlerinin karşılaştırılmasıyla oluşturulan kalibrasyon grafiği

Ardından OODD numunesinin IV değeri, FT-NIR spektrumu ve çalışma kapsamında geliştirilen kalibrasyon modeli kullanılarak tespit edilmiş ve 65.68 ± 0.10 bulunmuştur. Çizelge 6.22'de OODD numunesinin hem standart titrimetrik metotla hem

de FT-NIR metoduyla bulunan IV değerleri karşılaştırılmıştır. Ayrıca her iki metottan elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark olup olmadığının kontrolü için Denklem 6.1 kullanılarak T testi uygulanmıştır.

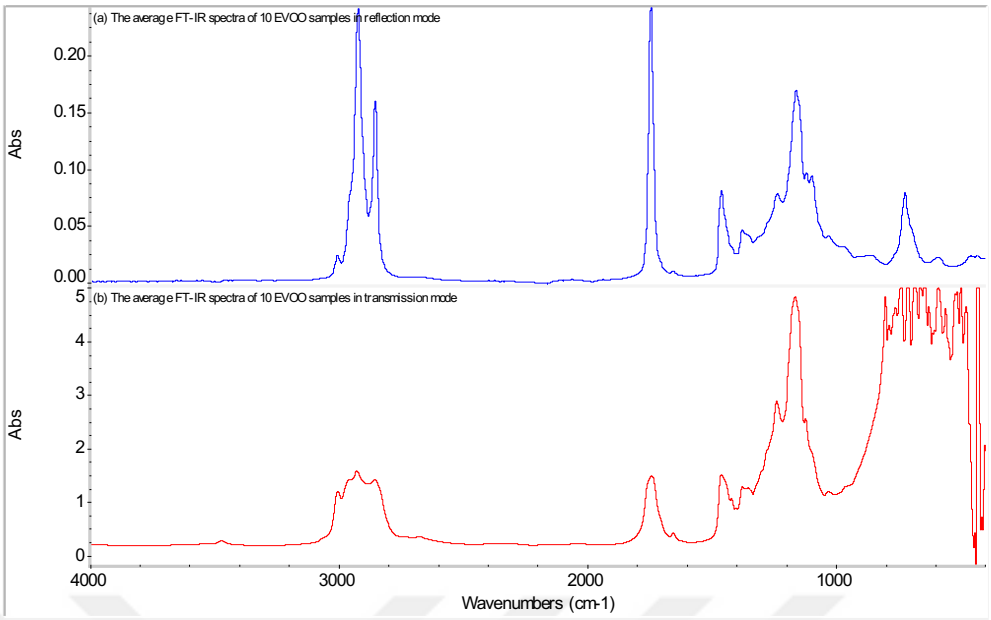
Çizelge 6. 22. OODD numunesinin standart titrimetrik metot ve FT-NIR metoduyla bulunan IV değerleri

Metot	**IV ± SD**	**T_d**	**T_d kritik (P:0.05)**
Standart titrimetrik metot (AOCS 2017)	78.78 ± 0.82	14.27	1.27
FT-NIR metot	65.68 ± 0.10		

Hesaplanan T_d değeri, kritik T_d değerinden çok büyük çıkmıştır. Bu sebeple FT-NIR metodundan elde edilen ortalama değerin, P:0.05 ihtimaliyet seviyesinde birbirinden farklı olduğu görülmektedir. Tez çalışması kapsamında geliştirilen iki farklı IR tekniğinden SB-ATR-FT-IR tekniğinin, FT-NIR tekniğine göre OODD numunesinin IV miktarının tespitinde daha doğru değerler verdiği tespit edilmiştir.

6.2.5. Kemometrik metotlar ve farklı absorpsiyon modlarına sahip FT-IR spektroskopisi kullanarak natürel sızma zeytinyağlarının serbest yağ asidi miktarının kantitatif olarak tayini

10 farklı EVOO numunesinin yansıma (a) ve transmisyon (b) modlarındaki FT-IR spektrumlarından elde edilen ortalama spektrumlar, Şekil 6.33'de verilmiştir.



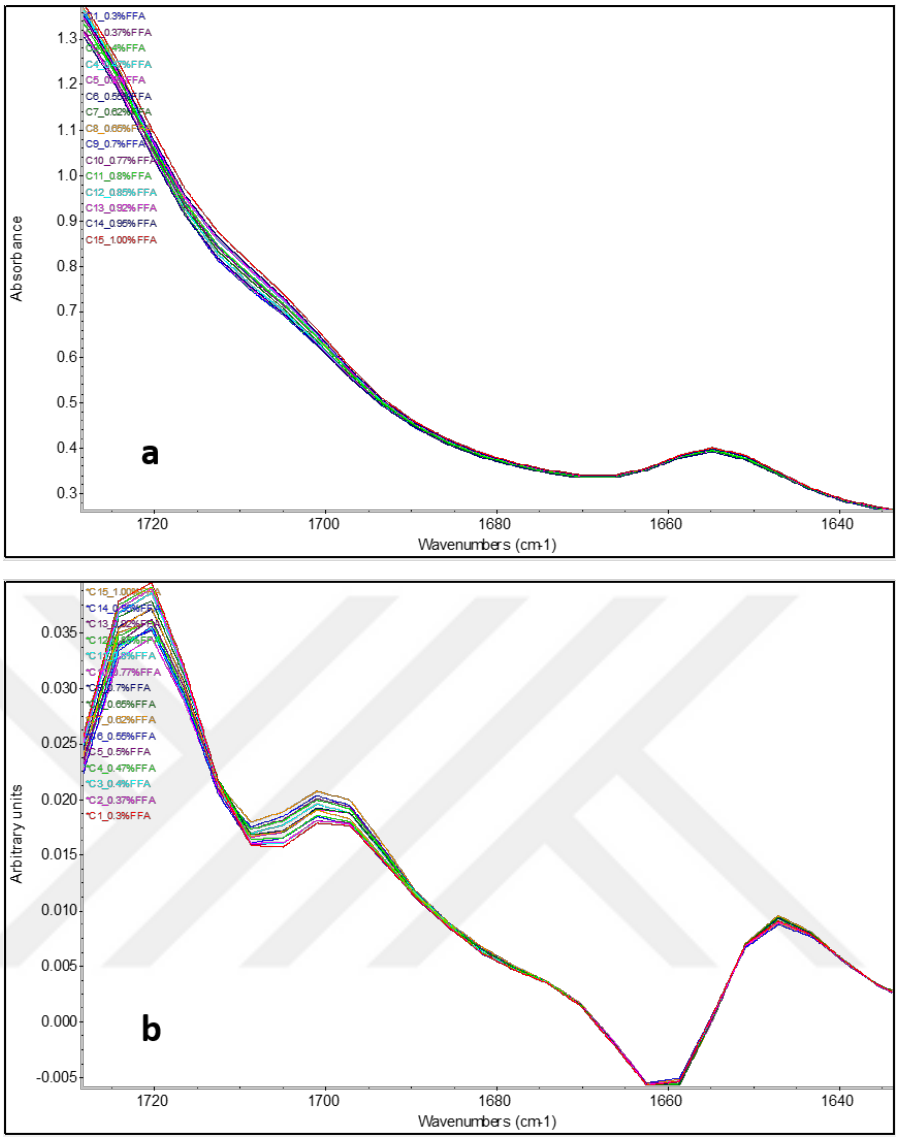
Şekil 6. 33. 10 farklı EVOO numunesinin yansıma (a) ve transmisyon (b) modlarındaki FT-IR spektrumlarından elde edilen ortalama spektrumlar

Her iki modda elde edilen spektrumlardaki ortak bantlar ve tekabül ettikleri titreşim tipleri Çizelge 6.23'de verilmiştir.

Çizelge 6. 23. 10 farklı EVOO numunesinden elde edilen ortalama spektrumların ortak bantları

Titreşim türü	**Titreşim bandı (cm^{-1})**	**Referans**
cis-C=C grubundaki C–H	3007	(Li-Chan ve ark 2006)
Asimetrik ve simetrik CH_2	2921 ve 2855	(Ismail ve ark 1997)
TG ester bağlarındaki C=O	1744	(Li-Chan ve ark 2006)
FFA'lardaki C-OH	1710	Li-Chan, Ismail et al., 2006]
cis-C=C	1654	[Silverstein et al., 1991
CH_2 ve CH_3 gruplarındaki C–H	1460	[Silverstein et al., 1991
Eğilen CH_2	1376 ve 1236	[Silverstein, Bassler et al., 1991
Ester gruplarındaki C–O	1158, 1118 ve 1097	[Silverstein, Bassler et al., 1991

Şekil 6.34.a ve 6.34.b, 19 kalibrasyon standartlarının seçilen bir bölgesinin transmisyon modunda alınan normal ve birinci dereceden türevini göstermektedir. FFA'ların artan karbonil titreşim bantları 1724-1646 cm^{-1} dalga sayısı aralığında açıkça görülmektedir.



Şekil 6. 34. 19 kalibrasyon standardının seçilen bir bölgesinin transmisyon modunda alınan normal (a) ve birinci dereceden türevi (b)

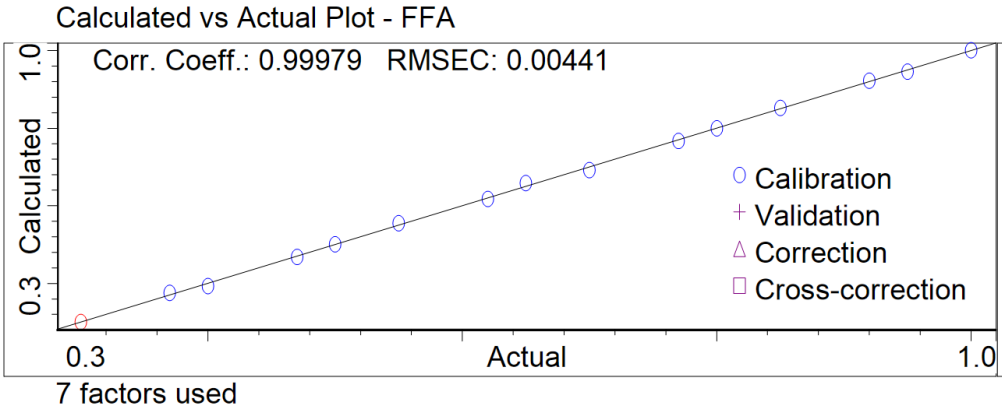
Kalibrasyon standartlarının FFA miktarlarını FT-IR spektrumları ile ilişkilendirmek için her iki absorpsiyon modunda seçilmiş spektral bölgelerin normal ve birinci dereceden türevleri kullanılarak 12 tane çok değişkenli kalibrasyon modeli PLS algoritması ile oluşturulmuştur (Çizelge 6.24). PLS parametrelerini tespit etmek için kalibrasyon setinde "leave one out" prosedürünü içeren çapraz validasyon metodu kullanılmıştır (Picard ve Cook 1984). PLS faktör sayısı, tahmini kareler toplamı (PRESS)'ın minimum değerde kalacağı şekilde yazılım tarafından otomatik olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 6. 24. Her iki absorpsiyon modunda seçilmiş spektral bölgelerin normal ve birinci dereceden türevleri kullanılarak elde edilmiş 12 tane çok değişkenli kalibrasyon modeli

Absorpsiyon modu	Spektrum	Spektrum aralığı, cm^{-1}	R^2	RMSEC	RMSECV	Faktör sayısı
Yansıma	Normal	1724-1646	0.99034	0.0298	0.0450	3
		3324-3023	0.94075	0.0729	0.1830	2
		1724-1646+ 3324-3023	0.98211	0.0405	0.0677	3
	Birinci derece türev	1724-1646	0.97565	0.0472	0.0674	2
		3324-3023	0.74103	0.1440	0.1910	1
		1724-1646+ 3324-3023	0.98789	0.0334	0.0817	3
Transmisyon	Normal	1724-1646	0.99862	0.0113	0.0156	3
		3324-3023	0.99957	0.00632	0.0134	5
		1724-1646+ 3324-3023	**0.99979**	**0.00441**	**0.0107**	**7**
	Birinci derece türev	1724-1646	0.99896	0.00980	0.0147	4
		3324-3023	0.99649	0.0180	0.0207	1
		1724-1646+ 3324-3023	0.99867	0.0111	0.0145	2

R^2, korelasyon katsayısı; RMSEC, kalibrasyonun ortalama karekök hatası; RMSECV, çapraz validasyonun ortalama karekök hatası

Kalibrasyon standartlarının FFA konsantrasyonları ile seçilen spektral bölgede ölçülen FFA değerleri grafiğe geçirilmiştir. (Şekil 6.35). İlgili şekilde "Actual" değerleri standart titrimetrik metottan elde edilen FFA değerlerini; "calculated" değerleri ise çalışma kapsamında geliştirilmiş 12 kalibrasyon metodundan (Çizelge 6.24) en iyi tahmini veren kalibrasyon modelinin FFA değerlerini göstermektedir.



Şekil 6. 35. Kalibrasyon standartlarının FFA konsantrasyonları ile seçilen spektral bölgede ölçülen FFA değerlerinin grafiği

1724-1646 ve 3324-3023 cm^{-1} dalga sayısı aralığındaki normal ve birinci derece türevi alınmış spektrumlar kullanılarak elde edilen 12 farklı PLS kalibrasyon modeli Çizelge 6.24'de verilmiştir. PLS kalibrasyon modelleri, yüksek R^2 değeri ve faktör sayısı; düşük RMSEC ve RMSECV değerleri dikkate alınarak değerlendirilmiştir. Absorpsiyon modları dikkate alındığında, transmisyon modunda elde edilen PLS kalibrasyon modellerinin yansıma modunda elde edilen PLS kalibrasyon modellerine göre daha iyi sonuçlar verdiği görülmektedir. Spektrum türü dikkate alındığında ise çalışılmış olan dalga sayısı aralıklarında, hem normal hem de birinci derece türev spektrumlarından elde edilen PLS kalibrasyon modellerinin hemen hemen aynı değerlere sahip oldukları görülmüştür.

Çizelge 6.24. incelendiğinde hemen hemen tüm kalibrasyon modellerinin iyi sonuçlar verdiği görülmektedir. Fakat en iyi sonuçlar, en yüksek R^2 değerine (0.99979), en yüksek faktör sayısına (7), en düşük RMSEC değerine (0.0041) ve en düşük RMSECV değerine (0.0107) sahip olan normal spektrumun kullanıldığı transmisyon modundan edilmiştir. Ayrıca bu kalibrasyon modeli için tahmin kapasitesinin ortalama karekök hata değeri (RMSEP) de hesaplanmış ve 0.0572 olarak tespit edilmiştir. Hesaplanan değer, çalışma kapsamında geliştirilen PLS kalibrasyon modelinin, EVOO'larının FFA miktarlarını hesap etmede güçlü bir metot olduğunu teyit etmektedir.

Çizelge 6. 25. 10 farklı EVOO'nın standart titrimetrik metotla ve geliştirilen FT-IR PLS kalibrasyon metodu ile elde edilen üç tekrarlı FFA yüzdeleri

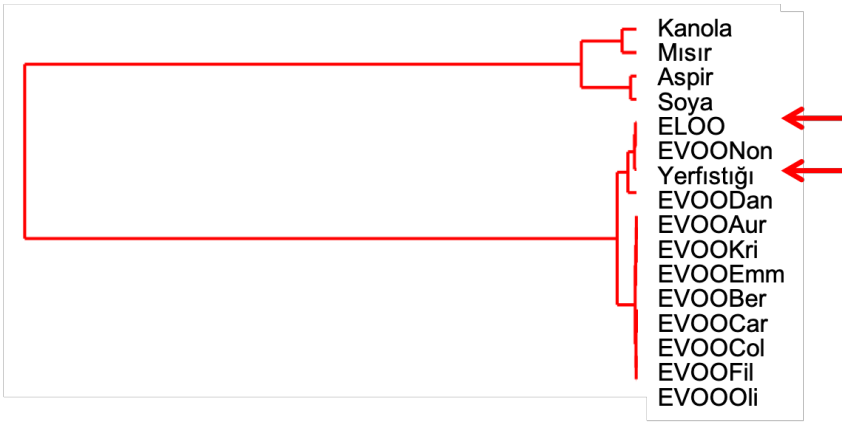
EVOO numuneleri	AOCS-1	AOCS-2	AOCS-3	Ortalama değer	SD	FT-IR-1	FT-IR-2	FT-IR-3	Ortalama değer	SD
EVOO1	0.20	0.22	0.18	0.21	0.02	0.22	0.22	0.23	0.22	0.02
EVOO2	0.14	0.15	0.15	0.14	0.01	0.19	0.20	0.20	0.20	0.01
EVOO3	0.36	0.40	0.34	0.38	0.03	0.28	0.27	0.28	0.28	0.01
EVOO4	0.54	0.49	0.50	0.50	0.03	0.49	0.49	0.49	0.49	0.00
EVOO5	0.84	0.93	0.93	0.90	0.05	0.98	0.98	0.99	0.98	0.01
EVOO6	0.44	0.44	0.45	0.44	0.01	0.39	0.40	0.40	0.40	0.01
EVOO7	0.85	0.87	0.88	0.87	0.02	0.80	0.80	0.80	0.80	0.00
EVOO8	0.53	0.53	0.54	0.54	0.01	0.53	0.53	0.53	0.53	0.00
EVOO9	1.00	0.94	0.95	0.97	0.03	0.91	0.90	0.90	0.90	0.01
EVOO10	0.89	0.90	0.90	0.89	0.01	0.87	0.88	0.88	0.88	0.01

Çizelge 6.25'de, 10 farklı EVOO numunesinin çalışma kapsamında seçilmiş PLS kalibrasyon modeli ile ve standart titrimetrik metotla elde edilmiş FFA değerleri karşılaştırılmıştır. Çizelgeden de görüleceği üzere geliştirilmiş olan PLS kalibrasyon modeli, farklı validasyon numunelerindeki FFA miktarlarını düşük SS değeri ve yüksek

doğrulukla tespit etmiştir. Daha önce de bahsedildiği üzere EVOO'lar için FFA miktarı çok önemlidir ve bir zeytinyağının EVOO olarak tanımlanabilmesi için FFA miktarının ağırlıkça %0.8'e eşit ya da altında olması gerekmektedir. Fakat Çizelge 6.25 incelendiğinde bazı EVOO'ların %0.8'den fazla FFA içerdiği görülmektedir. Bu sebeple EVOO numunelerindeki FFA miktarının tespiti için yüksek doğruluğa ve kolay uygulamaya sahip olan güvenilir ve hızlı bir analiz metodunun önemi görülmektedir.

6.2.6. Orta, yakın ve raman spektroskopisinin natürel sızma zeytinyağlarının sınıflandırılması için kullanımının karşılaştırılması

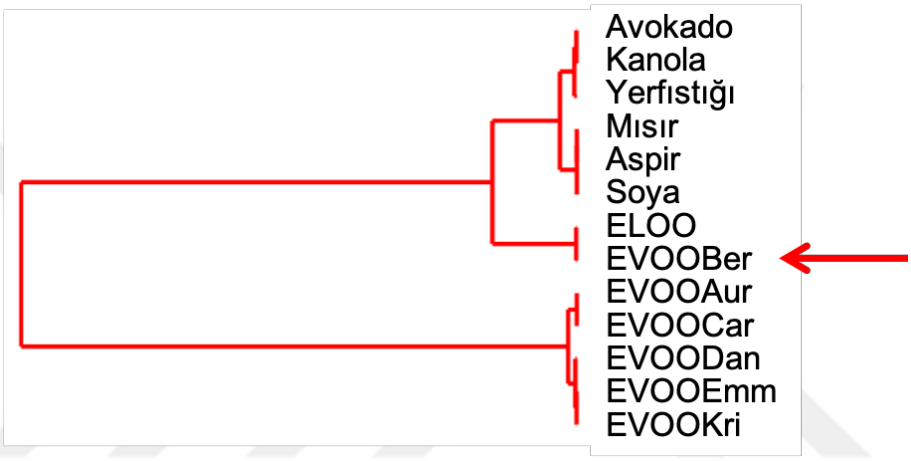
SB-ATR-FT-IR tekniği kullanılarak yapılmış olan EVOO'ların sınıflandırma analizine ait dendrogram Şekil 6.36'da verilmiştir. Bu analizde avokado datası bozuk çıkması sebebiyle kullanılmamıştır. PLS-DA temelinde bir kalibrasyon modeli oluşturmak için yazılım tarafından otomatik olarak seçilen 3000-700 cm^{-1} dalga sayısı aralığındaki spektral farklılıklar kullanılmıştır. Şekil 6.36'dan görüleceği üzere kullanılmış olan teknik, tüm EVOO numunelerini ayrı bir kümede sınıflandırabilmiş fakat ELOO ve yerfıstığı yağı numunelerini ayırt edememiştir. Elde edilen sonuçlara göre ELOO ve yerfıstığı yağı, çalışma kapsamında kullanılan spektral aralıkta EVOO numuneleri ile benzer spektral özellikler göstermektedir. Buna rağmen SB-ATR-FT-IR tekniği, çalışılan spektral aralıkta EVOO numunelerini diğer bitkisel yağlardan başarılı bir şekilde ayırmıştır.



Şekil 6. 36. SB-ATR-FT-IR tekniği ile EVOO sınıflandırmasına ait dendrogram

Transmisyon-FT-IR tekniği kullanılarak yapılmış olan EVOO'ların sınıflandırma analizine ait dendrogram Şekil 6.37'de verilmiştir. PLS-DA temelinde bir kalibrasyon

modeli oluşturmak için yazılım tarafından otomatik olarak seçilen 1539, 1547, 1558-1566, 2430 ve 4590 cm^{-1} dalga sayısı aralığındaki spektral farklılıklar kullanılmıştır. Şekil 6.37'den görüleceği üzere kullanılmış olan teknik, EVOOBer hariç tüm EVOO numunelerini ayrı bir kümede sınıflandırabilmiştir. Sonuçlara göre çalışma kapsamında FT-IR cihazında kullanılmış olan 100 µm'lik ışın yolu ile tüm EVOO numunelerini ayrı bir sınıfa yerleştirecek kadar yeterli spektral data elde edilemeyeceği görülmüştür. Buna rağmen transmisyon-FT-IR tekniği, çalışılan spektral aralıkta EVOO numunelerinin çoğunu diğer bitkisel yağlardan başarılı bir şekilde ayırmıştır.



Şekil 6. 37. Transmisyon-FT-IR tekniği ile EVOO sınıflandırmasına ait dendrogram

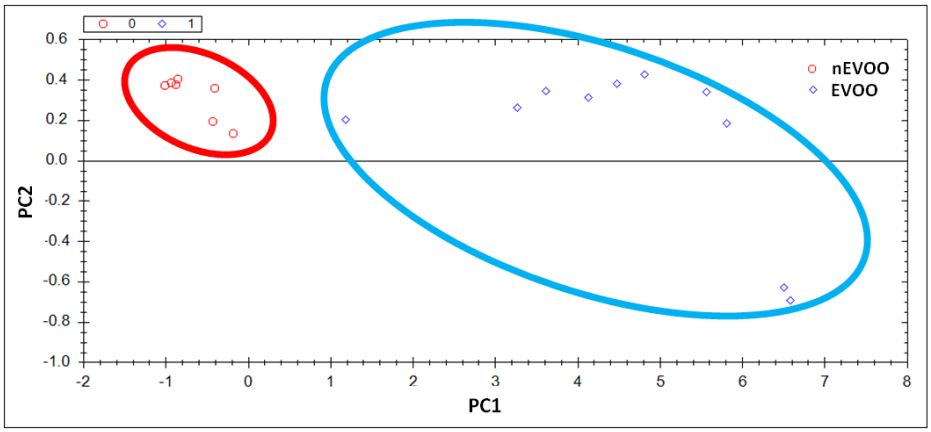
FT-NIR tekniği kullanılarak yapılmış olan EVOO'ların sınıflandırma analizine ait dendrogram Şekil 6.38'de verilmiştir. PLS-DA temelinde bir kalibrasyon modeli oluşturmak için yazılım tarafından otomatik olarak seçilen 6218, 6226-6241, 6461, 6473-6484, 7364, 7989-7996, 8710, 14704-15426, 15433 ve 15792-15795 cm^{-1} dalga sayısı aralığındaki spektral farklılıklar kullanılmıştır.



Şekil 6. 38. FT-NIR tekniği ile EVOO sınıflandırmasına ait dendrogram

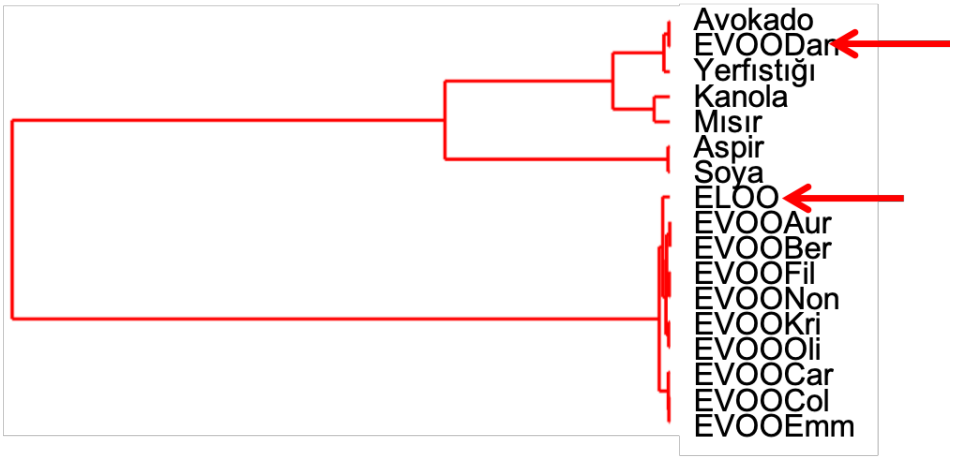
Şekil 6.38'den görüleceği üzere kullanılmış olan teknik, tüm EVOO numunelerini diğer bitkisel yağlardan başarılı bir şekilde ayrı bir sınıfa yerleştirmiştir. Ayrıca kanola, soya ve ELOOBer numunelerini de diğer bitkisel yağlardan ayrı bir sınıfa yerleştirmiştir. Bu sonuca göre ilgili teknik, hem EVOO numunelerini diğer bitkisel yağlardan başarılı bir şekilde ayırmakta hem de ELOOBer, kanola ve soya gibi EVOO numunelerine kimyasal olarak benzerlik gösteren yağları da başarılı bir şekilde ayırabilmektedir.

En iyi sınıflandırmanın sağlandığı FT-NIR tekniği için ayrıca benzerlik haritası da çıkarılmıştır (Şekil 6.39). Mavi kareler EVOO numunelerini; kırmızı daireler ise diğer bitkisel yağları temsil etmektedir. Şekil 6.39'dan da görüleceği üzere çalışma kapsamında geliştirilen teknik, bitkisel yağları ayrı bir bölgede gruplarken; EVOO numunelerini nispeten daha geniş bir bölgede gruplandırabilmeyi başarmıştır. NIR bölgesi diğer IR bölgelerine göre daha geniş bir elektromanyetik spektral bölgeye sahip olduğu için çalışma kapsamında daha çok spektral bölge kullanılabilmiş ve başarılı bir ayırma sağlanabilmiştir.



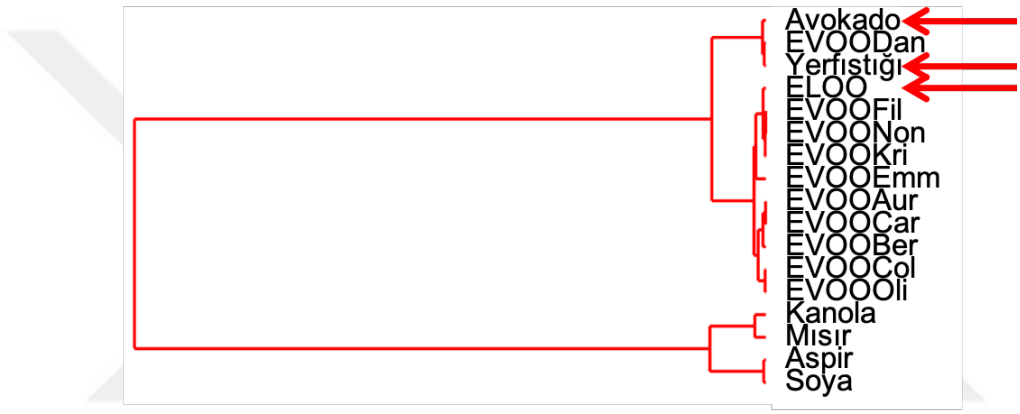
Şekil 6. 39. FT-NIR tekniği ile EVOO sınıflandırmasına ait benzerlik haritası

Taşınabilir ATR-IR tekniği kullanılarak yapılmış olan EVOO'ların sınıflandırma analizine ait dendrogram Şekil 6.40'da verilmiştir. PLS-DA temelinde bir kalibrasyon modeli oluşturmak için yazılım tarafından otomatik olarak seçilen 1780-930 cm^{-1} dalga sayısı aralığındaki spektral farklılıklar kullanılmıştır. Şekil 6.40'dan görüleceği üzere kullanılmış olan teknik, EVOODan numunesi hariç tüm EVOO numunelerini ELOO numunesini de içine alacak şekilde ayrı bir grupta sınıflandırabilmiştir. EVOODan numunesini ise diğer bitkisel yağlarla birlikte sınıflandırmıştır. Elde edilen sonuçlara göre taşınabilir ATR-IR cihazının sınırlı olan tarama aralığı, EVOO numunelerinin hepsini ayırmaya yetecek kadar yeterli spektral dataya sahip olamamıştır. Sınırlı bir tarama aralığına sahip olmasına rağmen yine de EVOO numunelerinin çoğunu diğer bitkisel yağlardan ayırabilmiştir.



Şekil 6. 40. Taşınabilir ATR-IR tekniği ile EVOO sınıflandırmasına ait dendrogram

Taşınabilir raman tekniği kullanılarak yapılmış olan EVOO'ların sınıflandırma analizine ait dendrogram Şekil 6.41'de verilmiştir. PLS-DA temelinde bir kalibrasyon modeli oluşturmak için yazılım tarafından otomatik olarak seçilen 500-1700 cm^{-1} dalga sayısı aralığındaki spektral farklılıklar kullanılmıştır. Şekil 6.41'den görüleceği üzere kullanılmış olan teknik, tüm EVOO numunelerini avokado, yerfıstığı ve ELOOBer numunelerini de içine alacak şekilde ayrı bir grupta sınıflandırabilmeyi başarmıştır. Elde edilen sonuçlara göre taşınabilir raman cihazının, EVOO numunelerinin hepsini ayırmaya yetecek kadar yeterli spektral dataya sahip olmadığı görülmüştür. Buna rağmen yine de EVOO numunelerinin çoğunu diğer bitkisel yağlardan ayırabilmiştir.



Şekil 6. 41. Taşınabilir raman tekniği ile EVOO sınıflandırmasına ait dendrogram

Yapılmış olan bu çalışmada 5 farklı spektroskopik teknik, EVOO numunelerini diğer bitkisel yağlardan ayırma performanslarına göre karşılaştırılmıştır. FT-NIR tekniğinin diğer tekniklere göre EVOO numunelerini diğer bitkisel yağlardan başarılı bir şekilde ayırdığı görülmüştür. FT-NIR tekniğinin bu başarıyı, en uzun ışın yoluna (10 mm) ve en geniş spektral aralığa (14000-4000 cm^{-1}) sahip olmasından dolayı elde ettiği düşünülmüştür. Çünkü uzun ışın yolu ve geniş spektral aralık, iyi bir sınıflandırma yapabilmek için daha çok spektral farklılık içeren data anlamına gelmektedir. Çalışma kapsamında, EVOO numunelerinin diğer yağlardan ayırt edilebilmesi amacıyla geliştirilmiş olan FT-NIR metodu başarılı bir şekilde sınıflandırma yapabilmekte ve sunmuş olduğu kullanım kolaylığı ve kısa analiz süresi (1 dk) ile ön plana çıkmaktadır. Spektroskopik teknikler, numune ön hazırlığı gibi zaman alan işlemlere ihtiyaç duymayan, numuneyi yok etmeyen ve hızlı analiz sürelerine sahip bir tekniktir. Yapılan çalışma ile, 10 mm ışın yoluna sahip bir FT-NIR cihazı ve kemometrik metotlar

kullanılarak EVOO numunelerinin diğer bitkisel yağlardan ayırt edilebilmesi için muhtelif metotlara alternatif olarak endüstri ve diğer alanlarda kolaylıkla kullanılabilecek kolay ve hızlı bir metot geliştirilebilmiştir.

6.3. Monolitik Kolon Çalışmaları

Monolitik kolon kullanarak biyoaktif bileşenlerin kromatografik olarak tayin edilmesinde Merck marka, Chromolith Performance RP-18 100mmx4.6mm model ticari monolitik kolon kullanılmıştır. Kolon dolgu maddesi apolar karakterli olduğu için tüm çalışmalarda RP kromatografi şartları geçerli olmuş ve bu sebeple hareketli faz olarak polar yapıda çözücüler kullanılmıştır.

6.3.1. Monolitik ayırma1

Herhangi bir ön işlem yapmadan numunelerin direk enjeksiyonu ile TG ve TG harici yapıları tayin etmeye imkan veren MA1 metodu kullanılarak aşağıda listelenen numuneler analiz edilmiştir. Analizler için Çizelge 5.16'daki kromatografik şartlar kullanılmıştır.

- RSY
- OODD
- %50 OODD + %50 HPY
- Sabunlaştırılmış OODD (OODDS)
- Sabunlaştırılmış HPY (HPYS)
- Sabunlaştırılmış (%50 OODD + %50 HPY) karışımı (S(%50 OODD + %50 HPY))

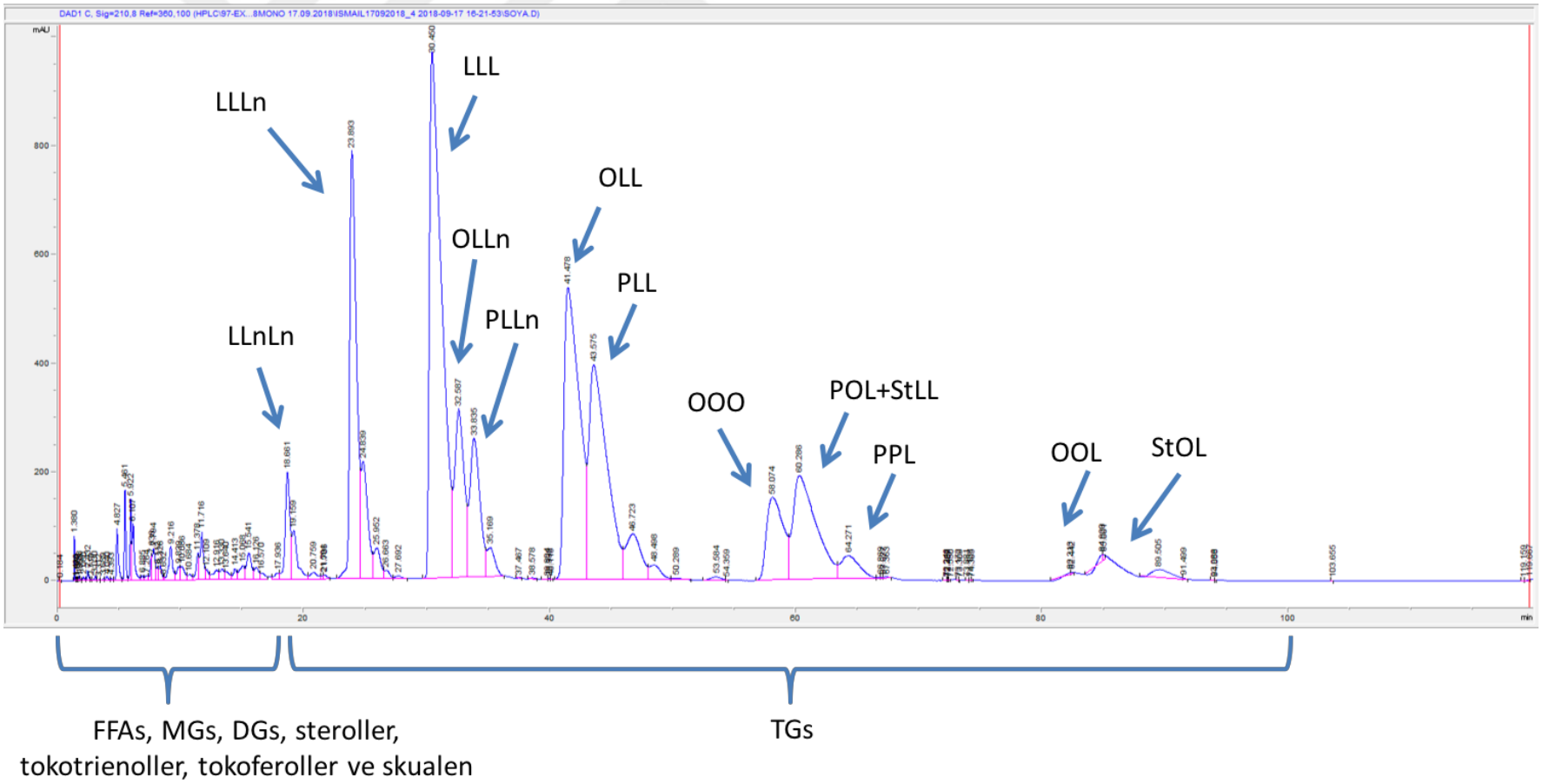
Yenilebilir yağların TG yapılarının tayinin için kullanılan standart metotta (AOCS 2017) RSY kullanıldığı için çalışma kapsamında geliştirilen MA1 metodunun validasyonu için ilk önce RSY sisteme enjekte edilmiş ve elde edilen kromatogram incelenmiştir (Şekil 6.42).

Şekil 6.42'deki rafine RSY'na ait kromatogram incelendiğinde 0-19 dk aralığında yüksek polariteye sahip TG harici yapıların (FFA, MG, DG, steroller, tokotrienoller, tokoferoller, skualen) çıktığı görülmüştür. FFA, MG ve DG türleri, değişen karbon ve çift

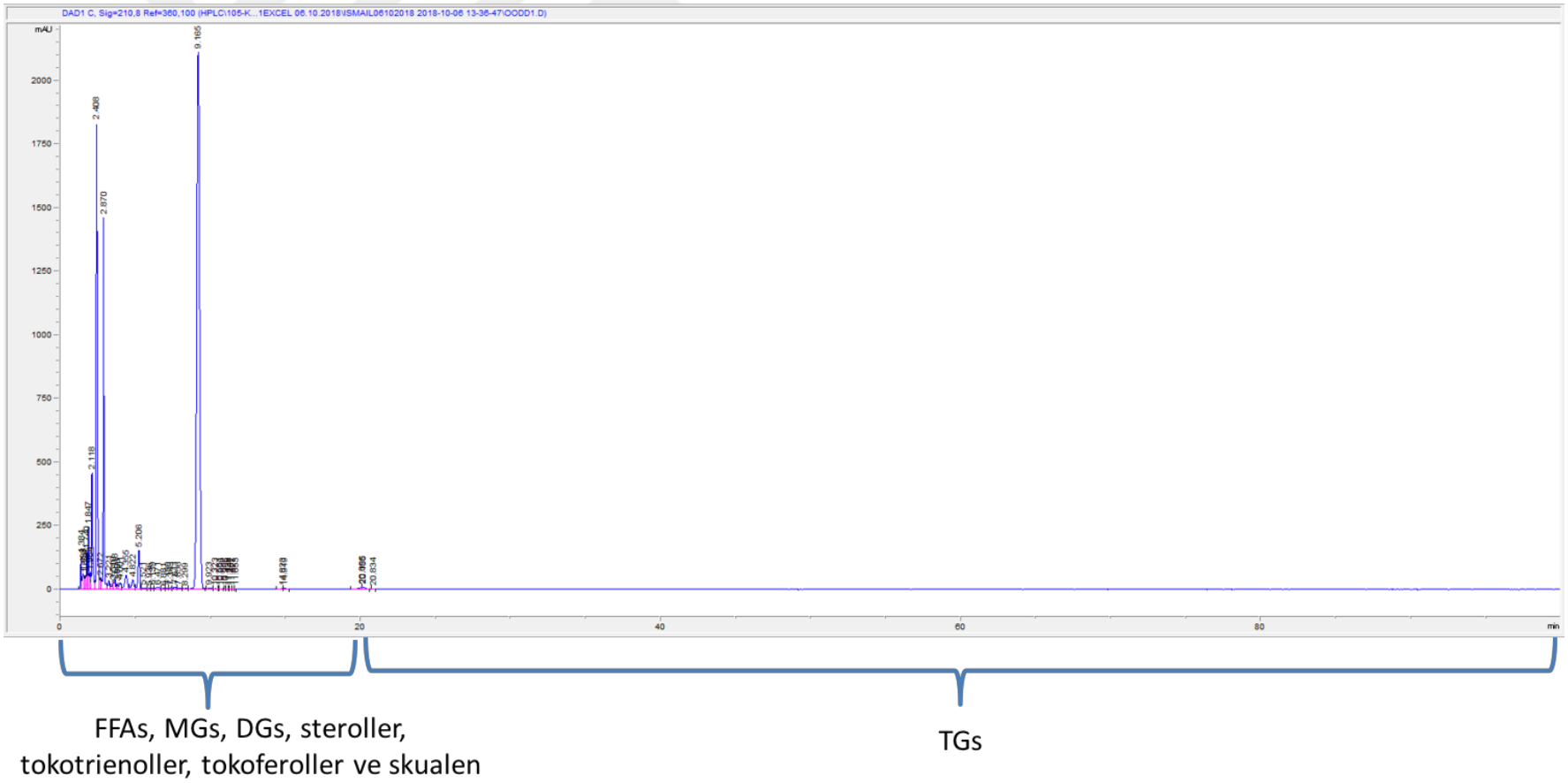
bağ sayılarına ve buna bağlı olarak değişen polaritelerine göre bu aralıkta hemen hemen her bölgede çıkabilmektedirler. Bu sebeple steroller, tokotrienoller, tokoferoller ve skualen türlerinin analizi için, aynı bölgede pik veren ve analizi engelleyen MG, DG ve FFA türlerinin sabunlaştırma işlemi uygulanarak numuneden uzaklaştırılması gerekmektedir.

Şekil 6.42'deki kromatogramın 19-100 dk aralığında daha çok apolar olan TGs yapıları çıkmıştır. İlgili piklerin türleri, standart metot (AOCS 2017) incelenerek tespit edilmiştir. Standart metot ve Şekil 6.42'deki kromatogram karşılaştırıldığında, TGs sonuçlarının uyumlu olduğu ve MA1 metodu ile TGs yapılarının doğru bir şekilde tayin edilebildiği tespit edilmiştir. Bu sayede RSY kullanılarak MA1 metodu valide edilmiştir.

MA1 metoduna göre analizi yapılan OODD numunesinin kromatogramı Şekil 6.43'de verilmiştir.



Şekil 6. 42. MA1 metodun göre analiz edilen RSY'nın kromatogramı



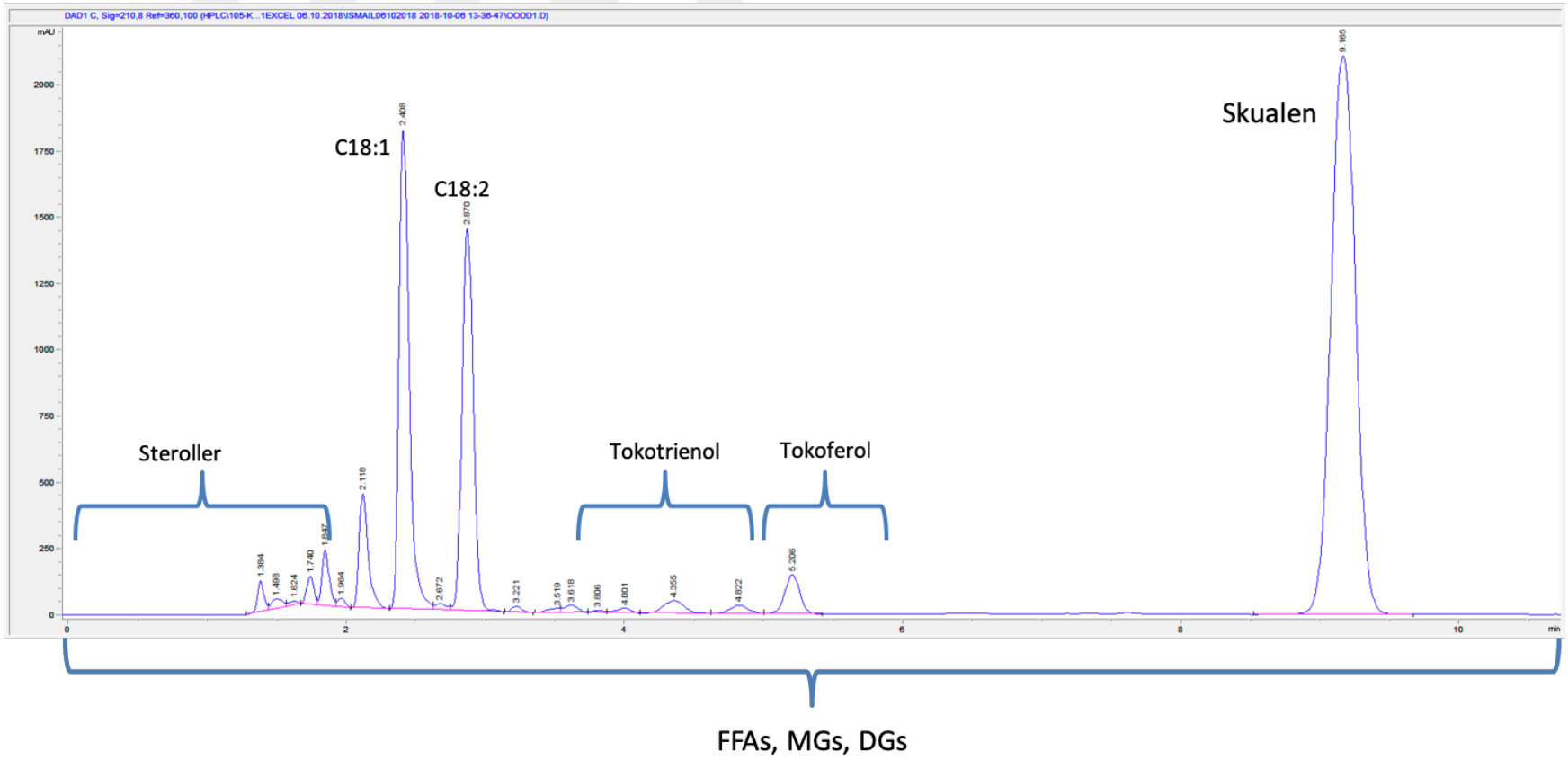
Şekil 6. 43. MA1 metodun göre analiz edilen OODD numunesinin kromatogramı

Şekil 6.43'deki OODD numunesine ait kromatogram incelendiğinde TG harici yapıların çıktığı görülmüş; fakat TGs bölgesinde herhangi bir tür tespit edilememiştir. Daha önce Başlık 6.1.8'de ise standart metot kullanılarak OODD numunesinde TG analizi yapılmış fakat herhangi bir TGs türü tespit edilememiştir. Bu aşamada yapılan analiz de bir önceki çalışmayı doğrular nitelikte olmuş ve çalışma kapsamında incelenen OODD numunesinin herhangi bir TGs türü içermediğini göstermiştir.

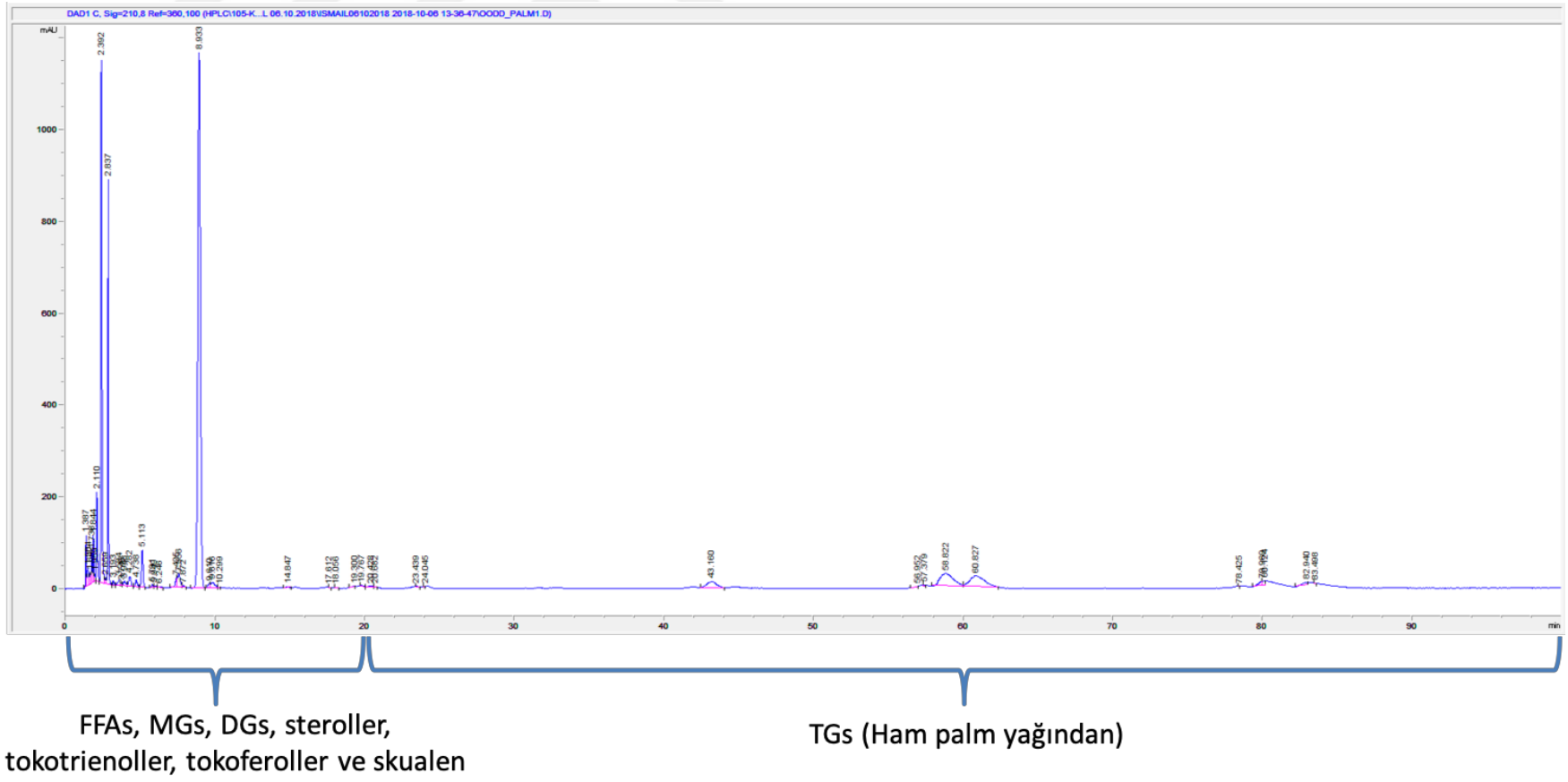
Şekil 6.43'de verilen kromatogramın 0-12 dk aralığı büyütülerek Şekil 6.44'de verilmiştir.

Şekil 6.44'deki OODD numunesine ait kromatogramın 0-12 dk aralığında steroller, tokotrienoller ve tokoferoller in çıkması beklenen bölgeleri yatay parantez ile gösterilmiştir. Türü belli olan oleik asit (C18:1) ve linoleik asit (C18:2) FFA türlerine ait kromatogramlar etiketlenmiştir. Ayrıca 9. dk civarı çıkan skualen türüne ait kromatogram da etiketlenmiştir. Bu analizde OODD numunesinde sabunlaştırma işlemi yapılmadan direk enjeksiyonu yapıldığı için analizin ilk 8 dksında beklediğimiz türlerle aynı bölgede tanımlanamayan pikler de çıkmıştır. Bu piklerin farklı karbon ve çift bağ sayılarına sahip FFA, MG ve DG türleri olabileceği düşünülmektedir. Bu sebeple Şekil 6.44'de sterol, tokotrienol ve tokoferol bölgesinde çıkan piklerin bu türlere ait olup olmadığı netleştirilememektedir.

MA1 metoduna göre analizi yapılan (%50 OODD + %50 HPY) numunesinin kromatogramı Şekil 6.45'de verilmiştir.

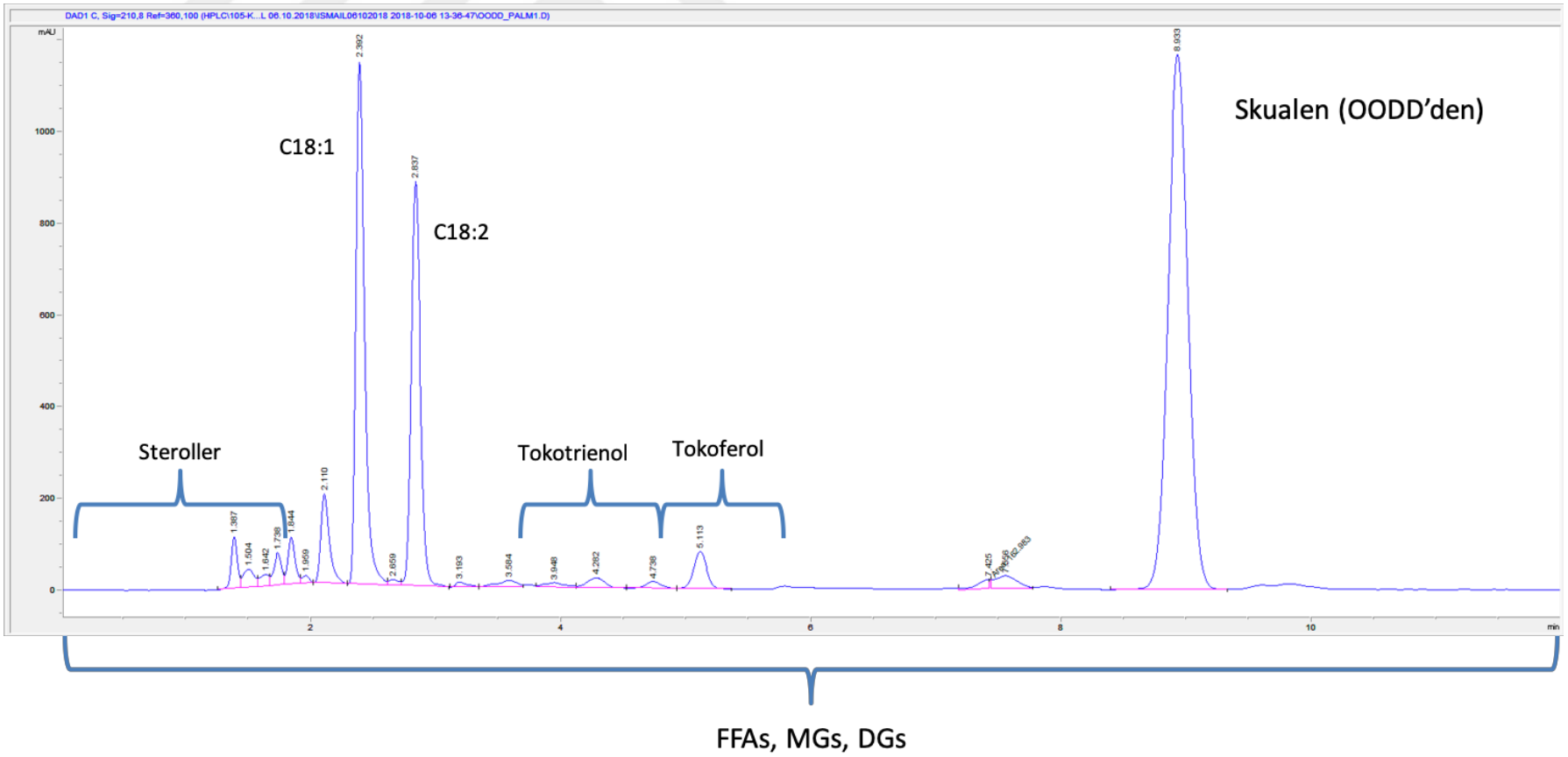


Şekil 6. 44. MA1 metodun göre analiz edilen OODD numunesinin kromatogramının 0-12 dk aralığı



Şekil 6. 45. MA1 metodun göre analiz edilen (%50 OODD + %50 HPY) numunesinin kromatogramı

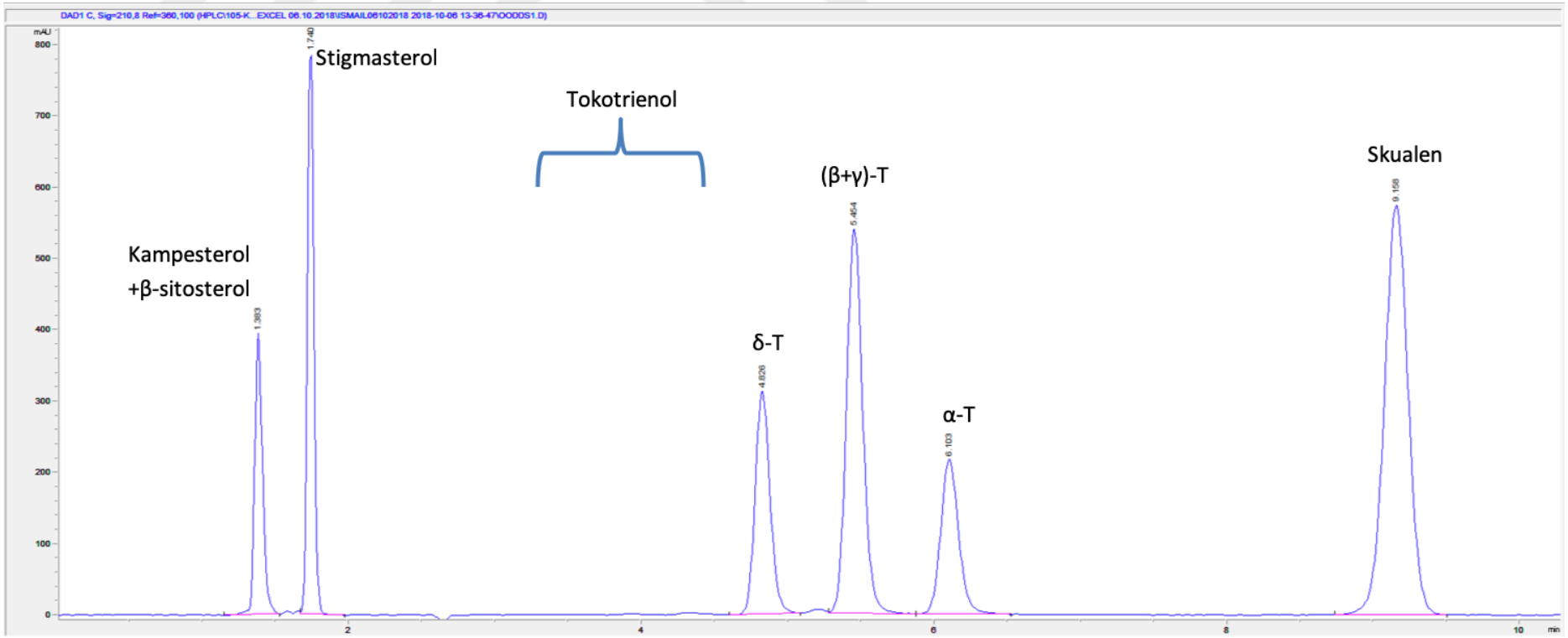
Şekil 6.45'deki (%50 OODD + %50 HPY) numunesine ait kromatogram incelendiğinde TG harici yapıların çıktığı görülmüş ve HPY'ndan geldiği düşünülen TGs türleri tespit edilmiştir. Şekil 6.45'de verilen kromatogramın 0-19 dk aralığı büyütülerek Şekil 6.46'de verilmiştir.



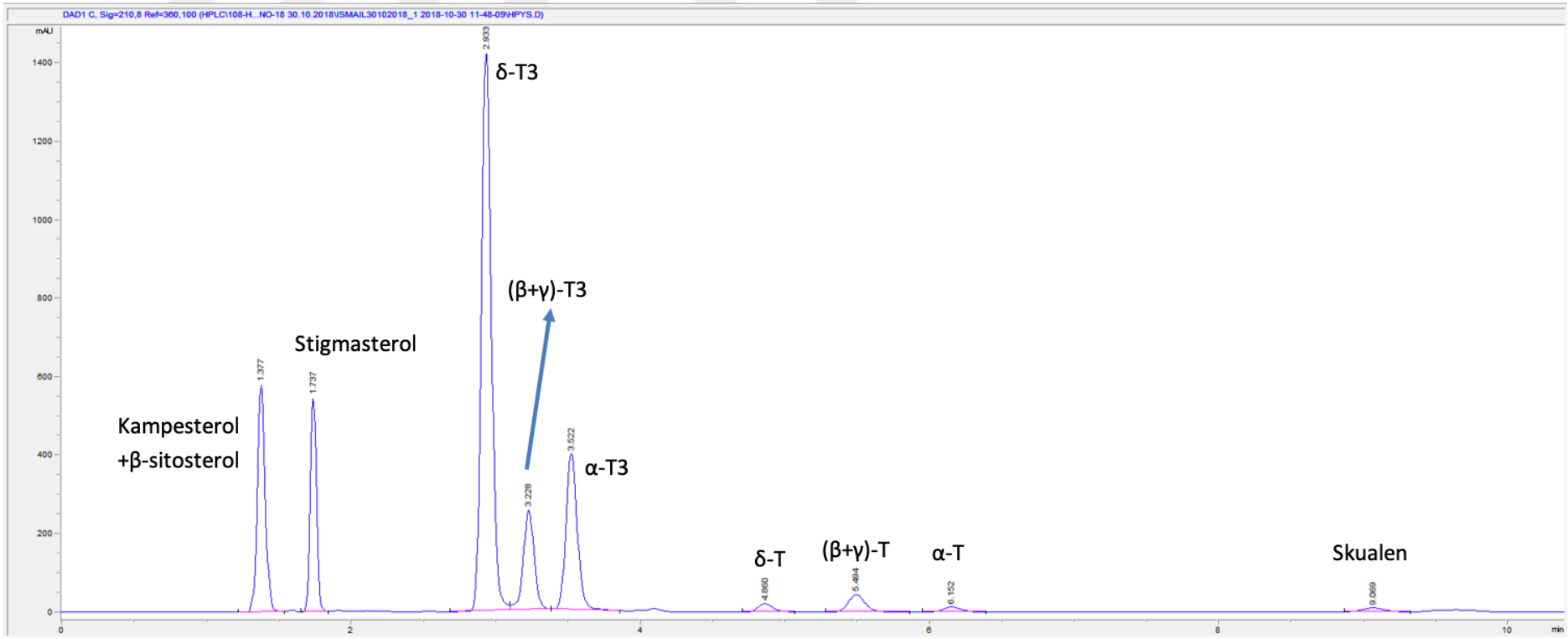
Şekil 6. 46. MA1 metodun göre analiz edilen (%50 OODD + %50 HPY) numunesinin kromatogramının 0-12 dk aralığı

Şekil 6.46'daki (%50 OODD + %50 HPY) numunesine ait kromatogramın 0-12 dk aralığında steroller, tokotrienoller ve tokoferollerin çıkması beklenen bölgeleri yatay parantez ile gösterilmiştir. Türü belli olan oleik asit (C18:1) ve linoleik asit (C18:2) FFA türlerine ait kromatogramlar etiketlenmiştir. Ayrıca 9. dk civarı çıkan skualen türüne ait kromatogram da etiketlenmiştir. Fakat FFA ve skualen türlerine ait kromatogramlar bu analizde daha düşük şiddette pikler vermiştir. Bunun sebebinin OODD numunesine göre daha düşük miktarlarda FFA ve skualen içeren HPY'ndan ileri geldiği düşünülmüştür. Ayrıca bu analizin de ilk 8 dksında beklediğimiz türlerle aynı bölgede netleştirilemeyen pikler çıkmıştır.

OODDS numunesi sabunlaştırma işlemine tabi tutulduğu için 0-19 dk aralığında herhangi bir FFA, MG ya da DG türü çıkması beklenmemektedir. Sabunlaştırma işlemi sebebiyle herhangi bir TGs türü de çıkmadığı için sadece 0-10 dk aralığındaki kromatogramı incelenmiştir. OODD numunesinin biyoaktif bileşenleri daha önceki başlıklarda standart metotlarla tayin edildiği için çıkması beklenen türler bilinmektedir. Türleri tespit edilen (kampesterol+β-sitosterol), stigmasterol, δ-tokoferol, (β+γ)-tokoferol, α-tokoferol ve skualen türlerine ait kromatogramlar etiketlenmiştir. Tokotrienol türlerinin çıkması beklenen bölge yatay parantez ile gösterilmiştir. Numune, sabunlaştırma işlemine tabi tutulduğu için netleştirilemeyen herhangi bir türe ait pik çıkmamıştır. Sterol türüne ait 3 adet pik beklenirken, analizde kullanılan hareketli fazın polaritesi bu türleri birbirinden ayırmaya yetmemiş ve kampesterol ve β-sitosterol türleri tek bir pik olarak çıkmıştır. Beklenildiği gibi herhangi bir tokotrienol türü tespit edilememesine karşın tokoferol türleri tespit edilmiştir. β ve γ tokoferol türleri, yakın polarite değerleri sebebiyle RP kromatografi şartlarında tek bir pik olarak çıkmaktadır. Ayrıca tespit edilen tokoferol türleri piklerinin R_s değerlerinin, arzu edilen 3.6 değerinden düşük oldukları tespit edilmiştir. MA1 metoduna göre analizi yapılan OODDS numunesinin kromatogramı Şekil 6.47'de verilmiştir. MA1 metoduna göre analizi yapılan HPYS numunesinin kromatogramı Şekil 6.48'de verilmiştir.



Şekil 6. 47. MA1 metodun göre analiz edilen OODDS numunesinin kromatogramı



Şekil 6. 48. MA1 metodun göre analiz edilen HPYS numunesinin kromatogramı

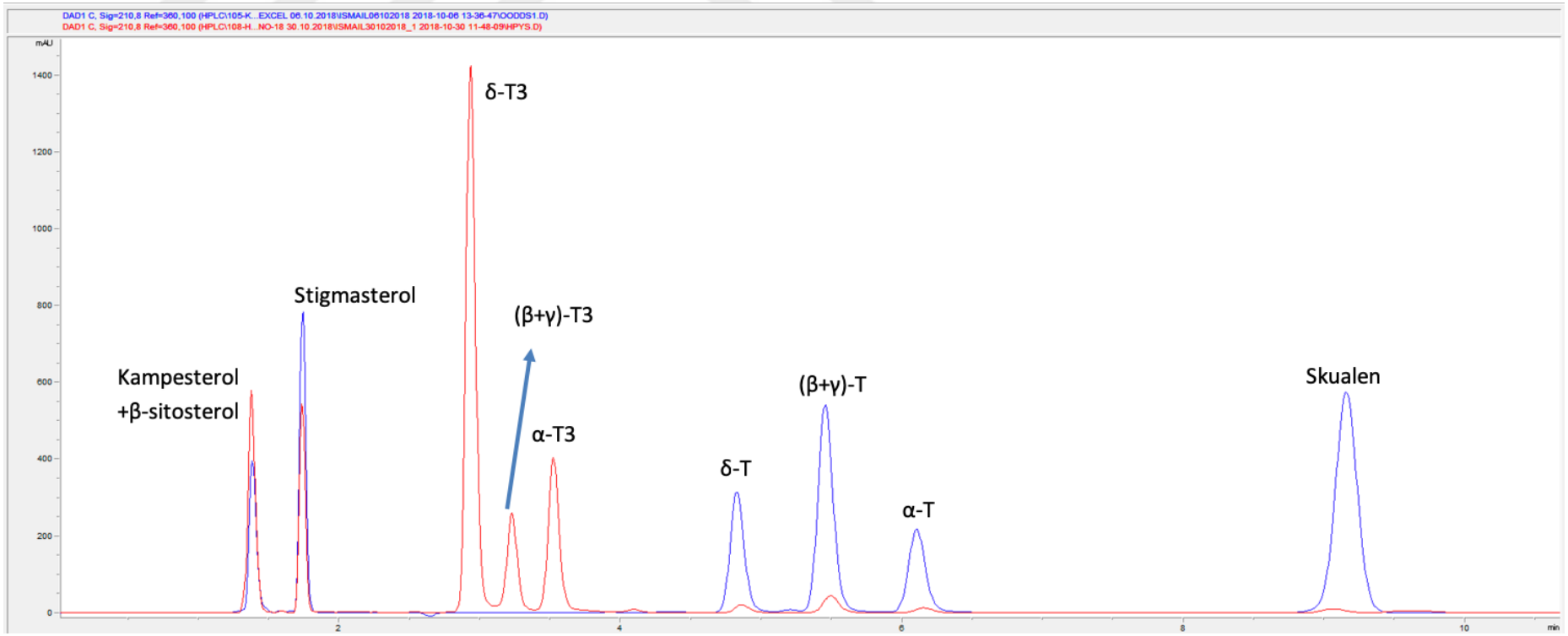
HPYS numunesi de sabunlaştırma işlemine tabi tutulduğu için 0-19 dk aralığında herhangi bir FFA, MG ya da DG türü çıkması beklenmemektedir. Sabunlaştırma işlemi sebebiyle herhangi bir TGs türü de çıkmadığı için sadece 0-10 dk aralığındaki kromatogramı incelenmiştir. Türleri tespit edilen (kampesterol+β-sitosterol), stigmasterol, δ-tokotrienol, (β+γ)-tokotrienol, α-tokotrienol, δ-tokoferol, (β+γ)-tokoferol, α-tokoferol ve skualen türlerine ait kromatogramlar etiketlenmiştir. Özellikle yüksek çıkan tokotrienol türleri dikkat çekmiştir. Numune, sabunlaştırma işlemine tabi tutulduğu için netleştirilemeyen herhangi bir türe ait pik çıkmamıştır. Sterol türüne ait 3 adet pik beklenirken, analizde kullanılan hareketli fazın polaritesi bu türleri birbirinden ayırmaya yetmemiş ve kampesterol ve β-sitosterol türleri tek bir pik olarak çıkmıştır. β ve γ tokoferol-tokotrienol türleri, yakın polarite değerleri sebebiyle RP kromatografi şartlarında tek bir pik olarak çıkmaktadır. Ayrıca tespit edilen tokotrienol-tokoferol türleri piklerinin R_s değerlerinin, arzu edilen 3.6 değerinden düşük oldukları tespit edilmiştir.

MA1 metoduna göre analizi yapılan OODDS ve HPYS numunelerinin kromatogramları Şekil 6.49'da verilmiştir.

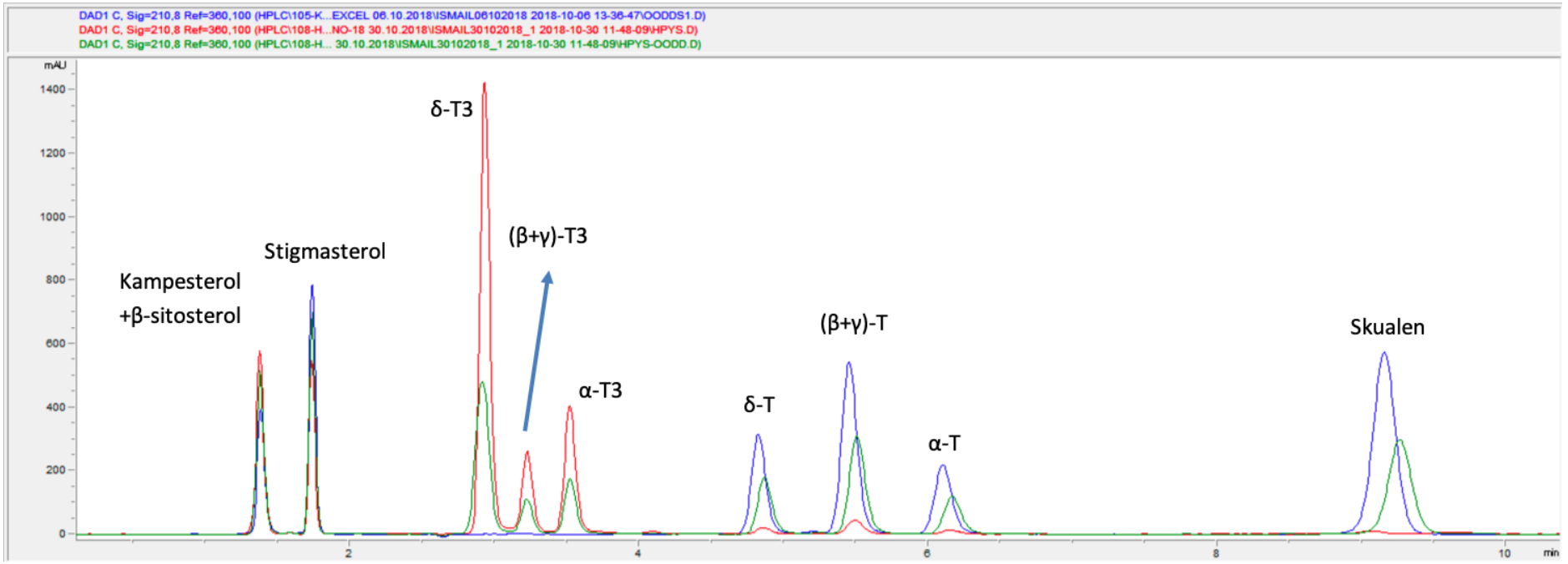
Şekil 6.49 incelendiğinde numunelerden gelen türler açıkça görülmektedir. Türleri tespit edilen (kampesterol+β-sitosterol), stigmasterol, δ-tokotrienol, (β+γ)-tokotrienol, α-tokotrienol, δ-tokoferol, (β+γ)-tokoferol, α-tokoferol ve skualen türlerine ait kromatogramlar etiketlenmiştir. Yüksek tokotrienol içeriğiyle HPYS öne çıkarken; yüksek tokoferol ve skualen içeriği ile OODDS öne çıkmıştır. Ayrıca HPYS numunesinin az miktarlarda tokoferol türlerini içerdiği tespit edilmiştir. Sterol türleri ise her iki numunede yakın değerlerde çıkmıştır.

MA1 metoduna göre analizi yapılan OODDS, HPYS ve S(%50 OODD + %50 HPY) numunesinin kromatogramı Şekil 6.50'de verilmiştir.

Her iki numune de sabunlaştırma işlemine tabi tutulduğu için herhangi bir FFA, MG ya da DG türü çıkması beklenmemektedir. Türleri tespit edilen (kampesterol+β-sitosterol), stigmasterol, δ-tokotrienol, (β+γ)-tokotrienol, α-tokotrienol, δ-tokoferol, (β+γ)-tokoferol, α-tokoferol ve skualen türlerine ait kromatogramlar etiketlenmiştir. Yapılan karışım sebebiyle Şekil 6.49'da verilen kromatogramda tokotrienol türlerine ait kromatogramların pik alanları azalırken; tokoferol türlerine ait kromatogramların pik alanları artmıştır.



Şekil 6. 49. MA1 metodun göre analiz edilen OODDS (Mavi) ve HPYS (Kırmızı) numunelerinin kromatogramları



Şekil 6. 50. MA1 metodun göre analiz edilen OODDS (Mavi), HPYS (Kırmızı) ve S(%50 OODD + %50 HPY) (Yeşil) numunesinin kromatogramı

6.3.2. Monolitik ayırma2

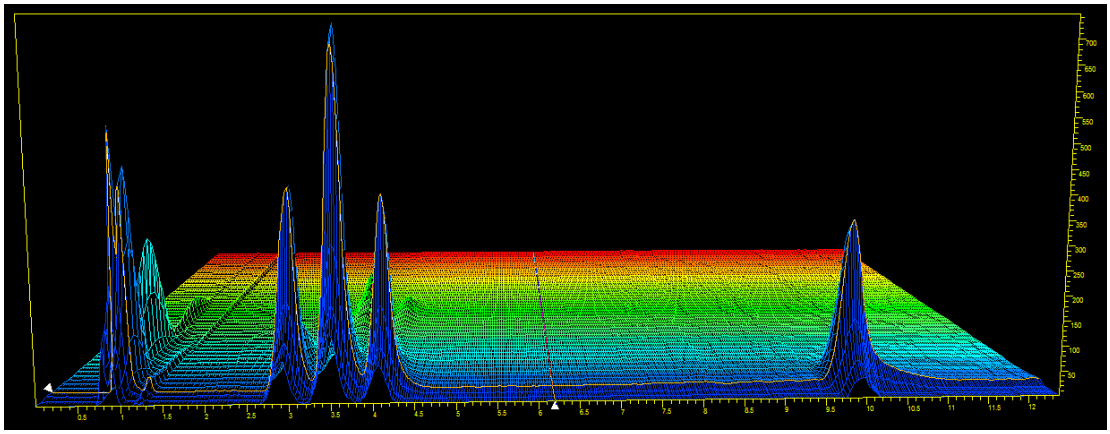
6.3.2.1. Uygun dalga boyunun seçimi

Bazı ön denemeler için hazırlanmış olan sterol, tokoferol ve skualen türlerini içeren standart karışım, ilk olarak biyoaktif bileşenlerin tek bir analiz metoduyla tayin edilebilmesi için en yüksek absorbans verdikleri ortak dalga boyunun belirlenmesinde kullanılmıştır. İlgili standart karışım Çizelge 6.26'daki şartlara göre HPLC sistemine enjeksiyonu yapılmış ve elde edilen kromatogramın üç boyutlu (3D) spektrumu Şekil 6.51'de verilmiştir.

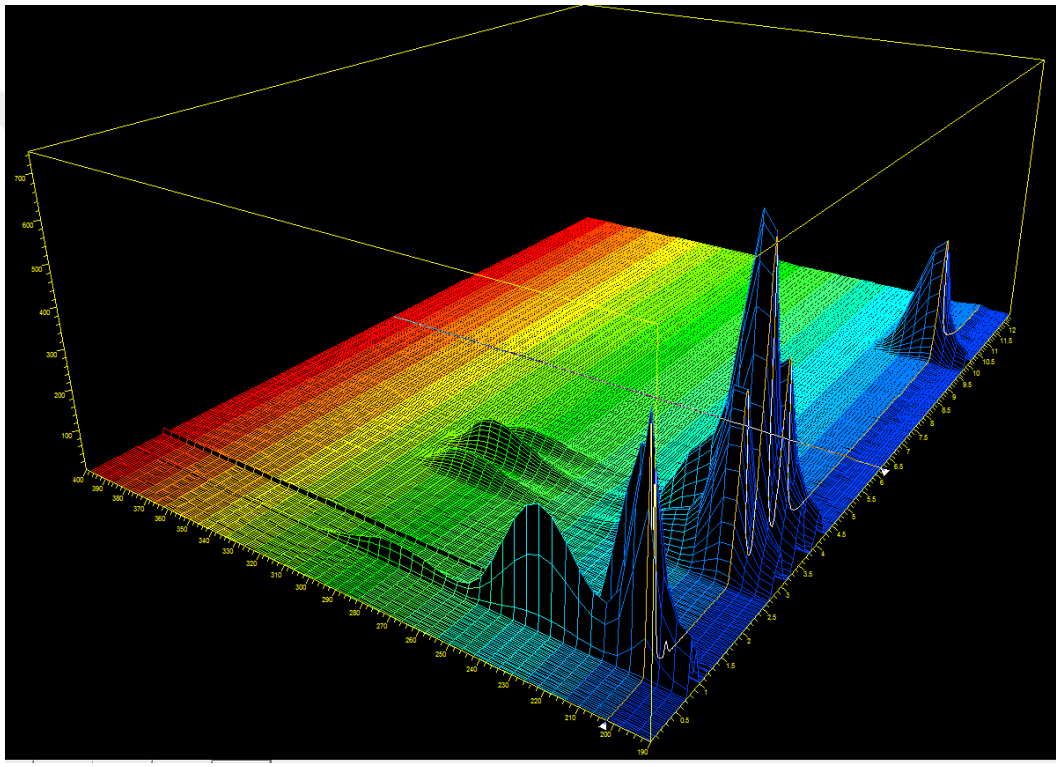
Çizelge 6. 26. MA2 metodu için uygun dalga boyunun seçiminde kullanılan kromatografik şartlar

Sabit Faz (Kolon)	Merck Chromolith Performance RP-18 100mmx4.6mm Monolitik kolon
Hareketli Faz	%96Metanol-%4Su
Hareketli Faz Polaritesi	5.304
Hareketli Faz Akış Hızı (mL/dk)	2
Dedeksiyon	DAD 190-410 nm
Analiz Süresi (dk)	12
Enjeksiyon Miktarı (µL)	20
Kolon Fırını Sıcaklığı (°C)	30
Ulaşılan Kolon Basıncı (Bar)	41

Şekil 6.51'de verilen standart karışımın 3D spektrumu incelendiğinde biyoaktif bileşenlerin hepsinin en yüksek absorbans değerini 202 nm'de verdiği tespit edilmiştir. Bu aşamadan sonra MA2 metodu ile yapılan tüm analizlerde dalga boyu olarak 202 nm seçilmiştir.



(a)



(b)

Şekil 6. 51. MA2 metodu için uygun dalga boyunun seçiminde kullanılan 3D spektrumlar (a: Pik şiddeti ve zaman eksenleriyle, b: Pik şiddeti, zaman ve dalga boyu eksenleriyle)

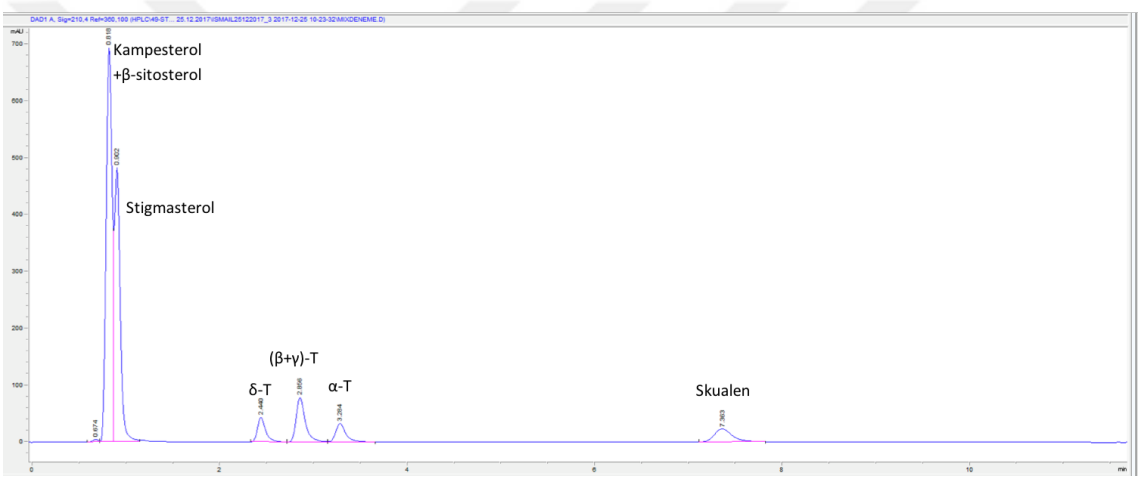
6.3.2.2. Sterol türlerinin ayrımı için kullanılan deneysel tasarım

1. ön deneme

Bazı ön denemeler için hazırlanmış olan sterol, tokoferol ve skualen türlerini içeren standart karışım, Çizelge 6.27'deki şartlara göre HPLC sistemine enjekte edilmiş ve çalışma kapsamında kullanılan monolitik kolonun standart karışımdaki türleri ayırma kabiliyeti 1. ön deneme kapsamında incelenmiştir.

Çizelge 6. 27. MA2 metodu için yapılan 1. ön denemede kullanılan kromatografik şartlar

Sabit Faz (Kolon)	Merck Chromolith Performance RP-18 100mmx4.6mm Monolitik kolon
Hareketli Faz	%96Metanol-%4Su
Hareketli Faz Polaritesi	5.30
Hareketli Faz Akış Hızı (mL/dk)	2
Dedeksiyon	UV-VIS 202 nm
Analiz Süresi (dk)	15
Enjeksiyon Miktarı (µL)	20
Kolon Fırını Sıcaklığı (°C)	30
Ulaşılan Kolon Basıncı (Bar)	41



Şekil 6. 52. MA2 metodu için yapılan 1. ön denemede elde edilen kromatogram

Şekil 6.52'deki elde edilen kromatogram incelediğinde kullanılmış olan hareketli fazın polaritesinin (P': 5.30) kampesterol ve β-sitosterol türlerini ayırmak için yeterli olmadığı görülmüş ve bu türler tek bir pik olarak çıkmıştır. Daha önceki başlıkta da değinildiği gibi β ve γ tokoferol türleri, yakın polarite değerleri sebebiyle RP kromatografi şartlarında tek bir pik olarak çıkmıştır. Ayrıca tespit edilen tokoferol türleri piklerinin R_s değerlerinin, arzu edilen 3.6 değerinden düşük oldukları tespit edilmiştir. Skualen türü ise yaklaşık 7. dkda diğer türlerden ayrı fakat uzak bir bölgede çıkmıştır.

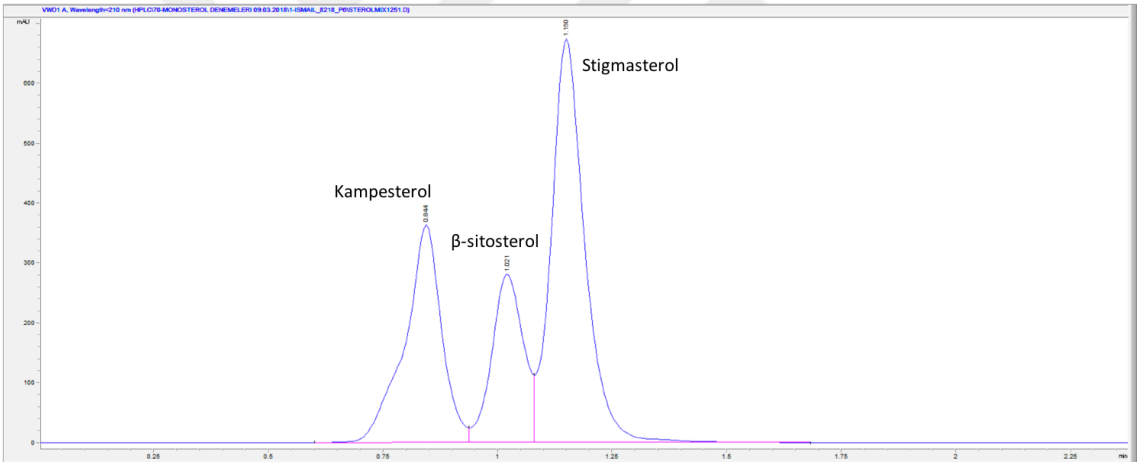
2. ön deneme

1. ön denemede tam olarak birbirinden ayrılamayan 3 sterol türü için 2. ön deneme gerçekleştirilmiştir. Sadece 3 sterol türünü içeren standart karışım, Çizelge 6.28'deki şartlara göre HPLC sistemine enjekte edilmiş ve çalışma kapsamında kullanılan monolitik

kolonun standart karışımdaki türleri ayırma kabiliyeti 2. ön deneme kapsamında incelenmiştir.

Çizelge 6. 28. MA2 metodu için yapılan 2. ön denemede kullanılan kromatografik şartlar

Sabit Faz (Kolon)	Merck Chromolith Performance RP-18 100mmx4.6mm Monolitik kolon
Hareketli Faz	%82Metanol-%18Su
Hareketli Faz Polaritesi	6.00
Hareketli Faz Akış Hızı (mL/dk)	2
Dedeksiyon	UV-VIS 202 nm
Analiz Süresi (dk)	15
Enjeksiyon Miktarı (µL)	20
Kolon Fırını Sıcaklığı (°C)	30
Ulaşılan Kolon Basıncı (Bar)	76



Şekil 6. 53. MA2 metodu için yapılan 2. ön denemede elde edilen sterol türlerine ait kromatogram

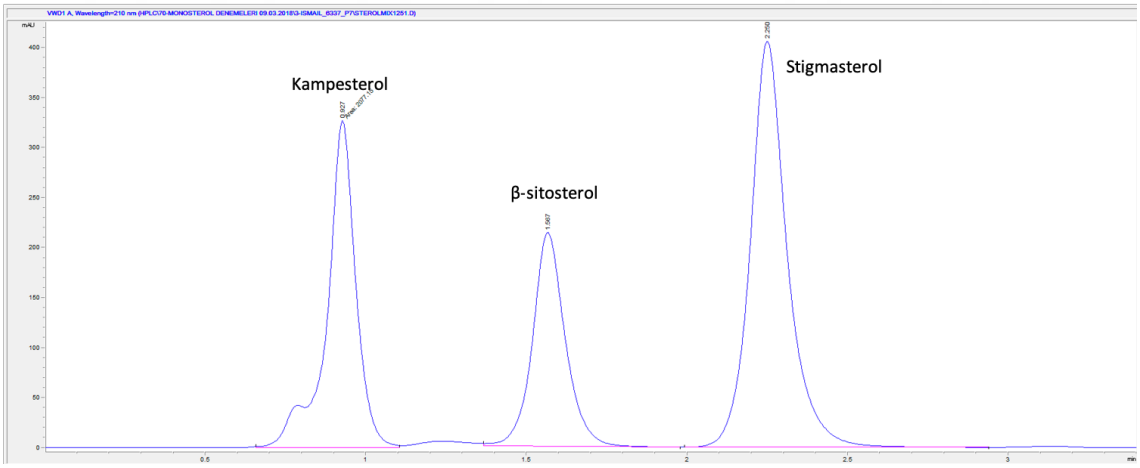
Şekil 6.53'de verilen 2. ön denemeye ait kromatogram incelediğinde kullanılmış olan hareketli fazın polaritesi (P': 6.00) kampesterol ve β-sitosterol türlerini birbirinden kısmen olarak ayırmayı başarabilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, hareketli fazda kullanılan su miktarı arttırıldıkça hareketli fazın da polaritesi arttığı için daha önceki denemede tek bir pik olarak çıkan kampesterol ve β-sitosterol türlerinin bu denemede ayrılmaya başladığı tespit edilmiştir. Fakat kampesterol ve β-sitosterol türleri için R_s değeri 3.6 'nın altında olduğu görülmüştür.

3. ön deneme

2. ön denemede kısmen birbirinden ayrılmaya başlayan 3 sterol türü için 3. ön deneme gerçekleştirilmiştir. Sadece 3 sterol türünü içeren standart karışım, Çizelge 6.29'daki şartlara göre HPLC sistemine enjekte edilmiş ve çalışma kapsamında kullanılan monolitik kolonun standart karışımdaki türleri ayırma kabiliyeti 3. ön deneme kapsamında incelenmiştir.

Çizelge 6. 29. MA2 metodu için yapılan 3. ön denemede kullanılan kromatografik şartlar

Sabit Faz (Kolon)	Merck Chromolith Performance RP-18 100mmx4.6mm Monolitik kolon
Hareketli Faz	%63Metanol-%37Su
Hareketli Faz Polaritesi	7.00
Hareketli Faz Akış Hızı (mL/dk)	2
Dedeksiyon	UV-VIS 202 nm
Analiz Süresi (dk)	15
Enjeksiyon Miktarı (µL)	20
Kolon Fırını Sıcaklığı (°C)	30
Ulaşılan Kolon Basıncı (Bar)	86



Şekil 6. 54. MA2 metodu için yapılan 3. ön denemede elde edilen sterol türlerine ait kromatogram

Şekil 6.54'de verilen 3. ön denemeye ait kromatogram incelediğinde kullanılmış olan hareketli fazın polaritesi (P': 7.00) kampesterol ve β-sitosterol türlerini birbirinden tamamen ayırmayı başarabilmiştir. Kampesterol ve β-sitosterol türleri için R_s değerinin 3.76 olduğu tespit edilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, metanol içerisindeki su oranının %37'ye çıkarılmasıyla artan hareketli faz polaritesinin daha önceki denemelerde

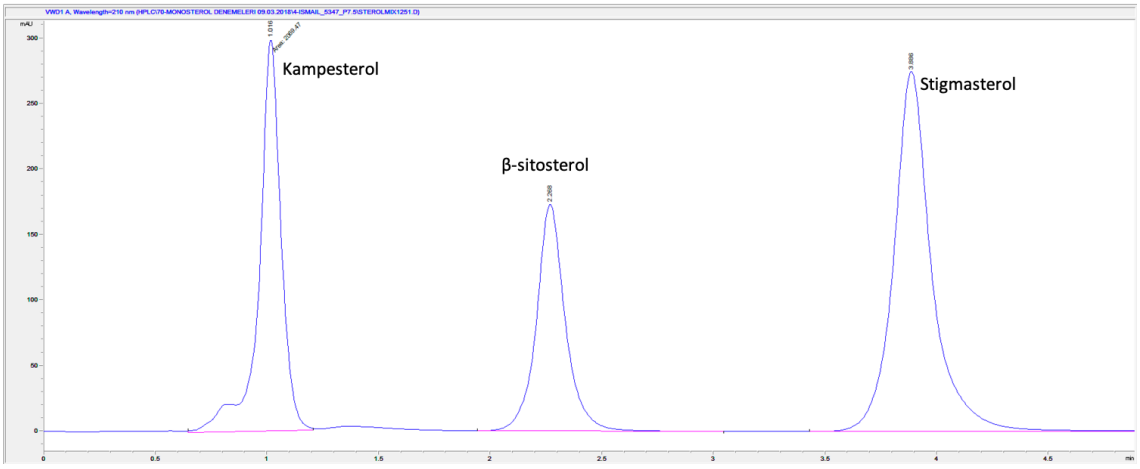
birbirinden tam olarak ayrılamayan kampesterol ve β-sitosterol türlerini istenilen düzeyde bir R_s değeri ile ayırabilmeyi başardığı görülmüştür.

4. ön deneme

3. ön denemede kısmen birbirinden ayrılmaya başlayan 3 sterol türü için 4. ön deneme gerçekleştirilmiştir. Sadece 3 sterol türünü içeren standart karışım, Çizelge 6.30'daki şartlara göre HPLC sistemine enjekte edilmiş ve çalışma kapsamında kullanılan monolitik kolonun standart karışımdaki türleri ayırma kabiliyeti 4. ön deneme kapsamında incelenmiştir.

Çizelge 6. 30. MA2 metodu için yapılan 4. ön denemede kullanılan kromatografik şartlar

Sabit Faz (Kolon)	Merck Chromolith Performance RP-18 100mmx4.6mm Monolitik kolon
Hareketli Faz	%53Metanol-%47Su
Hareketli Faz Polaritesi	7.50
Hareketli Faz Akış Hızı (mL/dk)	2
Dedeksiyon	UV-VIS 202 nm
Analiz Süresi (dk)	15
Enjeksiyon Miktarı (µL)	20
Kolon Fırını Sıcaklığı (ºC)	30
Ulaşılan Kolon Basıncı (Bar)	96



Şekil 6. 55. MA2 metodu için yapılan 4. ön denemede elde edilen sterol türlerine ait kromatogram

Şekil 6.55'de verilen 4. ön denemeye ait kromatogram incelediğinde kullanılmış olan hareketli fazın polaritesi (P': 7.50) kampesterol ve β-sitosterol türlerini birbirinden

tamamen ayırmayı başarabilmiştir. Kampesterol ve β-sitosterol türleri için R_s değerinin 6.75 olduğu tespit edilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, metanol içerisindeki su oranının %47'ye çıkarılmasıyla artan hareketli faz polaritesinin 3. denemede birbirinden tam olarak ayrılmış olan sterol türlerini istenilen düzeyin üstünde bir R_s değeri ile ayırdığı görülmüştür. Hareketli fazdaki su oranı arttıkça sterol türlerinin birbirinden daha da iyi ayrılabileceği tespit edilmiştir. Fakat bu durumda artan analiz süresi ile orantılı olarak fazla miktarlarda çözücü karışımı kullanılması gerekmektedir. Hem çevresel kaygılar hem de artan analiz maliyetleri sebebiyle R_s değerinin 3.76 olduğu 3. ön denemede kullanılan hareketli fazın polaritesi (P': 7.00), sterol türlerinin tayini için oluşturulacak olan kemometrik tasarımda orta seviye (0) değeri olarak seçilmiştir.

Monolitik kolon kullanarak 3 sterol türünün (kampesterol, β-sitosterol ve stigmasterol) kantitatif olarak tayini için, hareketli faz polaritesi (P'), hareketli faz akış hızı (mL/dk) ve kolon fırını sıcaklığı (^oC) parametrelerinin optimum değerlerinin tespiti Çizelge 5.17'de verilen seviye değerleri ve Çizelge 5.20'de verilen deneysel tasarım kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 5.20'de bulunan her bir deneysel şartlarda, 3 sterol türünü içeren (kampesterol, β-sitosterol ve stigmasterol) standart bir karışım sisteme ardı ardına 3 kez enjekte edilmiştir. Kampesterol ve β-sitosterol türlerinin ayrımından elde edilen R_s değeri, Denklem 5.12'ye göre işleme alınmış ve her bir deneysel tasarım için cevap değeri (Y) oluşturulmuştur. Sterol türlerinin kromatografik ayrım parametrelerinin tayini için kullanılacak olan yüzey grafiklerinin elde edilmesinde kullanılan bağımsız değişkenlerin seviyeleri ve elde edilen cevap değerleri Çizelge 6.31'de verilmiştir.

Çizelge 6.31'deki değişkenlerin seviye ve cevap değerleri kullanılarak Morgan'a göre (Morgan 1991) quadratik polinomal model eşitliği hesaplanmış ve Denklem 6.2'de verilmiştir.

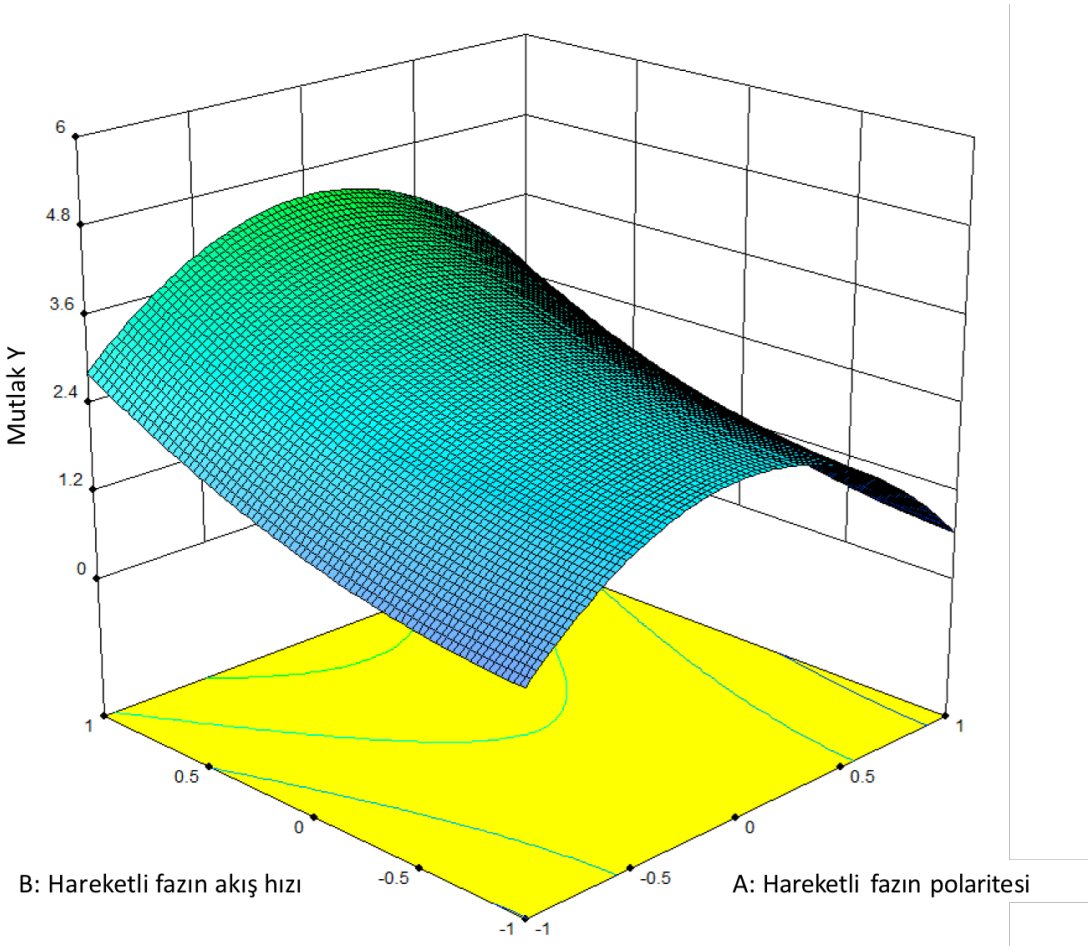
$$Y= 3.09705 - 0.144229A + 0.964513B + 1.03185C + 0.020625AB + 0.043125AC - 0.000875BC - 1.73026A^2 + 0.407499B^2 + 0.220823C^2 \quad (6.2)$$

Çizelge 6. 31. Sterol türlerinin kromatografik ayrım parametrelerinin tayini için kullanılacak olan yüzey grafiklerinin elde edilmesinde kullanılan bağımsız değişkenlerin seviyeleri ve elde edilen cevap değerleri

Analiz Sırası	Bağımsız Değişkenler						Y (Cevap Değeri)
	A (Hareketli faz polaritesi (P'))	Seviyesi	B (Hareketli faz akış hızı (mL/dk))	Seviyesi	C (Kolon fırını sıcaklığı (°C))	Seviyesi	
1	6.16	-1.68179	2.50	0	30.00	0	0.455
2	6.50	-1	2.00	-1	25.00	-1	0.777
3	6.50	-1	2.00	-1	35.00	1	0.683
4	6.50	-1	3.00	1	25.00	-1	0.710
5	6.50	-1	3.00	1	35.00	1	0.608
6	7.00	0	1.66	-1.68179	30.00	0	2.406
7	7.00	0	3.34	1.68179	30.00	0	10.309
8	7.00	0	2.50	0	21.59	-1.68179	1.626
9	7.00	0	2.50	0	38.41	1.68179	10.033
10	7.00	0	2.50	0	30.00	0	2.899
11	7.00	0	2.50	0	30.00	0	2.988
12	7.00	0	2.50	0	30.00	0	3.003
13	7.00	0	2.50	0	30.00	0	2.964
14	7.00	0	2.50	0	30.00	0	3.055
15	7.00	0	2.50	0	30.00	0	2.950
16	7.50	1	2.00	-1	25.00	-1	0.272
17	7.50	1	2.00	-1	35.00	1	0.346
18	7.50	1	3.00	1	35.00	1	0.358
19	7.50	1	3.00	1	25.00	-1	0.283
20	7.84	1.68179	2.50	0	30.00	0	0.177

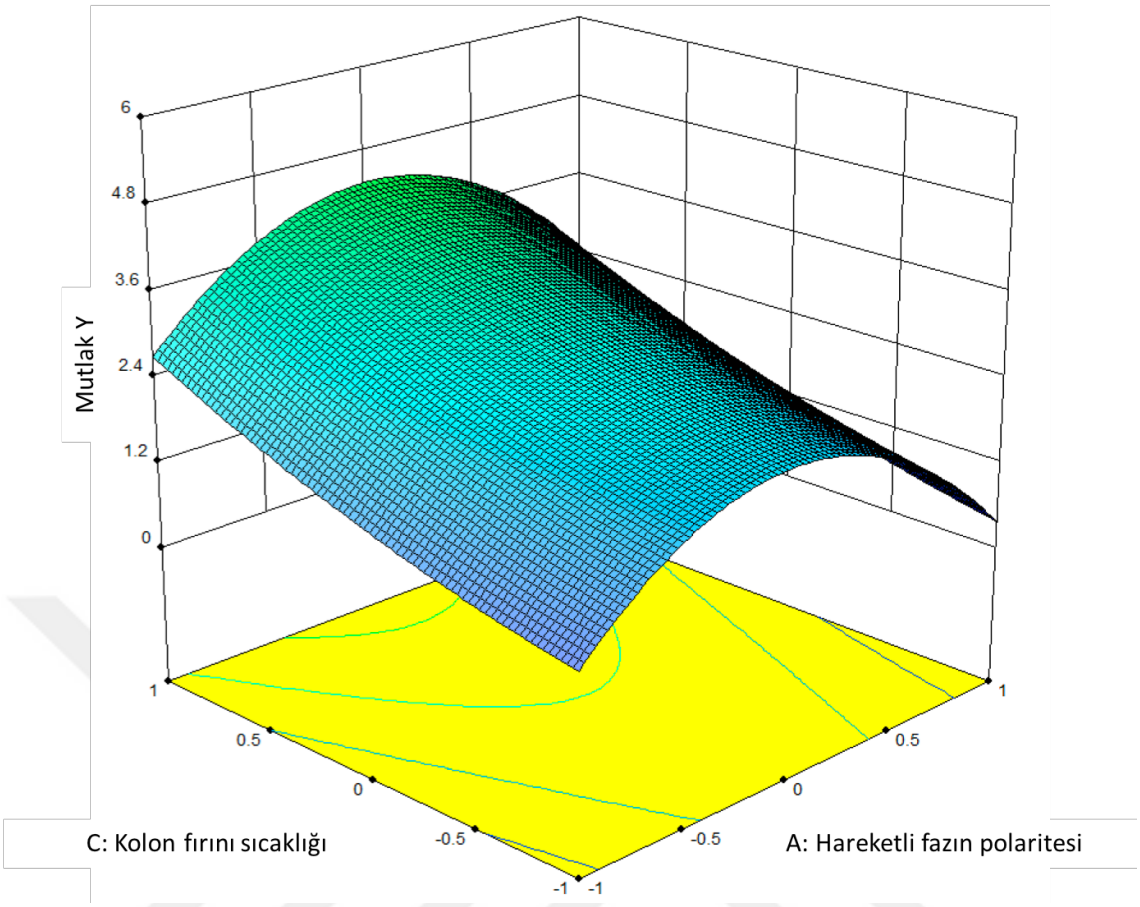
Cevap değerleri ile bağımsız değişkenlerin seviyeleri arasındaki ilişkiyi görselleştiren ve bu sayede değişkenlerin optimum noktalarının tespitini mümkün kılan yüzey grafikleri, Denklem 6.2'deki polinomal quadratik model kullanılarak çizdirilmiştir.

Hareketli fazın polaritesi-hareketli fazın akış hızı, Hareketli fazın polaritesi-kolon fırını sıcaklığı ve hareketli fazın akış hızı-kolon fırını sıcaklığı etkileşimlerini gösteren ikili yüzey grafikleri aşağıda verilmiştir (Şekil 6.56, Şekil 6.57, Şekil 6.58).



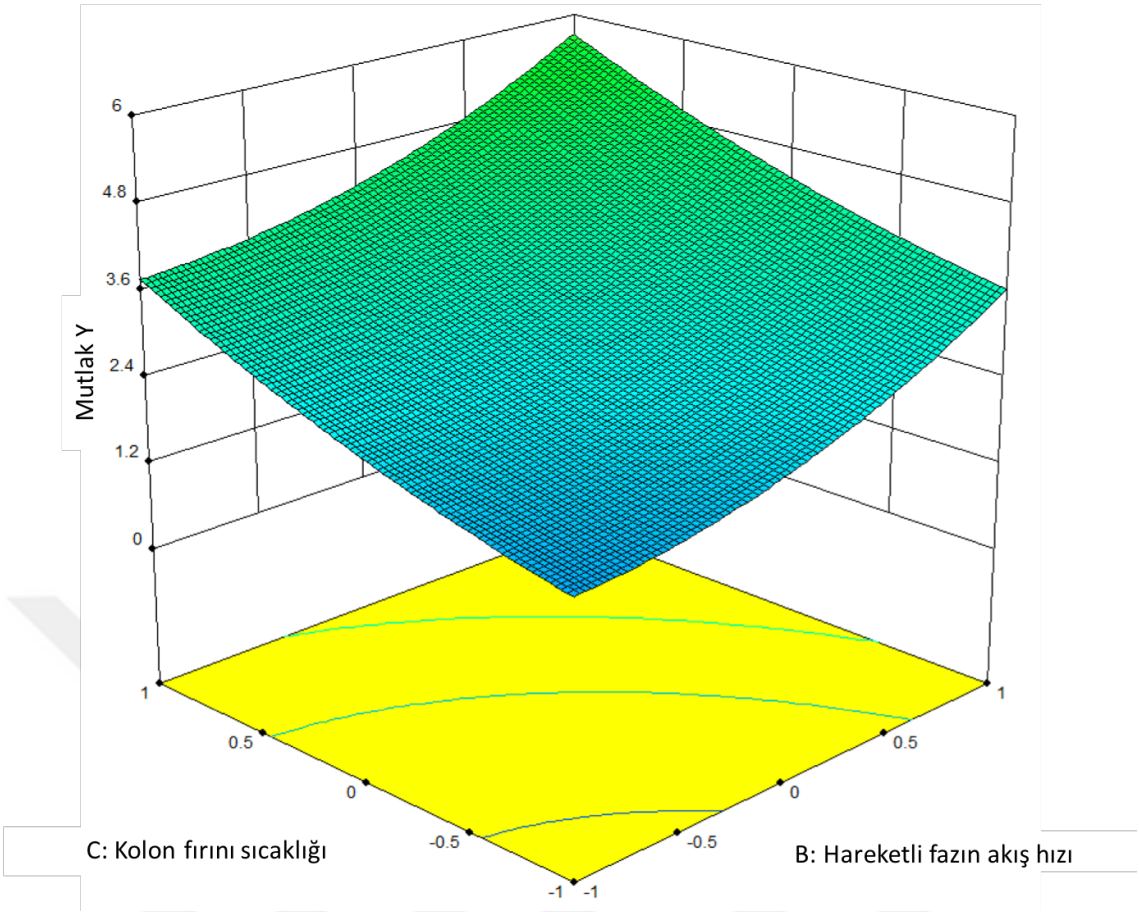
Şekil 6. 56. Sterol türlerinin ayrımında hareketli fazın polarite ve akış hızı parametrelerinin optimizasyonu için oluşturulan yüzey grafiği

Şekil 6.56, sterol türlerinin ayrımında hareketli fazın polarite ve akış hızı kodlanmış değerlerinin kampesterol ve β-sitosterol türlerinin ayrımına olan etkisini göstermektedir. Hareketli fazın polaritesi 7.00 değerine yaklaştıkça kampesterol ve β-sitosterol türlerinin R_s değeri 3.60'ya yaklaşmış; polarite 7.00 değerinden uzaklaştıkça R_s değeri 3.60'dan uzaklaşmıştır. Hareketli fazın akış hızı ise R_s değeri ile doğru orantılı olarak artmıştır. Daha yüksek akış hızlarında R_s değeri 3.60'ya yaklaşmıştır. Şekil 6.55'de verilen yüzey grafiğine göre bu iki değişkenin deneysel seviyeleri en yüksek cevap değerinin alındığı; hareketli fazın polaritesi için 7.00; akış hızı için ise 3.34 mL/dk olarak seçilmiştir.



Şekil 6. 57. Sterol türlerinin ayrımında hareketli fazın polarite ve kolon fırını sıcaklığı parametrelerinin optimizasyonu için oluşturulan yüzey grafiği

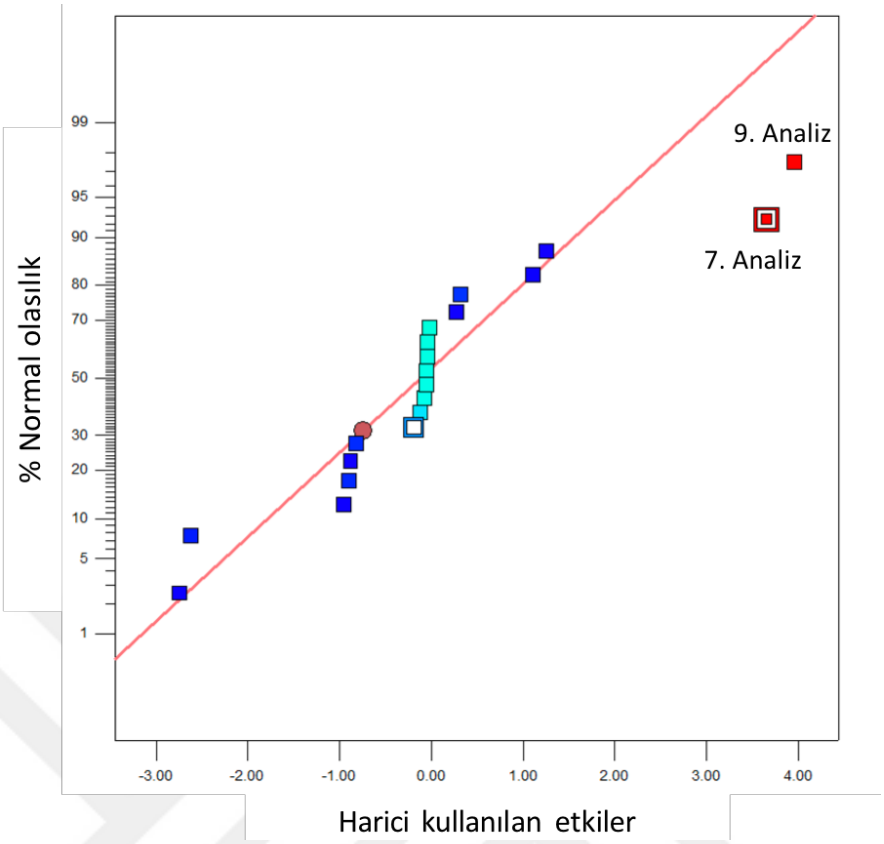
Şekil 6.57, sterol türlerinin ayrımında hareketli fazın polarite ve kolon fırını sıcaklığı kodlanmış değerlerinin kampesterol ve β-sitosterol türlerinin ayrımına olan etkisini göstermektedir. Şekil 6.56'da verilen yüzey grafiğinde olduğu gibi hareketli fazın polaritesi 7.00 değerine yaklaştıkça kampesterol ve β-sitosterol türlerinin R_s değeri 3.60'ya yaklaşmış; polarite 7.00 değerinden uzaklaştıkça R_s değeri 3.60'dan uzaklaşmıştır. Kolon fırını sıcaklığı ise R_s değeri ile doğru orantılı olarak artmıştır. Daha yüksek sıcaklıklarda R_s değeri 3.60'ya yaklaşmıştır. Şekil 6.56'da verilen yüzey grafiğine göre bu iki değişkenin deneysel seviyeleri en yüksek cevap değerinin alındığı; hareketli fazın polaritesi için 7.00; kolon fırını sıcaklığı için ise 38.41 ^oC olarak seçilmiştir.



Şekil 6. 58. Sterol türlerinin ayrımında hareketli fazın akış hızı ve kolon fırını sıcaklığı parametrelerinin optimizasyonu için oluşturulan yüzey grafiği

Şekil 6.58, sterol türlerinin ayrımında hareketli fazın akış hızı ve kolon fırını sıcaklığı kodlanmış değerlerinin kampesterol ve β-sitosterol türlerinin ayrımına olan etkisini göstermektedir. Şekil 6.58'de hareketli fazın akış hızı ve kolon fırını sıcaklığı R_s değeri ile doğru orantılı olarak artmıştır. Şekil 6.58'de verilen yüzey grafiğine göre bu iki değişkenin deneysel seviyeleri en yüksek cevap değerinin alındığı; hareketli fazın akış hızı için 3.34 mL/dk; kolon fırını sıcaklığı için ise 38.41 ^oC olarak seçilmiştir.

3 yüzey grafiği (Şekil 6.56, Şekil 6.57, Şekil 6.58) birlikte değerlendirildiğinde, sterol türlerinin monolitik kolonla ayrımında kullanılacak olan parametrelerin optimum değerleri hareketli fazın polaritesi için 7.00; hareketli fazın akış hızı için 3.34 mL/dk ve kolon fırını sıcaklığı için ise 38.41 ^oC olarak tespit edilmiştir.



Şekil 6. 59. Sterol türlerinin ayrımında kullanılan deneysel tasarımların cevap değerine olan tesirini gösteren normal dağılım grafiği

Denklem 6.2'deki polinomal quadratik model kullanılarak, sterol türlerinin ayrımında kullanılan deneysel tasarımların cevap değerine olan tesirini gösteren normal dağılım grafiği Şekil 6.59'da verilmiştir. İlgili şekil incelendiğinde, cevap değerine en anlamlı etkinin Çizelge 6.31'de verilen 7 ve 9 numaralı deneysel tasarımlardan geldiği tespit edilmiştir. Çizelge 6.31 incelendiğinde en büyük iki cevap değerinin de 7 (Y: 10.309) ve 9 (Y: 10.033) numaralı deneysel tasarımlara ait olduğu görülmüştür. 7 ve 9 numaralı deneysel tasarımlar incelendiğinde her ikisinin de ortak noktasının hareketli faz polarite değerleri (P': 7.00) olduğu görülmüştür. Bu nedenle de cevap değerine en anlamlı etkinin hareketli fazın polaritesindeki değişimlerden ileri geldiği düşünülmektedir. Bu durumda elde edilen normal dağılım grafiği, kullanılan deneysel tasarımdan elde edilen verileri ve yüzey grafikleri ile yapılan yorumlamaları doğrular nitelikte olmuştur.

Gerçekleştirilen deneysel tasarım, elde edilen yüzey grafikleri ve normal dağılım grafiği incelendiğinde, sterol türlerinin monolitik kolon kullanılarak ayrımının gerçekleştirilebilmesi için kullanılması gereken optimum değerlerin en büyük cevap değerini veren 7 numaralı deneysel tasarımın sahip olduğu değerler olduğu tespit

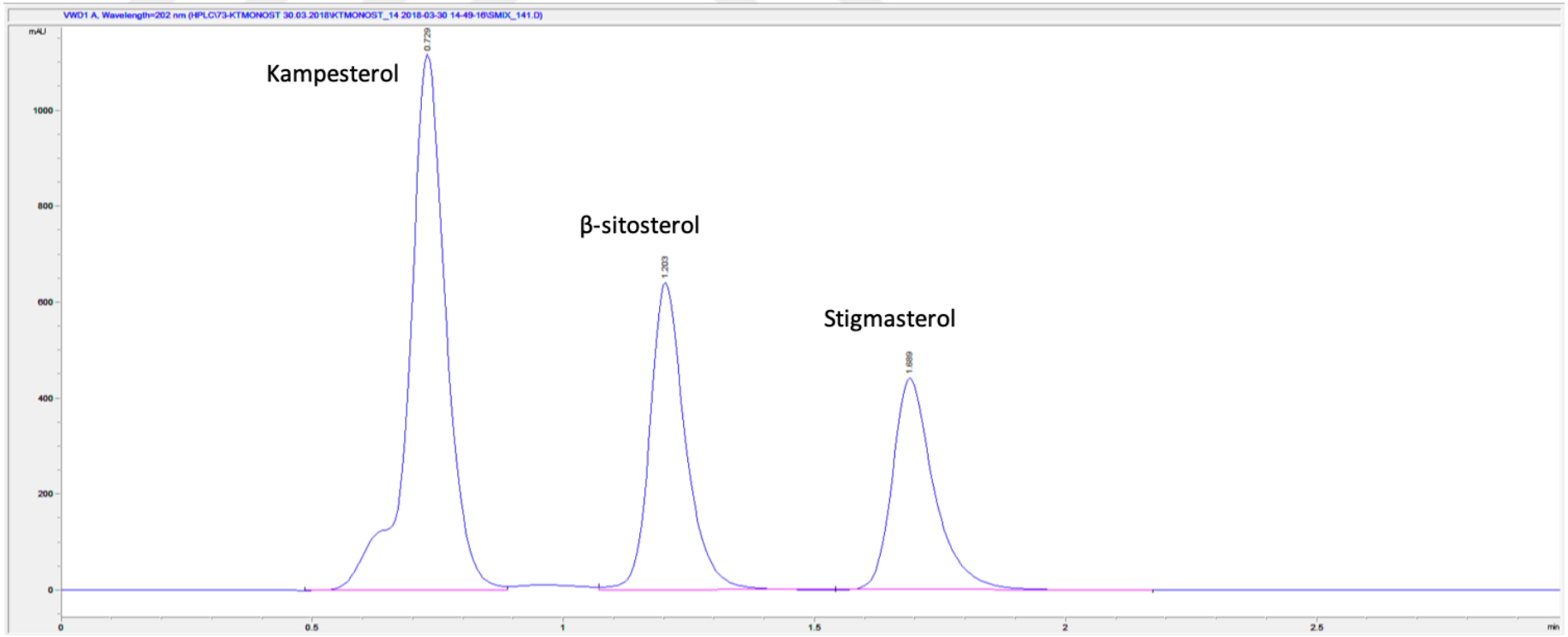
edilmiştir. Bu değerler hareketli fazın polaritesi için 7.00; hareketli fazın akış hızı için 3.34 mL/dk ve kolon fırını sıcaklığı için 30 ^{o}C'dir. Fakat yüksek akış hızları daha çok kimyasal atığa yol açacağı ve analiz maliyetlerini de arttıracağı için hemen hemen aynı yükseklikte cevap değeri veren ve daha düşük bir akış hızına sahip olan 9 numaralı deneysel tasarım, sterol türlerinin ayrımı için seçilmiştir. Bu tasarımın şartları, sterol türlerinin monolitik kolonla ayrımı için optimum şartlar olarak seçilmiş ve Çizelge 6.32'de verilmiştir.

Çizelge 6. 32. Sterol türlerinin monolitik kolonla ayrımı için tespit edilen optimum kromatografik şartlar

Sabit Faz (Kolon)	Merck Chromolith Performance RP-18 100mmx4.6mm Monolitik kolon
Hareketli Faz	%63Metanol-%37Su
Hareketli Faz Polaritesi	7.00
Hareketli Faz Akış Hızı (mL/dk)	2.50
Dedeksiyon	UV-VIS 202 nm
Analiz Süresi (dk)	2
Enjeksiyon Miktarı (µL)	20
Kolon Fırını Sıcaklığı (^{o}C)	38.41
Ulaşılan Kolon Basıncı (Bar)	85

Çizelge 6.32'de verilen kromatografik şartlarda analizi yapılan 3 sterol türünün (kampesterol, β-sitosterol ve stigmasterol) analizinden elde edilen kromatogram Şekil 6.60'da verilmiştir.

Şekil 6.60'da verilmiş olan, sterol türlerinin monolitik kolon kullanarak gerçekleştirilen optimum ayrımında kampesterol ve β-sitosterol türleri için R_s değerinin 3.70 olduğu tespit edilmiştir. İlgili şekilden de görüleceği üzere sterol türlerinin monolitik kolon kullanılarak istenilen düzeyde bir R_s değeri ile ve 2 dk gibi bir kısa zamanda kromatografik olarak ayrımı başarılmıştır.



Şekil 6. 60. Sterol türlerinin monolitik kolon kullanılarak optimum şartlarda gerçekleştirilen analizinin kromatogramı

6.3.2.3. Tokotrienol türlerinin ayrımı için kullanılan deneysel tasarım

Tokotrienol türlerinin monolitik kolon kullanarak tayini için bazı ön denemeler gerçekleştirilmiş ve sterol türlerinde olduğu gibi hareketli fazdaki su oranı arttıkça tokotrienol türlerinin birbirinden daha da iyi ayrılabileceği tespit edilmiştir. Bu amaçla yapılan ön demeler sonucunda R_s değerinin 3.69 olduğu denemede kullanılan hareketli fazın polaritesi (P': 6.00), tokotrienol türlerinin tayini için oluşturulacak olan kemometrik tasarımda orta seviye (0) değeri olarak seçilmiştir.

Sterol türlerinin tayini için parametrelerin optimizasyonu yapıldıktan sonra monolitik kolon kullanarak 3 tokotrienol türünün (α, β+γ ve δ) kantitatif olarak tayini için, hareketli faz polaritesi (P'), hareketli faz akış hızı (mL/dk) ve kolon fırını sıcaklığı (^oC) parametrelerinin optimum değerlerinin tespiti Çizelge 5.21'de verilen seviye değerleri ve Çizelge 5.22'de verilen deneysel tasarım kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 5.22'de bulunan her bir deneysel şartlarda, 3 tokotrienol türünü içeren (α, β+γ ve δ) standart bir karışım sisteme ardı ardına 3 kez enjekte edilmiştir. δ ve β+γ türlerinin ayrımından elde edilen R_s değeri, Denklem 5.12'ye göre işleme alınmış ve her bir deneysel tasarım için cevap değeri (Y) oluşturulmuştur. Tokotrienol türlerinin kromatografik ayrım parametrelerinin tayini için kullanılacak olan yüzey grafiklerinin elde edilmesinde kullanılan bağımsız değişkenlerin seviyeleri ve elde edilen cevap değerleri Çizelge 6.34'de verilmiştir.

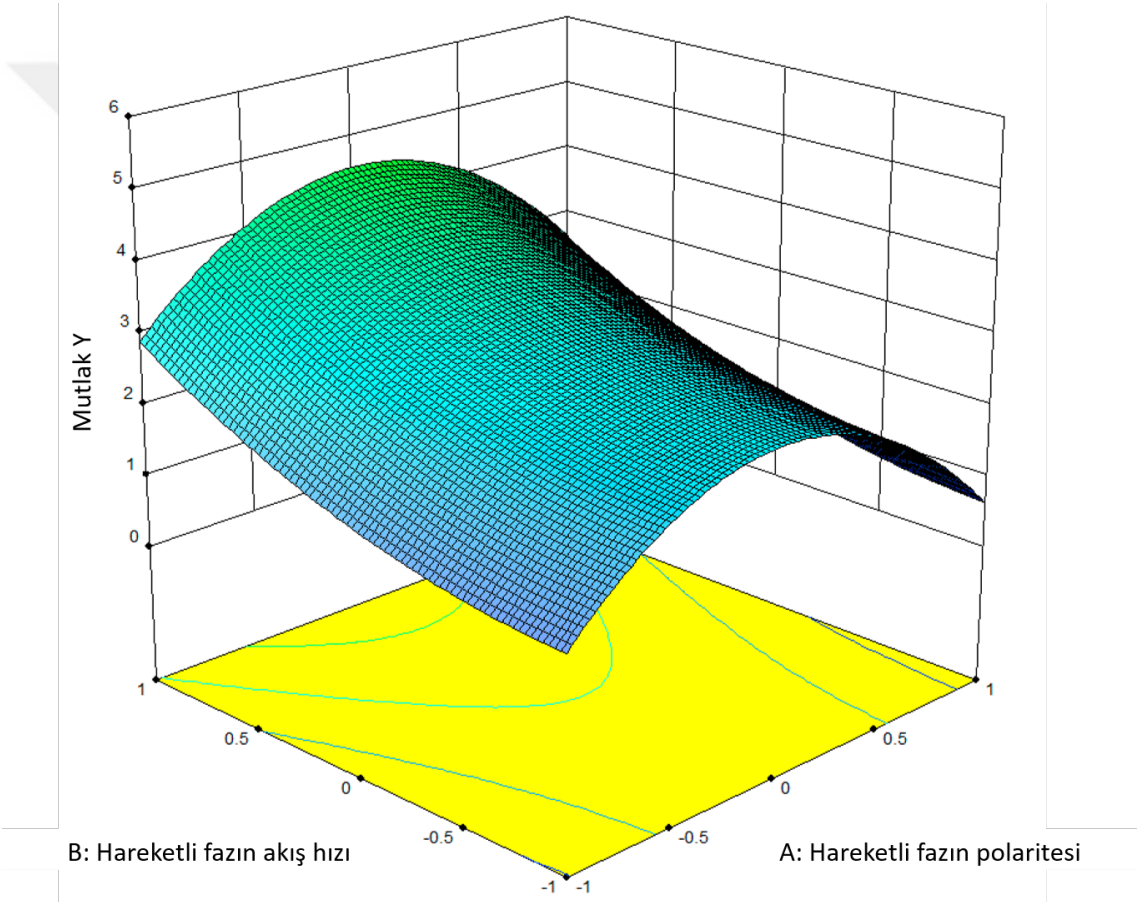
Çizelge 6. 33. Tokotrienol türlerinin kromatografik ayrım parametrelerinin tayini için kullanılacak olan yüzey grafiklerinin elde edilmesinde kullanılan bağımsız değişkenlerin seviyeleri ve elde edilen cevap değerleri

Analiz Sırası	Bağımsız Değişkenler						Y (Cevap Değeri)
	A (Hareketli faz polaritesi (P'))	Seviyesi	B (Hareketli faz akış hızı (mL/dk))	Seviyesi	C (Kolon fırını sıcaklığı (°C))	Seviyesi	
1	5.16	-1.68179	2.50	0	30.00	0	0.443
2	5.50	-1	2.00	-1	25.00	-1	0.777
3	5.50	-1	2.00	-1	35.00	1	0.681
4	5.50	-1	3.00	1	25.00	-1	0.710
5	5.50	-1	3.00	1	35.00	1	0.608
6	6.00	0	1.66	-1.68179	30.00	0	2.431
7	6.00	0	3.34	1.68179	30.00	0	10.638
8	6.00	0	2.50	0	21.59	-1.68179	1.626
9	6.00	0	2.50	0	38.41	1.68179	10.309
10	6.00	0	2.50	0	30.00	0	2.976
11	6.00	0	2.50	0	30.00	0	3.006
12	6.00	0	2.50	0	30.00	0	3.012
13	6.00	0	2.50	0	30.00	0	2.970
14	6.00	0	2.50	0	30.00	0	3.067
15	6.00	0	2.50	0	30.00	0	2.953
16	6.50	1	2.00	-1	25.00	-1	0.257
17	6.50	1	2.00	-1	35.00	1	0.346
18	6.50	1	3.00	1	35.00	1	0.358
19	6.50	1	3.00	1	25.00	-1	0.283
20	6.84	1.68179	2.50	0	30.00	0	0.177

Çizelge 6.34'deki değişkenlerin seviye ve cevap değerleri kullanılarak Morgan'a göre (Morgan 1991) quadratik polinomal model eşitliği hesaplanmış ve Denklem 6.3'de verilmiştir.

$$Y = 3.1215 - 0.144935A + 1.00319B + 1.06679C + 0.02225AB + 0.04525AC - 0.0025BC - 1.76159A^2 + 0.439104B^2 + 0.238639C^2 \quad (6.3)$$

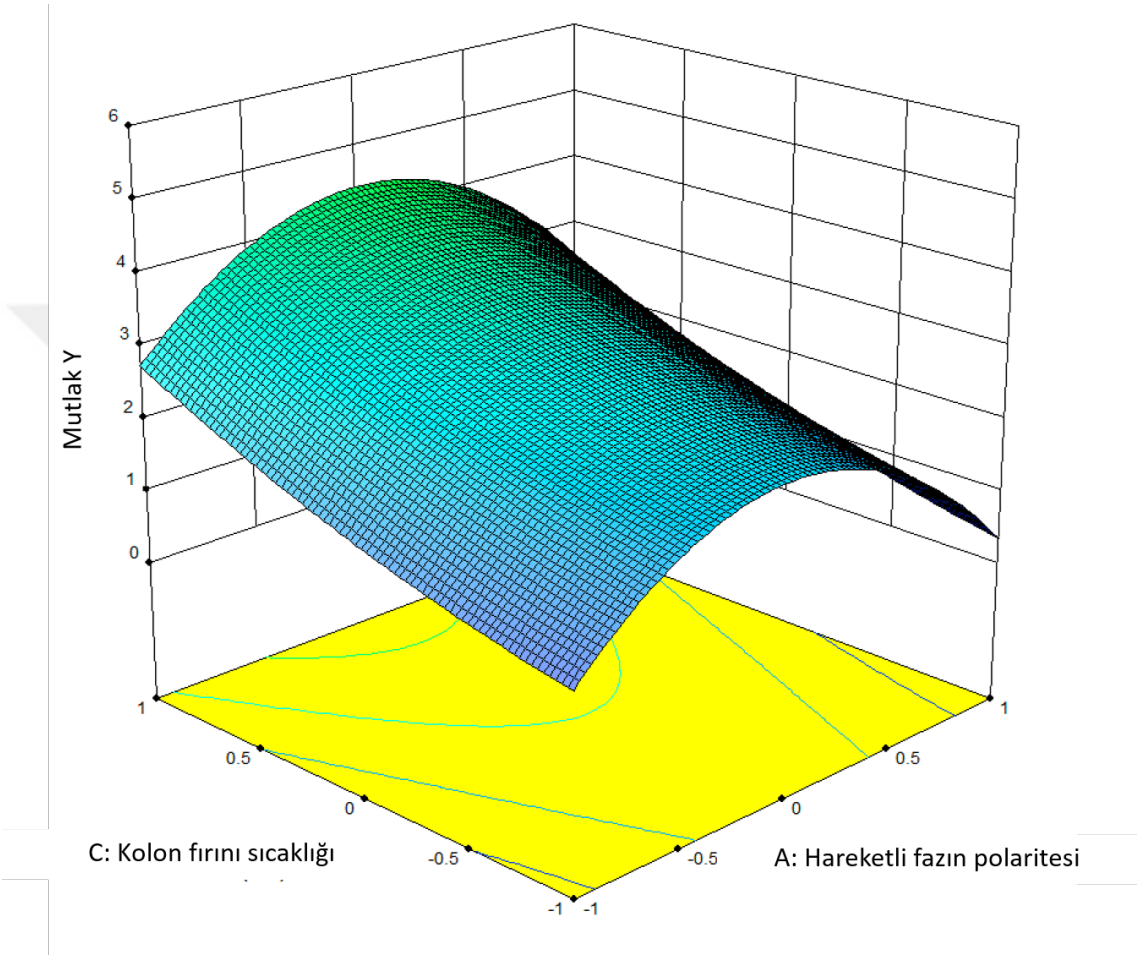
Cevap değerleri ile bağımsız değişkenlerin seviyeleri arasındaki ilişkiyi görselleştiren ve bu sayede değişkenlerin optimum noktalarının tespitini mümkün kılan yüzey grafikleri, Denklem 6.3'deki polinomal quadratik model kullanılarak çizdirilmiştir. Hareketli fazın polaritesi-hareketli fazın akış hızı, Hareketli fazın polaritesi-kolon fırını sıcaklığı ve hareketli fazın akış hızı-kolon fırını sıcaklığı etkileşimlerini gösteren ikili yüzey grafikleri aşağıda verilmiştir (Şekil 6.61, Şekil 6.62, Şekil 6.63).



Şekil 6. 61. Tokotrienol türlerinin ayrımında hareketli fazın polarite ve akış hızı parametrelerinin optimizasyonu için oluşturulan yüzey grafiği

Şekil 6.61, tokotrienol türlerinin ayrımında hareketli fazın polarite ve akış hızı kodlanmış değerlerinin δ ve β+γ türlerinin ayrımına olan etkisini göstermektedir. Hareketli fazın polaritesi 6.00 değerine yaklaştıkça δ ve β+γ türlerinin R_s değeri 3.60'ya

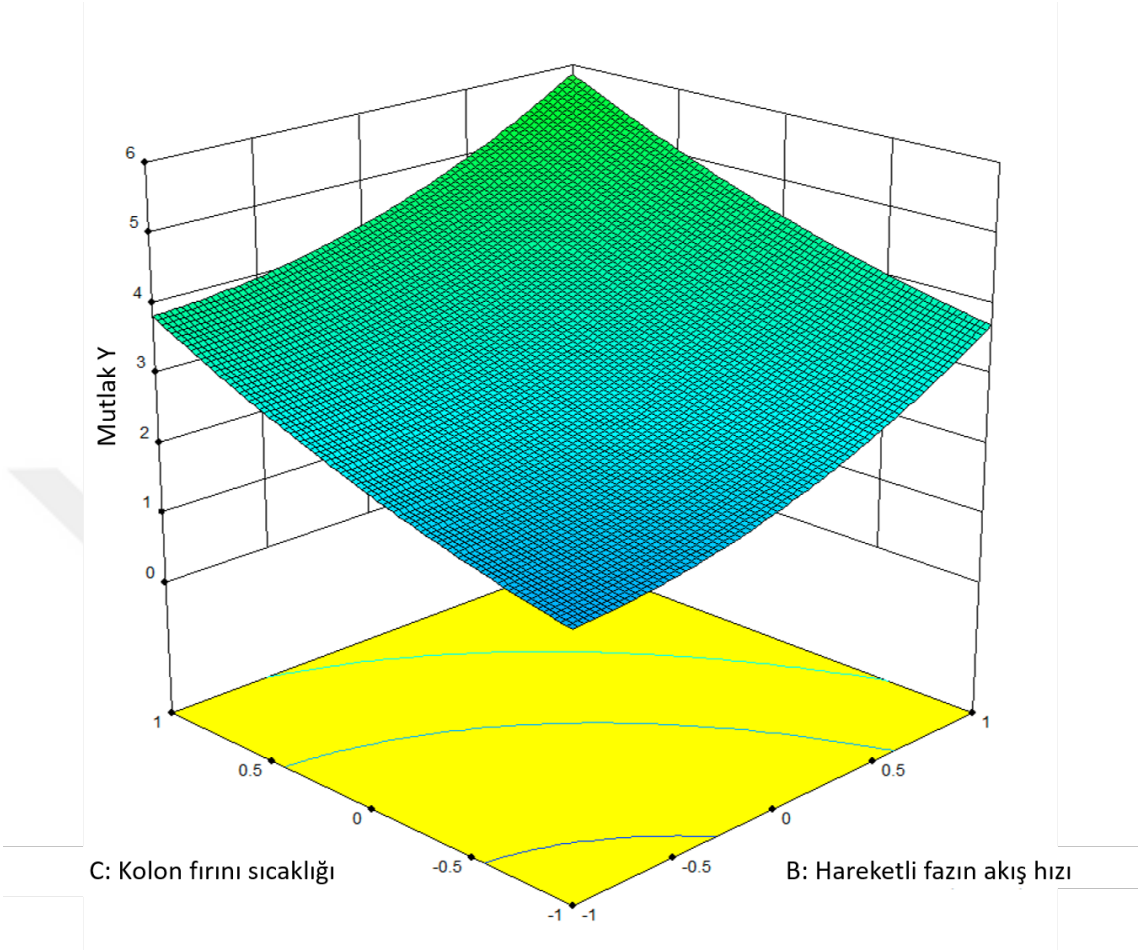
yaklaşmış; polarite 6.00 değerinden uzaklaştıkça R_s değeri 3.60'dan uzaklaşmıştır. Hareketli fazın akış hızı ise R_s değeri ile doğru orantılı olarak artmıştır. Daha yüksek akış hızlarında R_s değeri 3.60'ya yaklaşmıştır. Şekil 6.61'de verilen yüzey grafiğine göre bu iki değişkenin deneysel seviyeleri en yüksek cevap değerinin alındığı; hareketli fazın polaritesi için 6.00; akış hızı için ise 3.34 mL/dk olarak seçilmiştir.



Şekil 6. 62. Tokotrienol türlerinin ayrımında hareketli fazın polarite ve kolon fırını sıcaklığı parametrelerinin optimizasyonu için oluşturulan yüzey grafiği

Şekil 6.62, tokotrienol türlerinin ayrımında hareketli fazın polarite ve kolon fırını sıcaklığı kodlanmış değerlerinin δ ve β+γ türlerinin ayrımına olan etkisini göstermektedir. Şekil 6.61'de verilen yüzey grafiğinde olduğu gibi hareketli fazın polaritesi 6.00 değerine yaklaştıkça δ ve β+γ türlerinin R_s değeri 3.60'ya yaklaşmış; polarite 6.00 değerinden uzaklaştıkça R_s değeri 3.60'dan uzaklaşmıştır. Kolon fırını sıcaklığı ise R_s değeri ile doğru orantılı olarak artmıştır. Daha yüksek sıcaklıklarda R_s değeri 3.60'ya yaklaşmıştır. Şekil 6.62'de verilen yüzey grafiğine göre bu iki değişkenin deneysel seviyeleri en

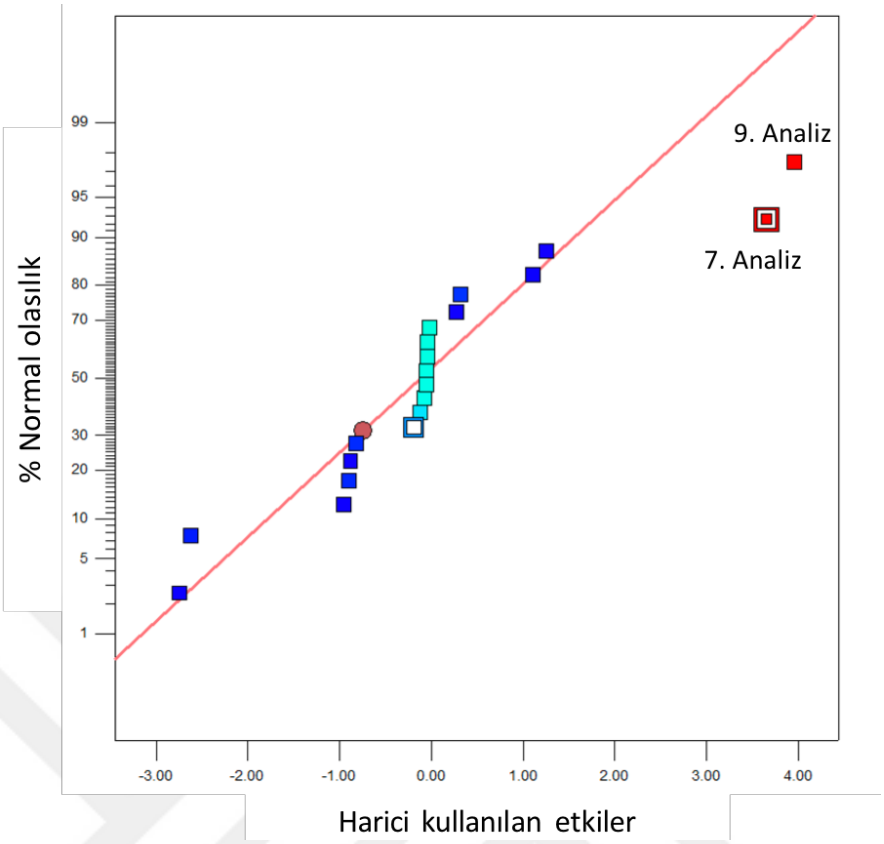
yüksek cevap değerinin alındığı; hareketli fazın polaritesi için 6.00; kolon fırını sıcaklığı için ise 38.41 ºC olarak seçilmiştir.



Şekil 6. 63. Tokotrienol türlerinin ayrımında hareketli fazın akış hızı ve kolon fırını sıcaklığı parametrelerinin optimizasyonu için oluşturulan yüzey grafiği

Şekil 6.63, tokotrienol türlerinin ayrımında hareketli fazın akış hızı ve kolon fırını sıcaklığı kodlanmış değerlerinin δ ve β+γ türlerinin ayrımına olan etkisini göstermektedir. Şekil 6.63'de hareketli fazın akış hızı ve kolon fırını sıcaklığı R_s değeri ile doğru orantılı olarak artmıştır. Şekil 6.63'de verilen yüzey grafiğine göre bu iki değişkenin deneysel seviyeleri en yüksek cevap değerinin alındığı; hareketli fazın akış hızı için 3.34 mL/dk; kolon fırını sıcaklığı için ise 38.41 ºC olarak seçilmiştir.

3 yüzey grafiği (Şekil 6.61, Şekil 6.62, Şekil 6.63) birlikte değerlendirildiğinde, tokotrienol türlerinin monolitik kolonla ayrımında kullanılacak olan parametrelerin optimum değerleri hareketli fazın polaritesi için 6.00; hareketli fazın akış hızı için 3.34 mL/dk ve kolon fırını sıcaklığı için ise 38.41 ºC olarak tespit edilmiştir.



Şekil 6. 64. Tokotrienol türlerinin ayrımında kullanılan deneysel tasarımların cevap değerine olan tesirini gösteren normal dağılım grafiği

Denklem 6.3'deki polinomal quadratik model kullanılarak, tokotrienol türlerinin ayrımında kullanılan deneysel tasarımların cevap değerine olan tesirini gösteren normal dağılım grafiği Şekil 6.64'de verilmiştir. İlgili şekil incelendiğinde, cevap değerine en anlamlı etkinin Çizelge 6.33'de verilen 7 ve 9 numaralı deneysel tasarımlardan geldiği tespit edilmiştir. Çizelge 6.33 incelendiğinde en büyük iki cevap değerinin sterol analizinde olduğu gibi 7 (Y: 10.638) ve 9 (Y: 10.309) numaralı deneysel tasarımlara ait olduğu görülmüştür. 7 ve 9 numaralı deneysel tasarımlar incelendiğinde her ikisinin de ortak noktasının hareketli faz polarite değerleri (P': 6.00) olduğu görülmüştür. Bu nedenle de cevap değerine en anlamlı etkinin hareketli fazın polaritesindeki değişimlerden ileri geldiği düşünülmektedir. Bu durumda elde edilen normal dağılım grafiği, kullanılan deneysel tasarımdan elde edilen verileri ve yüzey grafikleri ile yapılan yorumlamaları doğrular nitelikte olmuştur.

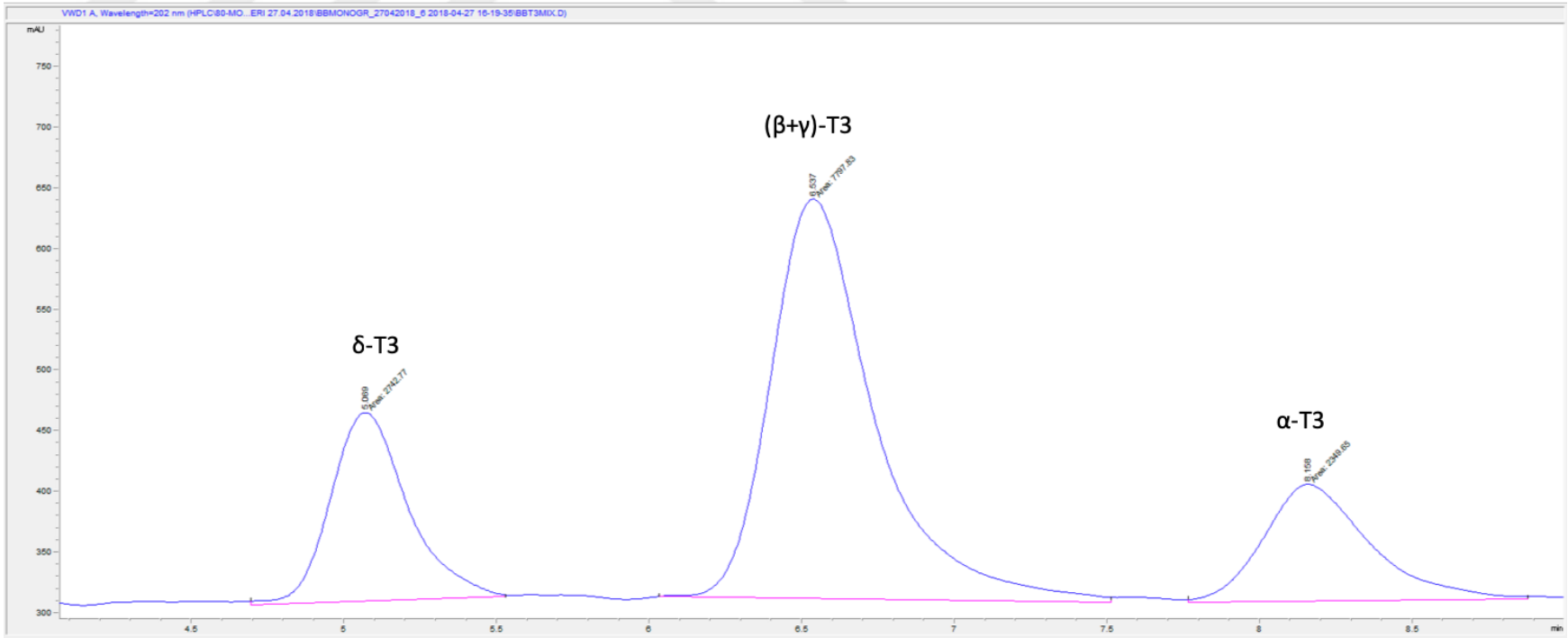
Gerçekleştirilen deneysel tasarım, elde edilen yüzey grafikleri ve normal dağılım grafiği incelendiğinde, tokotrienol türlerinin monolitik kolon kullanılarak ayrımının gerçekleştirilebilmesi için kullanılması gereken optimum değerlerin en büyük cevap

değerini veren 7 numaralı deneysel tasarımın sahip olduğu değerler olduğu tespit edilmiştir. Bu değerler hareketli fazın polaritesi için 6.00; hareketli fazın akış hızı için 3.34 mL/dk ve kolon fırını sıcaklığı için 30 ºC'dir. Fakat yüksek akış hızları daha çok kimyasal atığa yol açacağı ve analiz maliyetlerini de arttıracağı için hemen hemen aynı yükseklikte cevap değeri veren ve daha düşük bir akış hızına sahip olan 9 numaralı deneysel tasarım, tokotrienol türlerinin ayrımı için seçilmiştir. Bu tasarımın şartları, tokotrienol türlerinin monolitik kolonla ayrımı için optimum şartlar olarak seçilmiş ve Çizelge 6.34'de verilmiştir.

Çizelge 6. 34. Tokotrienol türlerinin monolitik kolonla ayrımı için tespit edilen optimum kromatografik şartlar

Sabit Faz (Kolon)	Merck Chromolith Performance RP-18 100mmx4.6mm Monolitik kolon
Hareketli Faz	%82Metanol-%18Su
Hareketli Faz Polaritesi	6.00
Hareketli Faz Akış Hızı (mL/dk)	2.50
Dedeksiyon	UV-VIS 202 nm
Analiz Süresi (dk)	5
Enjeksiyon Miktarı (µL)	20
Kolon Fırını Sıcaklığı (ºC)	38.41
Ulaşılan Kolon Basıncı (Bar)	68

Çizelge 6.34'de verilen kromatografik şartlarda analizi yapılan 3 tokotrienol türünün (α, β+γ ve δ) analizinden elde edilen kromatogram Şekil 6.65'de verilmiştir.



Şekil 6. 65. Tokotrienol türlerinin monolitik kolon kullanılarak optimum şartlarda gerçekleştirilen analizinin kromatogramı (δ-T3: Sigma tokotrienol, (β+γ)-T3: Beta+gama tokotrienol, α-T3: Alfa tokotrienol)

Şekil 6.65'de verilmiş olan, tokotrienol türlerinin monolitik kolon kullanarak gerçekleştirilen optimum ayrımında δ ve β+γ türleri için R_s değerinin 3.69 olduğu tespit edilmiştir. İlgili şekilden de görüleceği üzere tokotrienol türlerinin monolitik kolon kullanılarak istenilen düzeyde bir R_s değeri ile ve 5 dk gibi bir kısa zamanda kromatografik olarak ayrımı başarılmıştır.

6.3.2.4. Tokoferol türlerinin ayrımı için kullanılan deneysel tasarım

Tokoferol türlerinin monolitik kolon kullanarak tayini için bazı ön denemeler gerçekleştirilmiş ve tokotrienol türlerinde olduğu gibi hareketli fazdaki su oranı arttıkça tokoferol türlerinin birbirinden daha da iyi ayrılabileceği tespit edilmiştir. Bu amaçla yapılan ön demeler sonucunda R_s değerinin 3.70 olduğu denemede kullanılan hareketli fazın polaritesi (P': 5.70), tokoferol türlerinin tayini için oluşturulacak olan kemometrik tasarımda orta seviye (0) değeri olarak seçilmiştir.

Tokotrienol türlerinin tayini için parametrelerin optimizasyonu yapıldıktan sonra monolitik kolon kullanarak 3 tokoferol türünün (α, β+γ ve δ) kantitatif olarak tayini için, hareketli faz polaritesi (P'), hareketli faz akış hızı (mL/dk) ve kolon fırını sıcaklığı (^oC) parametrelerinin optimum değerlerinin tespiti Çizelge 5.23'te verilen seviye değerleri ve Çizelge 5.24'de verilen deneysel tasarım kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 5.24'de bulunan her bir deneysel şartlarda, 3 tokoferol türünü içeren (α, β+γ ve δ) standart bir karışım sisteme ardı ardına 3 kez enjekte edilmiştir. δ ve β+γ türlerinin ayrımından elde edilen R_s değeri, Denklem 5.12'ye göre işleme alınmış ve her bir deneysel tasarım için cevap değeri (Y) oluşturulmuştur. Tokoferol türlerinin kromatografik ayrım parametrelerinin tayini için kullanılacak olan yüzey grafiklerinin elde edilmesinde kullanılan bağımsız değişkenlerin seviyeleri ve elde edilen cevap değerleri Çizelge 6.35'de verilmiştir.

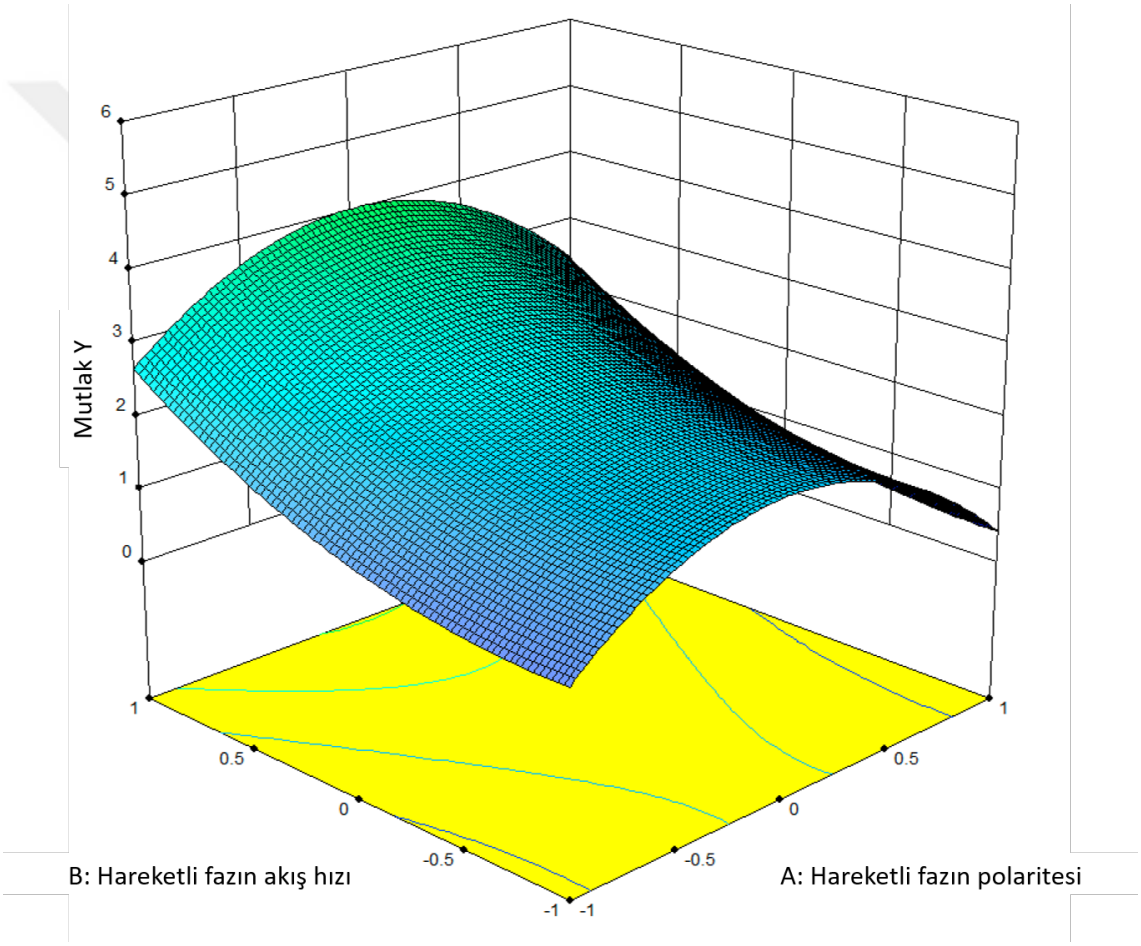
Çizelge 6. 35. Tokoferol türlerinin kromatografik ayrım parametrelerinin tayini için kullanılacak olan yüzey grafiklerinin elde edilmesinde kullanılan bağımsız değişkenlerin seviyeleri ve elde edilen cevap değerleri

Analiz Sırası	Bağımsız Değişkenler						Y (Cevap Değeri)
	A (Hareketli faz polaritesi (P'))	Seviyesi	B (Hareketli faz akış hızı (mL/dk))	Seviyesi	C (Kolon fırını sıcaklığı (°C))	Seviyesi	
1	4.86	-1.68179	2.50	0	30.00	0	0.443
2	5.20	-1	2.00	-1	25.00	-1	0.727
3	5.20	-1	2.00	-1	35.00	1	0.736
4	5.20	-1	3.00	1	25.00	-1	0.663
5	5.20	-1	3.00	1	35.00	1	0.610
6	5.70	0	1.66	-1.68179	30.00	0	1.979
7	5.70	0	3.34	1.68179	30.00	0	10.101
8	5.70	0	2.50	0	21.59	-1.68179	1.609
9	5.70	0	2.50	0	38.41	1.68179	9,202
10	5.70	0	2.50	0	30.00	0	2.486
11	5.70	0	2.50	0	30.00	0	2.427
12	5.70	0	2.50	0	30.00	0	2.392
13	5.70	0	2.50	0	30.00	0	2.417
14	5.70	0	2.50	0	30.00	0	2.400
15	5.70	0	2.50	0	30.00	0	2.419
16	6.20	1	2.00	-1	25.00	-1	0.272
17	6.20	1	2.00	-1	35.00	1	0.333
18	6.20	1	3.00	1	35.00	1	0.374
19	6.20	1	3.00	1	25.00	-1	0.291
20	6.54	1.68179	2.50	0	30.00	0	0.176

Çizelge 6.35'deki değişkenlerin seviye ve cevap değerleri kullanılarak Morgan'a göre (Morgan 1991) quadratik polinomal model eşitliği hesaplanmış ve Denklem 6.4'de verilmiştir.

$$Y= 2.53678 - 0.140225A + 0.990676B + 0.942373C + 0.03125AB + 0.0235AC - 0.005BC - 1.48774A^2 + 0.538299B^2 + 0.313969C^2 \quad (6.4)$$

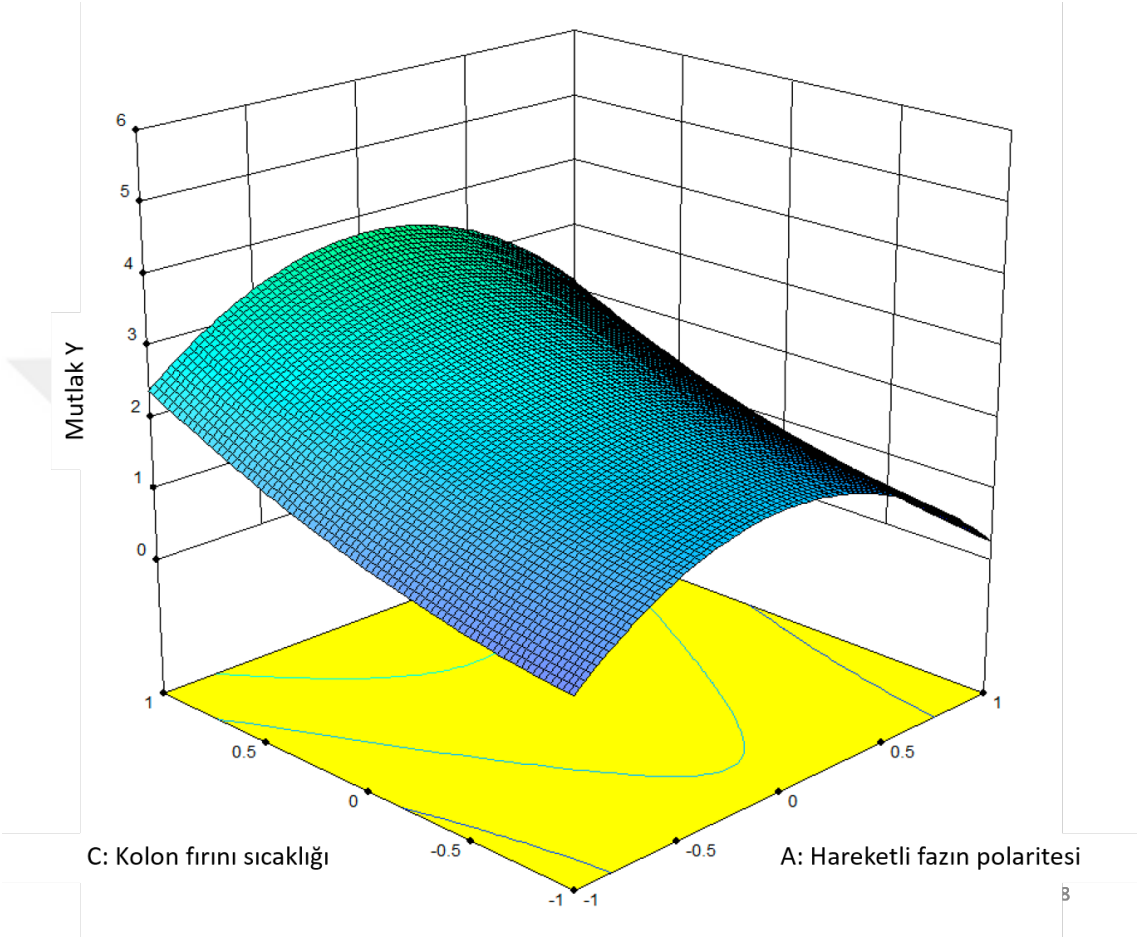
Cevap değerleri ile bağımsız değişkenlerin seviyeleri arasındaki ilişkiyi görselleştiren ve bu sayede değişkenlerin optimum noktalarının tespitini mümkün kılan yüzey grafikleri, Denklem 6.4'deki polinomal quadratik model kullanılarak çizdirilmiştir. Hareketli fazın polaritesi-hareketli fazın akış hızı, Hareketli fazın polaritesi-kolon fırını sıcaklığı ve hareketli fazın akış hızı-kolon fırını sıcaklığı etkileşimlerini gösteren ikili yüzey grafikleri aşağıda verilmiştir (Şekil 6.66, Şekil 6.67, Şekil 6.68).



Şekil 6. 66. Tokoferol türlerinin ayrımında hareketli fazın polarite ve akış hızı parametrelerinin optimizasyonu için oluşturulan yüzey grafiği

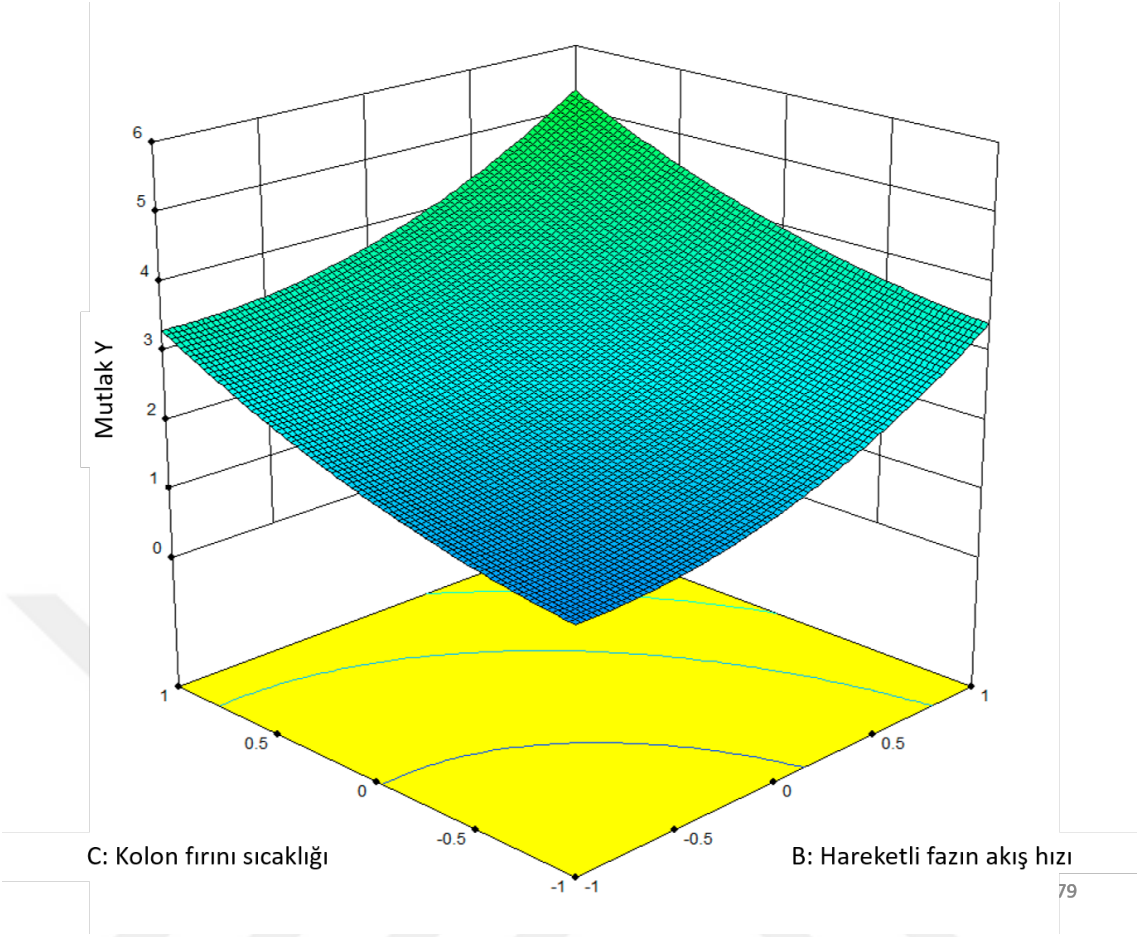
Şekil 6.66, tokoferol türlerinin ayrımında hareketli fazın polarite ve akış hızı kodlanmış değerlerinin δ ve β+γ türlerinin ayrımına olan etkisini göstermektedir. Hareketli fazın polaritesi 5.70 değerine yaklaştıkça δ ve β+γ türlerinin R_s değeri 3.60'ya yaklaşmış; polarite 5.70 değerinden uzaklaştıkça R_s değeri 3.60'dan uzaklaşmıştır.

Hareketli fazın akış hızı ise R_s değeri ile doğru orantılı olarak artmıştır. Daha yüksek akış hızlarında R_s değeri 3.60'ya yaklaşmıştır. Şekil 6.66'da verilen yüzey grafiğine göre bu iki değişkenin deneysel seviyeleri en yüksek cevap değerinin alındığı; hareketli fazın polaritesi için 5.70; akış hızı için ise 3.34 mL/dk olarak seçilmiştir.



Şekil 6. 67. Tokoferol türlerinin ayrımında hareketli fazın polarite ve kolon fırını sıcaklığı parametrelerinin optimizasyonu için oluşturulan yüzey grafiği

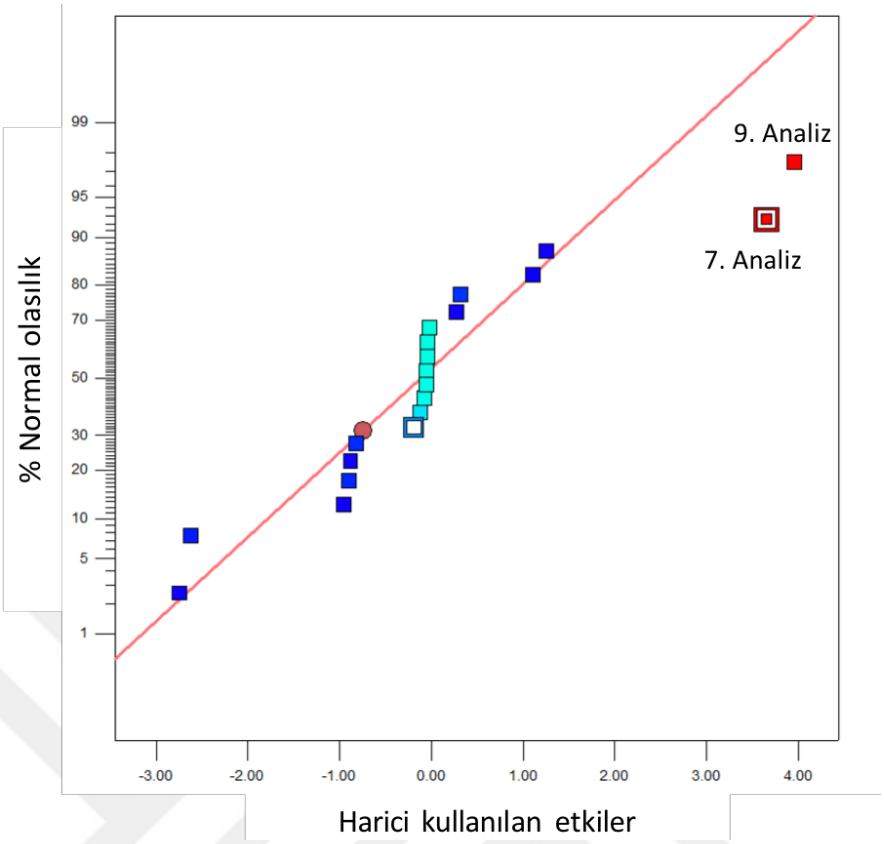
Şekil 6.67, tokoferol türlerinin ayrımında hareketli fazın polarite ve kolon fırını sıcaklığı kodlanmış değerlerinin δ ve β+γ türlerinin ayrımına olan etkisini göstermektedir. Şekil 6.66'da verilen yüzey grafiğinde olduğu gibi hareketli fazın polaritesi 5.70 değerine yaklaştıkça δ ve β+γ türlerinin R_s değeri 3.60'ya yaklaşmış; polarite 5.70 değerinden uzaklaştıkça R_s değeri 3.60'dan uzaklaşmıştır. Kolon fırını sıcaklığı ise R_s değeri ile doğru orantılı olarak artmıştır. Daha yüksek sıcaklıklarda R_s değeri 3.60'ya yaklaşmıştır. Şekil 6.67'de verilen yüzey grafiğine göre bu iki değişkenin deneysel seviyeleri en yüksek cevap değerinin alındığı; hareketli fazın polaritesi için 5.70; kolon fırını sıcaklığı için ise 38.41 ^oC olarak seçilmiştir.



Şekil 6. 68. Tokoferol türlerinin ayrımında hareketli fazın akış hızı ve kolon fırını sıcaklığı parametrelerinin optimizasyonu için oluşturulan yüzey grafiği

Şekil 6.68, tokoferol türlerinin ayrımında hareketli fazın akış hızı ve kolon fırını sıcaklığı kodlanmış değerlerinin δ ve β+γ türlerinin ayrımına olan etkisini göstermektedir. Şekil 6.68'de hareketli fazın akış hızı ve kolon fırını sıcaklığı R_s değeri ile doğru orantılı olarak artmıştır. Şekil 6.70'de verilen yüzey grafiğine göre bu iki değişkenin deneysel seviyeleri en yüksek cevap değerinin alındığı; hareketli fazın akış hızı için 3.34 mL/dk; kolon fırını sıcaklığı için ise 38.41 ^oC olarak seçilmiştir.

3 yüzey grafiği (Şekil 6.66, Şekil 6.67, Şekil 6.68) birlikte değerlendirildiğinde, tokoferol türlerinin monolitik kolonla ayrımında kullanılacak olan parametrelerin optimum değerleri hareketli fazın polaritesi için 5.70; hareketli fazın akış hızı için 3.34 mL/dk ve kolon fırını sıcaklığı için ise 38.41 ^oC olarak tespit edilmiştir.



Şekil 6. 69. Tokoferol türlerinin ayrımında kullanılan deneysel tasarımların cevap değerine olan tesirini gösteren normal dağılım grafiği

Denklem 6.4'deki polinomal quadratik model kullanılarak, tokoferol türlerinin ayrımında kullanılan deneysel tasarımların cevap değerine olan tesirini gösteren normal dağılım grafiği Şekil 6.69'da verilmiştir. İlgili şekil incelendiğinde, cevap değerine en anlamlı etkinin Çizelge 6.35'de verilen 7 ve 9 numaralı deneysel tasarımlardan geldiği tespit edilmiştir. Çizelge 6.35 incelendiğinde en büyük iki cevap değerinin de 7 (Y: 10.101) ve 9 (Y: 9,202) numaralı deneysel tasarımlara ait olduğu görülmüştür. 7 ve 9 numaralı deneysel tasarımlar incelendiğinde her ikisinin de ortak noktasının hareketli faz polarite değerleri (P': 5.70) olduğu görülmüştür. Bu nedenle de cevap değerine en anlamlı etkinin hareketli fazın polaritesindeki değişimlerden ileri geldiği düşünülmektedir. Bu durumda elde edilen normal dağılım grafiği, kullanılan deneysel tasarımdan elde edilen verileri ve yüzey grafikleri ile yapılan yorumlamaları doğrular nitelikte olmuştur.

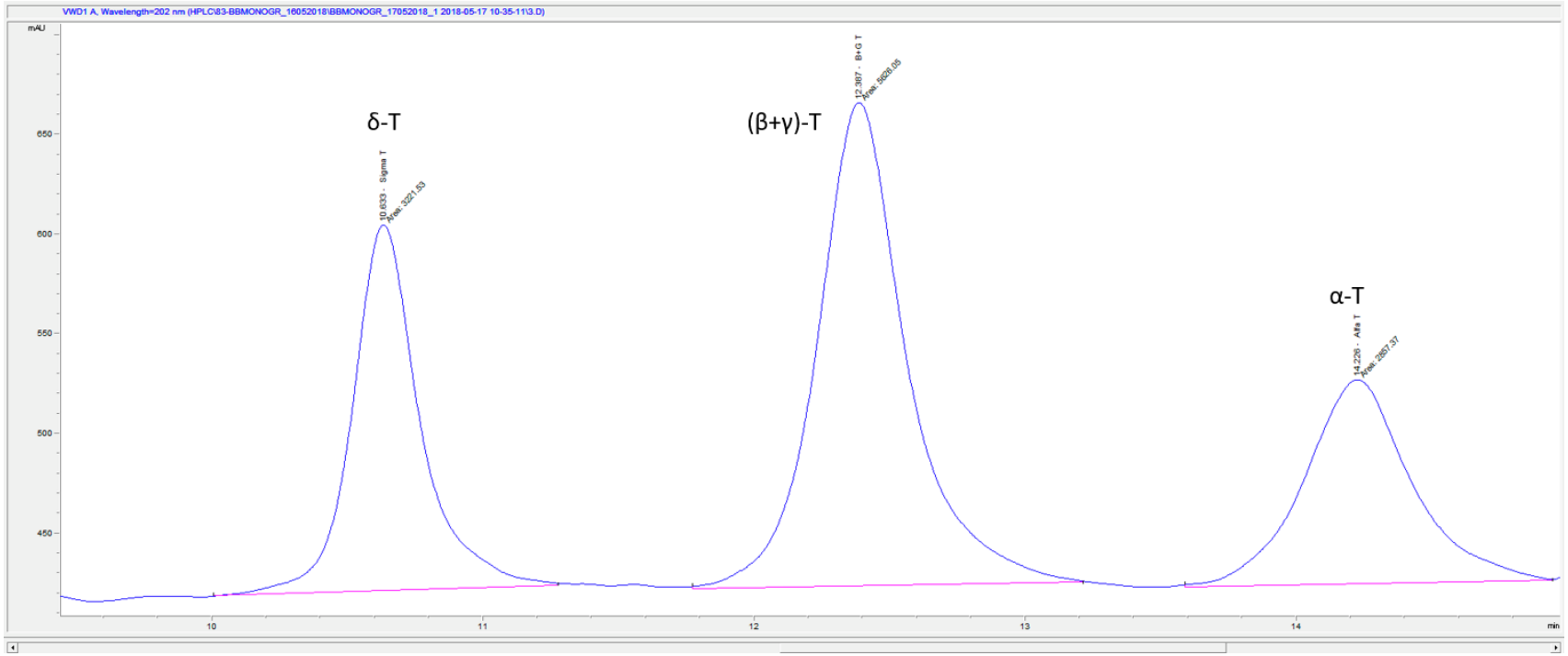
Gerçekleştirilen deneysel tasarım, elde edilen yüzey grafikleri ve normal dağılım grafiği incelendiğinde, tokoferol türlerinin monolitik kolon kullanılarak ayrımının gerçekleştirilebilmesi için kullanılması gereken optimum değerlerin en büyük cevap değerini veren 7 numaralı deneysel tasarımın sahip olduğu değerler olduğu tespit

edilmiştir. Bu değerler hareketli fazın polaritesi için 5.70; hareketli fazın akış hızı için 3.34 mL/dk ve kolon fırını sıcaklığı için 30 ºC'dir. Fakat yüksek akış hızları daha çok kimyasal atığa yol açacağı ve analiz maliyetlerini de arttıracağı için hemen hemen aynı yükseklikte cevap değeri veren ve daha düşük bir akış hızına sahip olan 9 numaralı deneysel tasarım, tokoferol türlerinin ayrımı için seçilmiştir. Bu tasarımın şartları, tokoferol türlerinin monolitik kolonla ayrımı için optimum şartlar olarak seçilmiş ve Çizelge 6.36'da verilmiştir.

Çizelge 6. 36. Tokoferol türlerinin monolitik kolonla ayrımı için tespit edilen optimum kromatografik şartlar

Sabit Faz (Kolon)	Merck Chromolith Performance RP-18 100mmx4.6mm Monolitik kolon
Hareketli Faz	%88Metanol-%12Su
Hareketli Faz Polaritesi	5.70
Hareketli Faz Akış Hızı (mL/dk)	2.50
Dedeksiyon	UV-VIS 202 nm
Analiz Süresi (dk)	5
Enjeksiyon Miktarı (µL)	20
Kolon Fırını Sıcaklığı (ºC)	38.41
Ulaşılan Kolon Basıncı (Bar)	62

Çizelge 6.36'da verilen kromatografik şartlarda analizi yapılan 3 tokoferol türünün (α, β+γ ve δ) analizinden elde edilen kromatogram Şekil 6.70'de verilmiştir.



Şekil 6. 70. Tokoferol türlerinin monolitik kolon kullanılarak optimum şartlarda gerçekleştirilen analizinin kromatogramı (δ-T: δ-tokoferol, (β+γ)-T: (β+γ)-tokoferol, α-T: α-tokoferol)

Şekil 6.70'de verilmiş olan, tokoferol türlerinin monolitik kolon kullanarak gerçekleştirilen optimum ayrımında δ ve β+γ türleri için R_s değerinin 3.71 olduğu tespit edilmiştir. İlgili şekilden de görüleceği üzere tokoferol türlerinin monolitik kolon kullanılarak istenilen düzeyde bir R_s değeri ile ve 5 dk gibi bir kısa zamanda kromatografik olarak ayrımı başarılmıştır.

Skualen türü tek bir tür olduğu için monolitik kolonla tayininde herhangi bir kemometrik tasarım yapılmamış ve analizi için hareketli faz polaritesi 5.1 (%100 Metanol) kullanılmıştır. Diğer kromatografik şartlar aynı tutulmuştur.

6.3.2.5. Monolitik ayırma2 metodunun basınç peformansı

Biyoaktif türlerinin monolitik kolonla ayrımı için gerçekleştirilen deneysel tasarımdan elde edilen ve aynı kromatografik şartlarda 2 μm partikül büyüklüğüne sahip geleneksel dolgulu bir C18 kromatografi kolonundan elde edilen kolon geri basınç değerleri Çizelge 6.37'de karşılaştırmalı olarak verilmiştir.

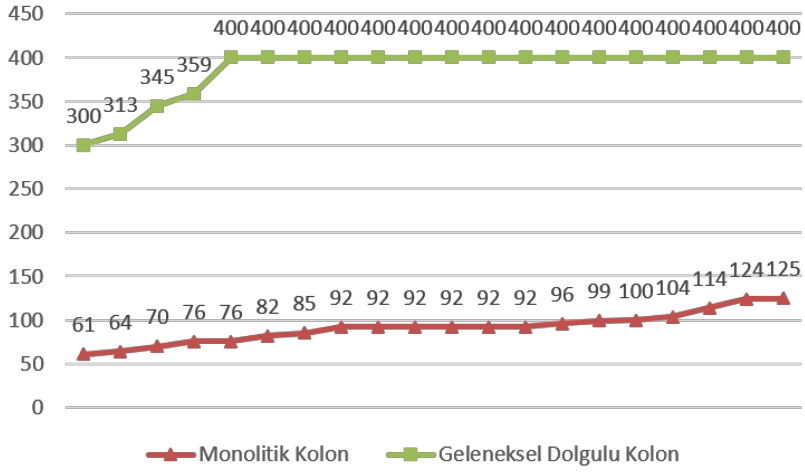
Çalışma kapsamında kullanılmış olan HPLC sisteminin pompası, 400 bar ve üzerindeki kolon geri basınçlarında sistemi korumak için otomatik olarak durmaktadır. 400 bar gibi çok yüksek basınç değerleri, HPLC sisteminin bağlantı elemanlarına zarar vermekte ve kanama olarak tabir edilen kolon dolgu malzemesinin parçalanmasına yol açmaktadır. Bu sebeple 400 bar üzerindeki değerler okunamamış ve "> 400" olarak verilmiştir (Çizelge 6.37).

Çizelge 6.37 incelendiğinde çalışma kapsamında kullanılan monolitik kolonun deneysel tasarımdaki tüm analizlerde düşük kolon geri basıncı verdiği fakat geleneksel dolgulu kolonun neredeyse tüm analizlerde 400 bardan fazla kolon geri basıncı verdiği görülmektedir. Kullanılmış olan monolitik kolon, sahip olduğu düz kanallar sayesinde yüksek polarite değerlerine karşın düşük kolon geri basınç değerleri vermiş ve verimli bir kromatografik ayırma gerçekleştirilmesine imkan tanımıştır. Çizelge 6.37'den de görüleceği üzere monolitik kolon kullanılarak sterol türlerinin ayrıldığı bu çalışmanın, yüksek polariteye sahip hareketli fazlar sebebiyle geleneksel dolgulu bir kolon kullanılarak gerçekleştirilebilmesi imkansız görünmektedir. Çalışma kapsamında monolitik kolon ve geleneksel dolgulu kolondan okunan basınç farklarının daha iyi anlaşılabilmesi için sterol, tokotrienol ve tokoferol tayininden elde edilen basınç değerleri grafiğe geçirilmiş ve Şekil 6.71'de verilmiştir.

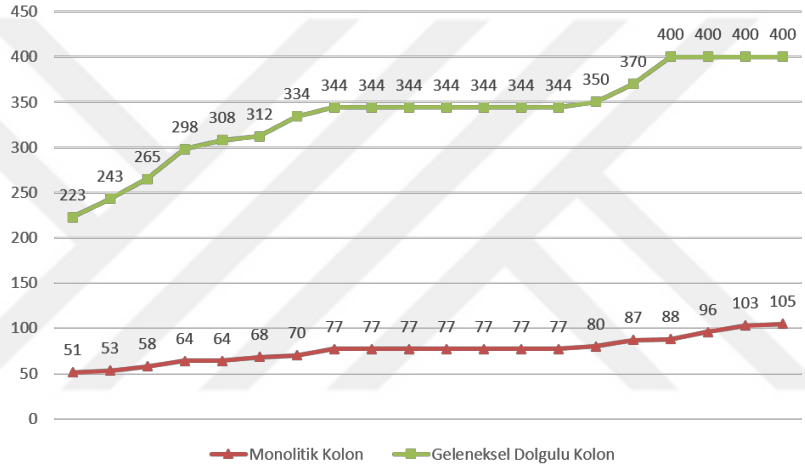
Çizelge 6. 37. Biyoaktif türlerinin monolitik kolon ile ayrımı için gerçekleştirilen deneysel tasarımdan ve aynı şartlarda geleneksel dolgulu bir kolondan elde edilen kolon geri basınçları

	Ulaşılan kolon geri basıncı (Bar)					
	Sterol analizi		**Tokotrienol analizi**		**Tokoferol analizi**	
Analiz sırası	**Monolitik kolon**	**Geleneksel dolgulu kolon**	**Monolitik kolon**	**Geleneksel dolgulu kolon**	**Monolitik kolon**	**Geleneksel dolgulu kolon**
1	76	359	64	298	81	373
2	70	345	58	265	55	259
3	64	313	53	243	49	221
4	104	> 400	80	350	83	386
5	96	> 400	77	344	74	311
6	61	300	51	223	48	190
7	124	> 400	103	> 400	97	395
8	99	> 400	87	370	83	399
9	85	> 400	68	312	62	290
10	92	> 400	77	344	71	292
11	92	> 400	77	344	71	292
12	92	> 400	77	344	71	292
13	92	> 400	77	344	71	292
14	92	> 400	77	344	71	292
15	92	> 400	77	344	71	292
16	82	> 400	70	334	66	291
17	76	> 400	64	308	60	279
18	114	> 400	96	> 400	90	> 400
19	125	> 400	105	> 400	99	> 400
20	100	> 400	88	> 400	80	354

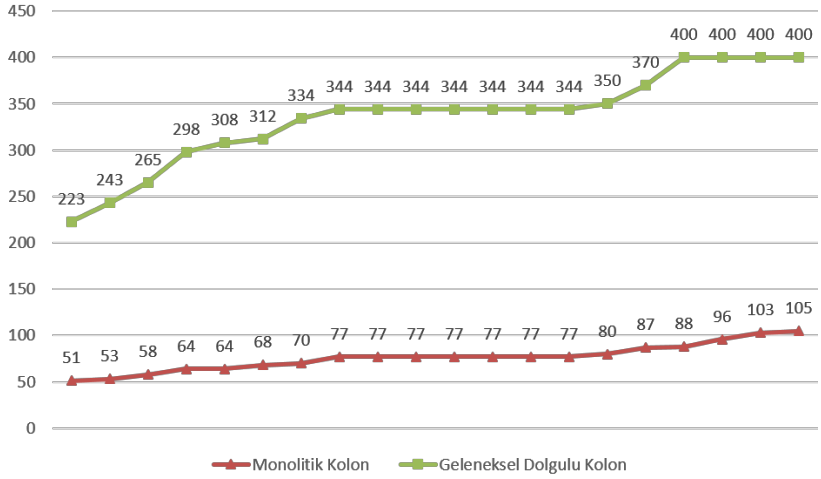
> 400: 400 bardan büyük



a)



b)



c)

Şekil 6. 71. Sterol (a), tokotrienol (b) ve tokoferol (c) türlerinin ayrımında monolitik kolondan (Merck Chromolith Performance RP-18 100mmx4.6mm) ve geleneksel dolgulu kolondan (ACE Excel 5 Super C18 4.6x250mm 2µm) elde edilen basınç değerlerinin karşılaştırma grafiği

6.3.2.6. Biyoaktif bileşenlerin ayrımı için oluşturulan gradient programı

Yapılmış olan çalışmalarda sterol, tokotrienol, tokoferol ve skualen türlerinin ayrılması amacıyla her bir tür için ayrı birer kemometrik tasarım yapılmış ve kromatografik açıdan en iyi ayırma değerlerine sahip olan metotlar geliştirilmiştir. Her bir tür için tespit edilen optimum kromatografik şartlar Çizelge 6.38'de verilmiştir.

Çizelge 6. 38. Sterol, tokotrienol, tokoferol ve skualen türlerinin monolitik kolonla ayrımı için tespit edilmiş optimum kromatorafik şartlar

Tür	Hareketli fazın polaritesi (P')	Hareketli fazın bileşimi (%Metanol-Su)	Hareketli fazın akış hızı (mL/dk)	Kolon fırını sıcaklığı (°C)
Sterol	7.00	63-37	2.50	38.41
Tokotrienol	6.00	82-18	2.50	38.41
Tokoferol	5.70	88-12	2.50	38.41
Skualen	5.10	100-0	2.50	38.41

3 adet sterol (kampesterol, β-sitosterol ve stigmasterol), 3 adet tokotrienol (α, β+γ ve δ), 3 adet tokoferol (α, β+γ ve δ) ve 1 adet skualen olmak üzere toplamda 10 adet biyoaktif bileşenden oluşan bir standart karışım hazırlanmış ve Çizelge 6.39'daki kromatografik şartlara göre analiz edilmiştir. Her türün optimum ayrımı için farklı polaritelerde ve buna bağlı olarak farklı yüzdelerde metanol-su içeren hareketli fazlar kullanıldığı için gradient programı oluşturulmuştur. İlk olarak 1. gradient programı kapsamında analizler gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kromatogram Şekil 6.72'de verilmiştir.

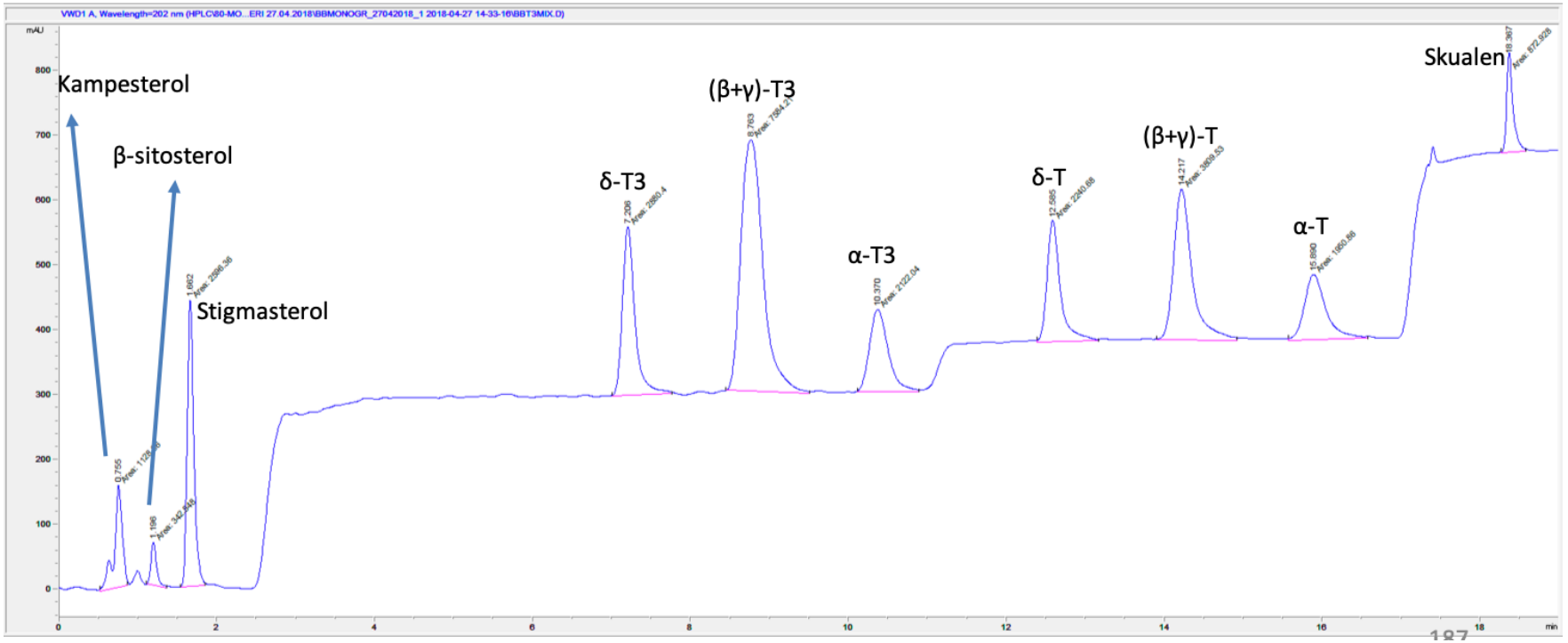
Şekil 6.72'de tüm biyoaktif türlerin istenilen bir R_s değeri ile ayrımının gerçekleştiği görülmektedir. Analiz boyunca zamanla değişen hareketli faz polaritesinin baseline üzerindeki etkisi görülmektedir. Hareketli fazdaki su yüzdesi azaldıkça 202 nm'deki absorbans artmış ve baseline analiz başlangıcından sonuna doğru yükseliş göstermiştir.

Şekil 6.72'de verilen kromatogramda sterol türleri ayrıldıktan sonra tokotrienol türlerinin çıkması için yaklaşık 5 dakikalık bir süre geçmektedir. Bu durumu bertaraf etmek için analizin 1.7-2.0 dk aralığında %100 metanol geçirilerek tokotrienol, tokoferol ve skualen türlerinin daha erken çıkması sağlanmıştır. 2. gradient programı adı verilen bu

analize ait kromatografik şartlar Çizelge 6.40'da verilmiştir. Elde edilen kromatogram Şekil 6.73'de verilmiştir.

Çizelge 6. 39. Sterol, tokotrienol, tokoferol ve skualen türlerinin monolitik kolonla ayrımı için tespit edilmiş optimum kromatorafik şartlar ve 1. gradient uygulaması

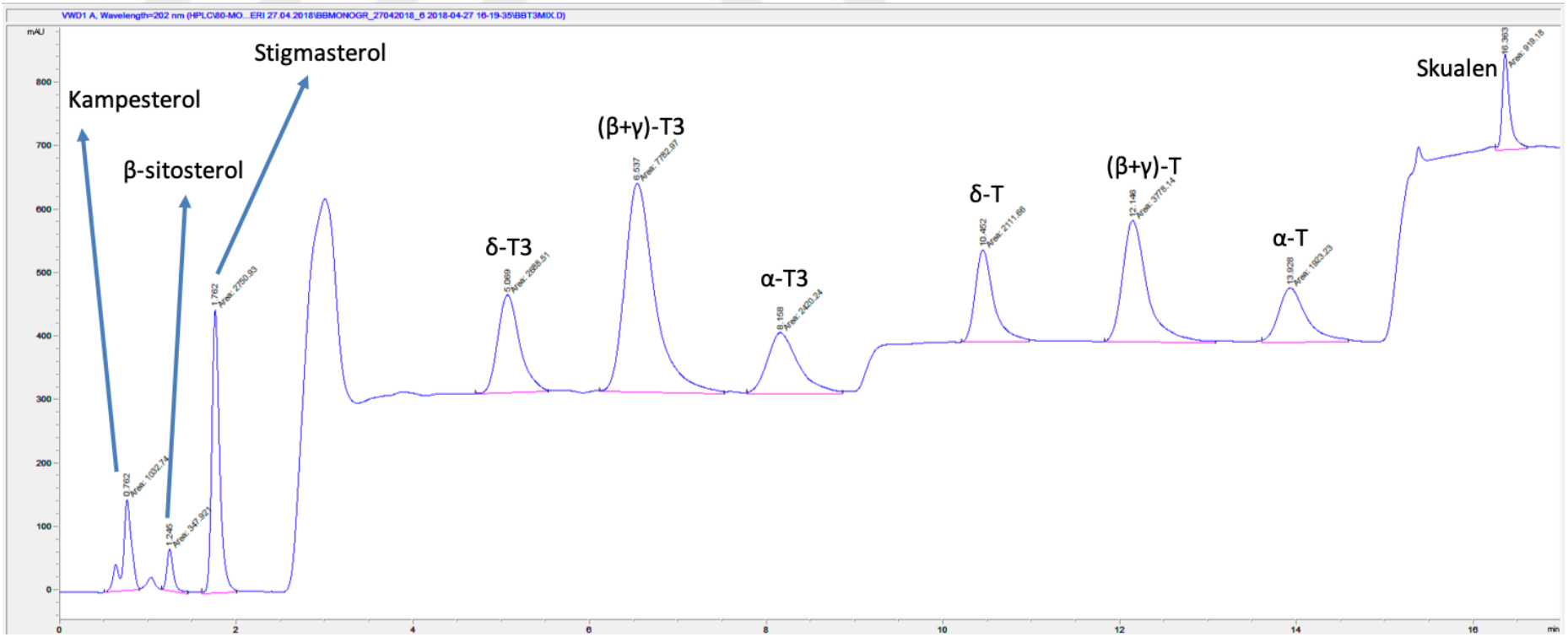
<table>
<tr><td>Sabit Faz (Kolon)</td><td colspan="4">Merck Chromolith Performance RP-18 100mmx4.6mm Monolitik kolon</td></tr>
<tr><td rowspan="10">Hareketli Faz</td><td>Tür</td><td>Zaman (dk)</td><td>%Metanol</td><td>%Su</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Sterol</td><td>0.0</td><td>63</td><td>37</td></tr>
<tr><td>1.6</td><td>63</td><td>37</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Tokotrienol</td><td>1.7</td><td>82</td><td>28</td></tr>
<tr><td>10.0</td><td>82</td><td>28</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Tokoferol</td><td>10.1</td><td>88</td><td>12</td></tr>
<tr><td>15.0</td><td>88</td><td>12</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Skualen</td><td>15.1</td><td>100</td><td>0</td></tr>
<tr><td>19.0</td><td>100</td><td>0</td></tr>
<tr><td rowspan="10">Hareketli Faz Polaritesi</td><td>Tür</td><td>Zaman (dk)</td><td colspan="2">Polarite (P')</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Sterol</td><td>0.0</td><td colspan="2">7.00</td></tr>
<tr><td>1.6</td><td colspan="2">7.00</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Tokotrienol</td><td>1.7</td><td colspan="2">6.00</td></tr>
<tr><td>10.0</td><td colspan="2">6.00</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Tokoferol</td><td>10.1</td><td colspan="2">5.70</td></tr>
<tr><td>15.0</td><td colspan="2">5.70</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Skualen</td><td>15.1</td><td colspan="2">5.10</td></tr>
<tr><td>19.0</td><td colspan="2">5.10</td></tr>
<tr><td>Hareketli Faz Akış Hızı (mL/dk)</td><td colspan="4">2.50</td></tr>
<tr><td>Dedeksiyon</td><td colspan="4">UV-VIS 202 nm</td></tr>
<tr><td>Analiz Süresi (dk)</td><td colspan="4">19</td></tr>
<tr><td>Enjeksiyon Miktarı (µL)</td><td colspan="4">20</td></tr>
<tr><td>Kolon Fırını Sıcaklığı (ºC)</td><td colspan="4">38.41</td></tr>
<tr><td>Ulaşılan Kolon Basıncı (Bar)</td><td colspan="4">Değişken</td></tr>
</table>



Şekil 6. 72. Sterol, tokotrienol, tokoferol ve skualen türlerinin monolitik kolonla ayrımı için 1. gradient uygulaması kromatogramı

Çizelge 6. 40. Sterol, tokotrienol, tokoferol ve skualen türlerinin monolitik kolonla ayrımı için tespit edilmiş optimum kromatorafik şartlar ve 2. gradient uygulaması

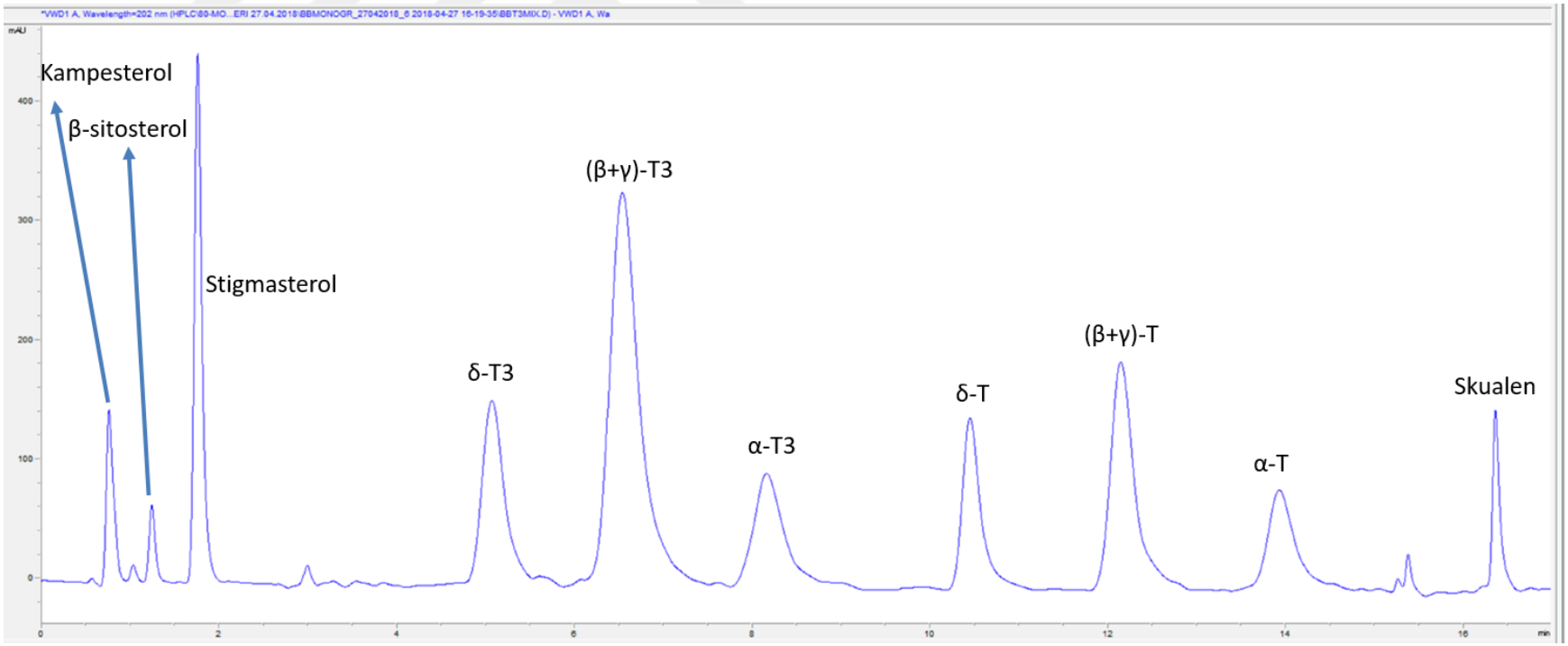
Sabit Faz (Kolon)	Merck Chromolith Performance RP-18 100mmx4.6mm Monolitik kolon			
Hareketli Faz	**Tür**	**Zaman (dk)**	**%Metanol**	**%Su**
	Sterol	0.0	63	37
		1.6	63	37
	Öne Alma	1.7	100	0
		2.0	100	0
	Tokotrienol	2.1	82	28
		8.0	82	28
	Tokoferol	8.1	88	12
		14.0	88	12
	Skualen	14.1	100	0
		19.0	100	0
Hareketli Faz Polaritesi	**Tür**	**Zaman (dk)**	**Polarite (P')**	
	Sterol	0.0	7.00	
		1.6	7.00	
	Öne Alma	1.7	5.10	
		2.0	5.10	
	Tokotrienol	2.1	6.00	
		8.0	6.00	
	Tokoferol	8.1	5.70	
		14.0	5.70	
	Skualen	14.1	5.10	
		17.0	5.10	
Hareketli Faz Akış Hızı (mL/dk)	2.50			
Dedeksiyon	UV-VIS 202 nm			
Analiz Süresi (dk)	17			
Enjeksiyon Miktarı (µL)	20			
Kolon Fırını Sıcaklığı (°C)	38.41			
Ulaşılan Kolon Basıncı (Bar)	Değişken			



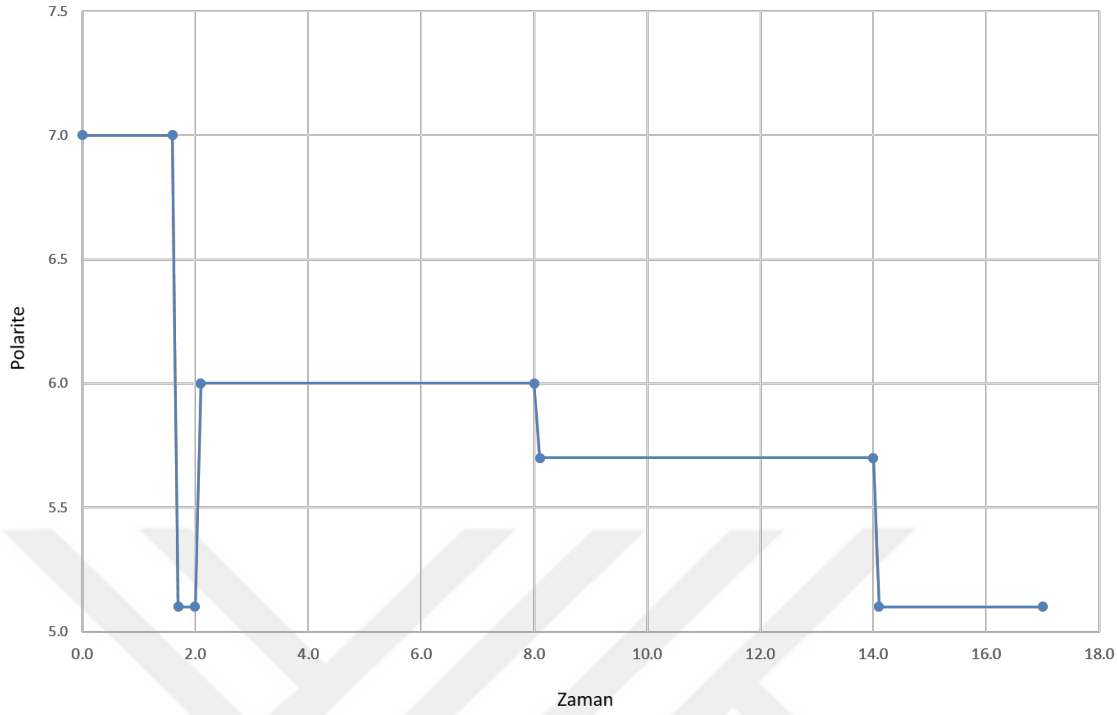
Şekil 6. 73. Sterol, tokotrienol, tokoferol ve skualen türlerinin monolitik kolonla ayrımı için 2. gradient uygulaması kromatogramı

Şekil 6.73'de verilen kromatogramdan da görüleceği üzere monolitik kolon kullanılarak tüm biyoaktif bileşenler başarılı bir şekilde ayrılmıştır. Yapılmış olan tüm kemometrik çalışmalar ve analizler sonucunda MA2 metoduna ait kromatografik şartlar optimize edilmiş ve bundan sonra MA2 metodu kapsamında yapılacak tüm analizlerde Çizelge 6.40'daki kromatografik şartlar kullanılmıştır. Şekil 6.73'de verilen kromatogramdan, aynı şartlarda analizi yapılan metanol numunesinin kromatogramı çıkarılarak gradient farkından ileri gelen baseline yükselmesi yok edilmiştir (Şekil 6.74). Bu basamaktan sonra MA2 metodunun kullanıldığı tüm analizlerde de baseline yükselmesi aynı teknikle yok edilerek direk verilmiştir.

MA2 metodunun, Çizelge 6.40'daki kromatografik şartlara göre yapılan nihai ayrımında polarite değerindeki değişimin daha iyi anlaşılabilmesi için Şekil 6.75'de polaritenin zamanla değişimi grafiği verilmiştir.



Şekil 6. 74. Sterol, tokotrienol, tokoferol ve skualen türlerinin monolitik kolonla ayrımı için 2. gradient uygulamasından elde edilen baseline düzeltilmiş kromatogramı



Şekil 6. 75. MA2 metodunun optimum kromatografik şartlarında yapılan analizin hareketli faz polaritesinin zamanla değişimi

6.3.2.7. Monolitik ayırma2 metodunun kalibrasyonu

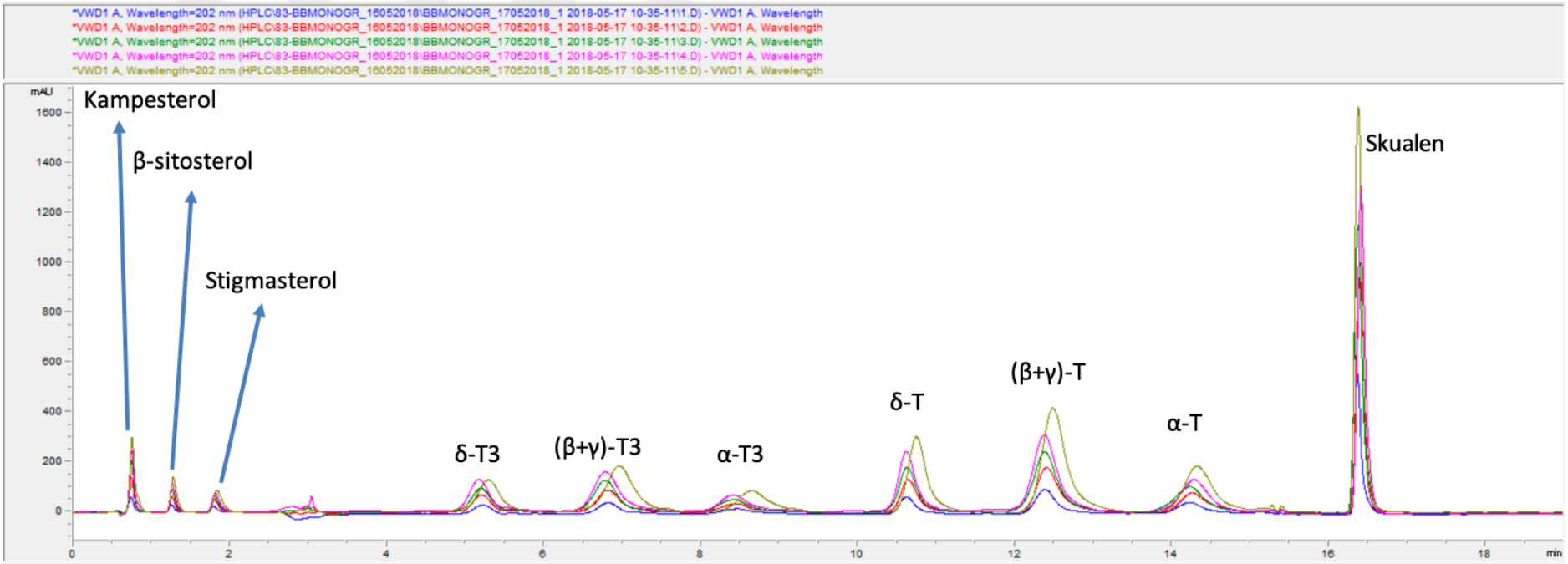
MA2 metodunun kromatografik parametrelerinin optimizasyonu gerçekleştirildikten sonra, içeriği bilinmeyen OODD numunelerinin kantitatif olarak tayini için ilgili metodun kalibrasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla sterol, tokotrienol, tokoferol ve skualen türlerinden hazırlanan kalibrasyon standartlarının bileşimleri Çizelge 6.41'de verilmiştir.

Çizelge 6.41'de bileşimleri verilen 5 adet kalibrasyon standardı, MA2 metodunun Çizelge 6.40 da verilen optimum şartlarında HPLC sistemine enjeksiyonları gerçekleştirilmiş ve elde edilen kromatogram Şekil 6.76'da verilmiştir.

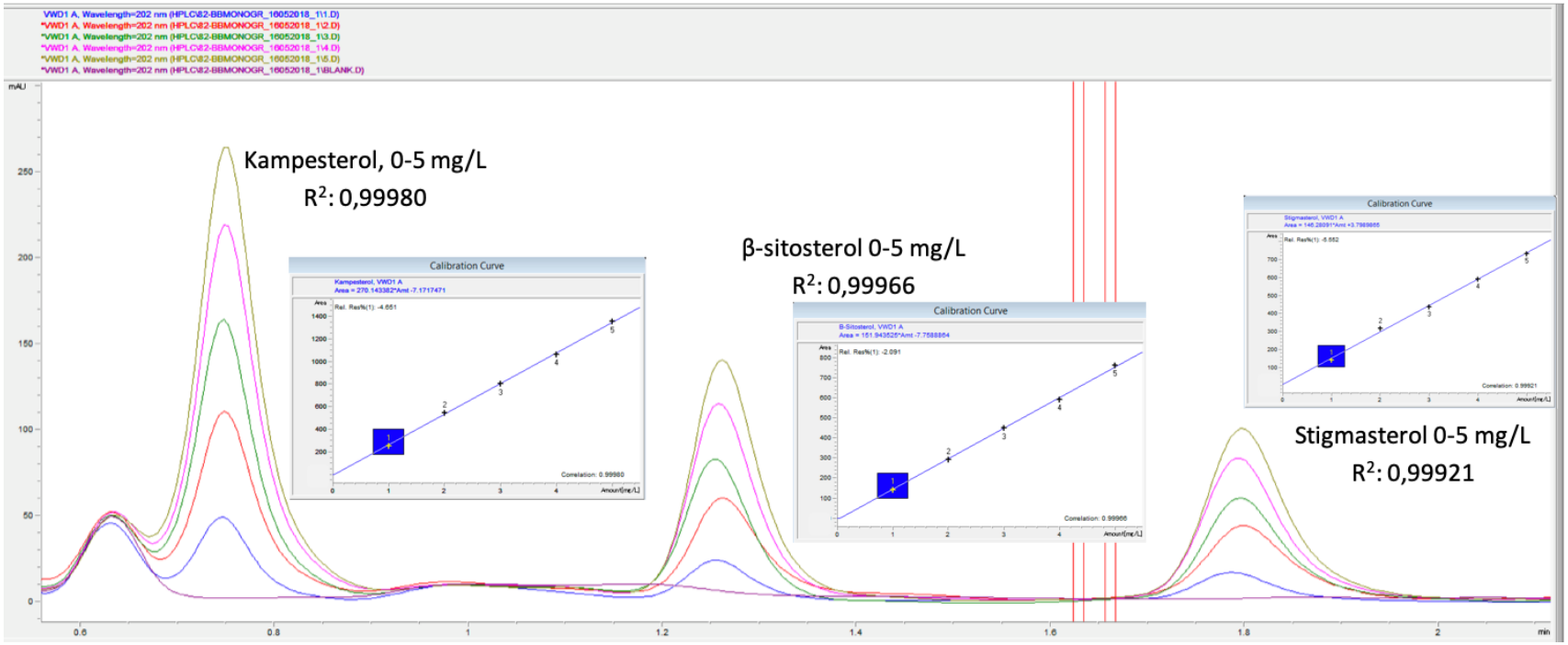
Şekil 6.76'da verilen kromatogramda her türe ait bölgeler ayrıntılı olarak irdelenmiştir. Şekil 6.76'da kalibrasyon standartlarının sterol bölgesinde verdiği pikler ve her bir sterol türünün kalibrasyon grafiği verileri Şekil 6.77'de verilmiştir.

Çizelge 6. 41. MA2 metodunun kalibrasyonu için hazırlanan kalibrasyon standartları

Tür	Blank	1.Standart (mg/L)	2.Standart (mg/L)	3.Standart (mg/L)	4.Standart (mg/L)	5.Standart (mg/L)
Kampesterol	0	1	2	3	4	5
Beta-sitosterol	0	1	2	3	4	5
Stigmasterol	0	1	2	3	4	5
δ-tokotrienol	0	100	200	300	400	500
(β+γ)-tokotrienol	0	100	200	300	400	500
α-tokotrienol	0	100	200	300	400	500
δ-tokoferol	0	100	200	300	400	500
(β+γ)-tokoferol	0	100	200	300	400	500
α-tokoferol	0	100	200	300	400	500
Skualen	0	500	1000	1500	2000	3000



Şekil 6. 76. MA2 metodunun kalibrasyonu için hazırlanan standart karışımların toplu kromatogramı



Şekil 6. 77. MA2 metodunun kalibrasyonu için hazırlanan standart karışımların sterol bölgesinde verdiği pikler ve kalibrasyon grafikleri

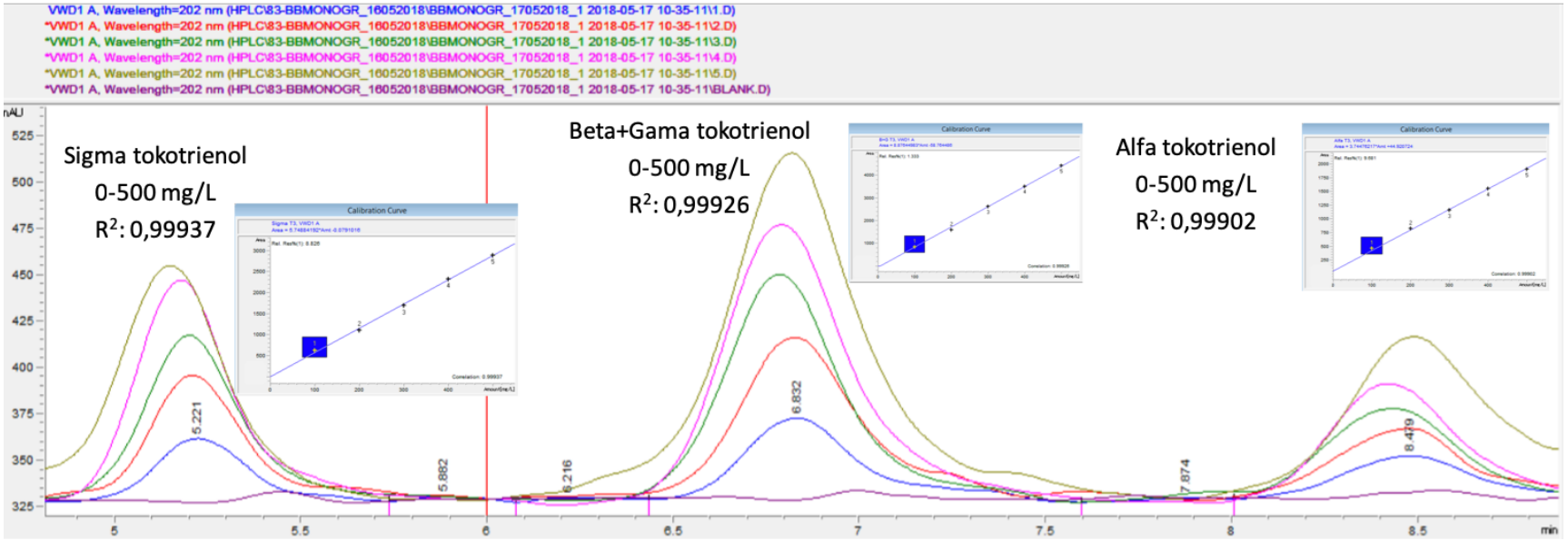
Şekil 6.77'de görüleceği üzere tüm kalibrasyon standartları sterol bölgesinde düzgün ve artan sterol pikleri vermiştir. Elde edilen piklerin alanları ve konsantrasyonları kullanılarak her bir sterol türü için kalibrasyon grafikleri hazırlanmıştır. Elde edilen kalibrasyon grafiklerinin tümü yüksek R^2 değerleri vermiştir.

Şekil 6.78'de, kalibrasyon standartlarının tokotrienol bölgesinde verdiği düzgün ve artan tokotrienol pikleri görülmektedir. Elde edilen piklerin alanları ve konsantrasyonları kullanılarak her bir tokotrienol türü için kalibrasyon grafikleri hazırlanmıştır. Elde edilen kalibrasyon grafiklerinin tümü yüksek R^2 değerleri vermiştir.

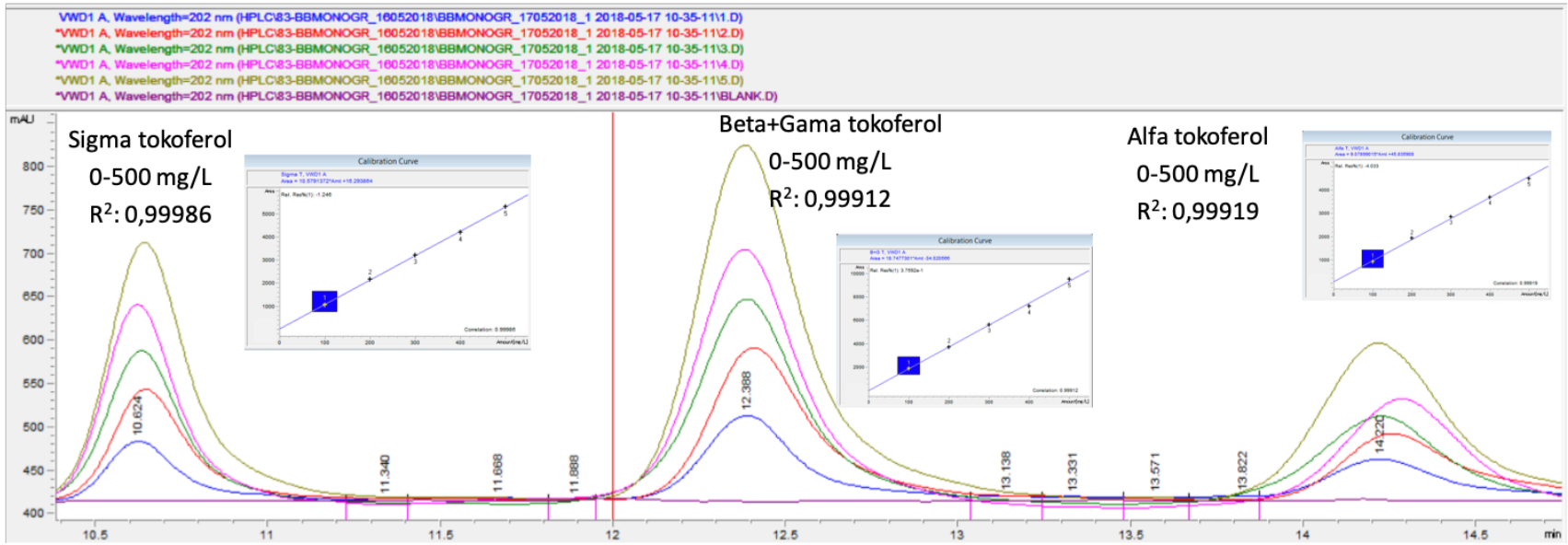
Şekil 6.79'da, kalibrasyon standartlarının tokoferol bölgesinde verdiği düzgün ve artan tokoferol pikleri görülmektedir. Elde edilen piklerin alanları ve konsantrasyonları kullanılarak her bir tokoferol türü için kalibrasyon grafikleri hazırlanmıştır. Elde edilen kalibrasyon grafiklerinin tümü yüksek R^2 değerleri vermiştir.

Şekil 6.80'de, kalibrasyon standartlarının skualen bölgesinde verdiği düzgün ve artan skualen pikleri görülmektedir. Elde edilen piklerin alanları ve konsantrasyonları kullanılarak skualen türü için kalibrasyon grafiği hazırlanmıştır. Skualen türü için elde edilen kalibrasyon grafiği de yüksek R^2 değeri vermiştir.

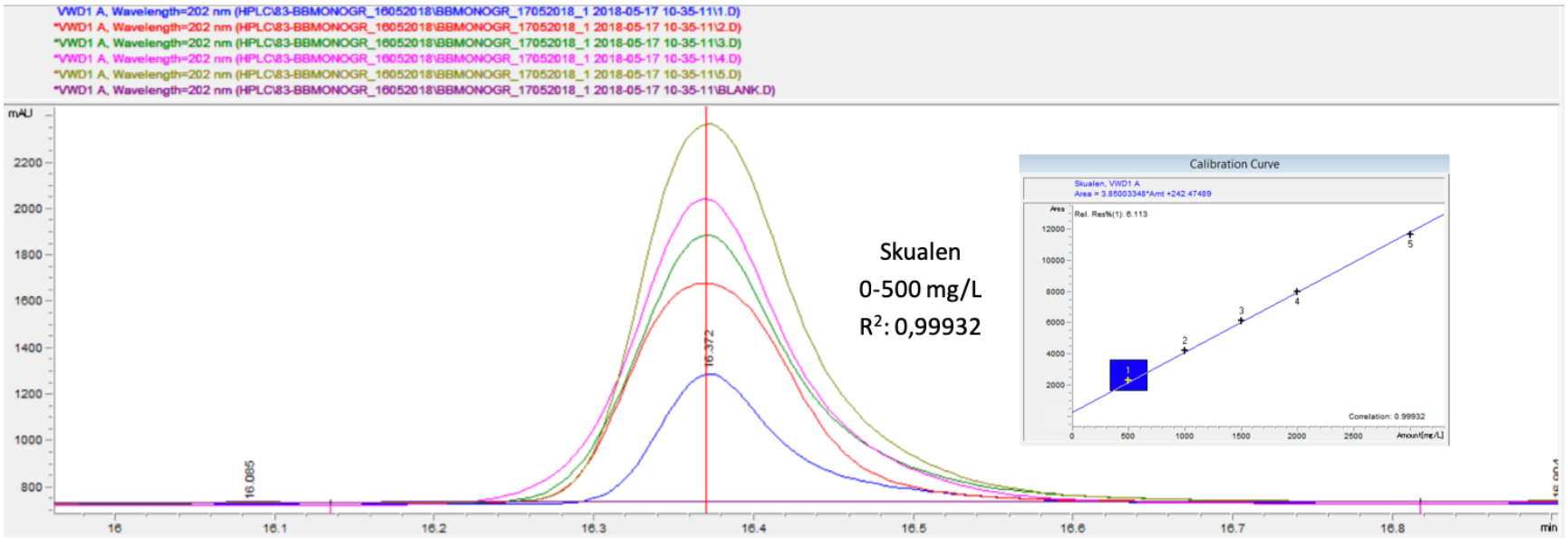
Çizelge 6.41'de bileşimleri verilen 5 adet kalibrasyon standardı, MA2 metodunun Çizelge 6.40'da verilen optimum şartlarında HPLC sistemine enjeksiyonları gerçekleştirilmiş ve tüm biyoaktif türler için kalibrasyon grafikleri oluşturulmuştur. Elde edilen kalibrasyon grafiklerinin verileri Çizelge 6.42'de toplu olarak verilmiştir.



Şekil 6. 78. MA2 metodunun kalibrasyonu için hazırlanan standart karışımların tokotrienol bölgesinde verdiği pikler ve kalibrasyon grafikleri



Şekil 6. 79. MA2 metodunun kalibrasyonu için hazırlanan standart karışımların tokoferol bölgesinde verdiği pikler ve kalibrasyon grafikleri



Şekil 6. 80. MA2 metodunun kalibrasyonu için hazırlanan standart karışımların skualen bölgesinde verdiği pikler ve kalibrasyon grafikleri

Çizelge 6. 42. MA2 metodu ile tüm biyoaktif türler için elde edilen kalibrasyon grafiklerinin verileri

Tür	**Denklem**	**R^2 Değeri**
Kampesterol	Pik alanı=270.143382xMiktar-7.1717471	0.99980
Beta-sitosterol	Pik alanı=151.943525xMiktar-7,7588864	0.99966
Stigmasterol	Pik alanı=146.28091xMiktar+3.7989865	0.99921
δ-tokotrienol	Pik alanı=5.74884192xMiktar-0.0791016	0.99937
(β+γ)-tokotrienol	Pik alanı=8.87644983xMiktar-58.764486	0.99926
α-tokotrienol	Pik alanı=3.74476217xMiktar+44.920724	0.99902
δ-tokoferol	Pik alanı=10.5791372xMiktar+16.293864	0.99986
(β+γ)-tokoferol	Pik alanı=18.7477301xMiktar-34.020566	0.99912
α-tokoferol	Pik alanı=9.07899015xMiktar+45.835908	0.99919
Skualen	Pik alanı=3.85003348xMiktar+242.47489	0.99932

6.3.2.8. Monolitik ayırma2 metodunun validasyonu ve istatistiksel analizi

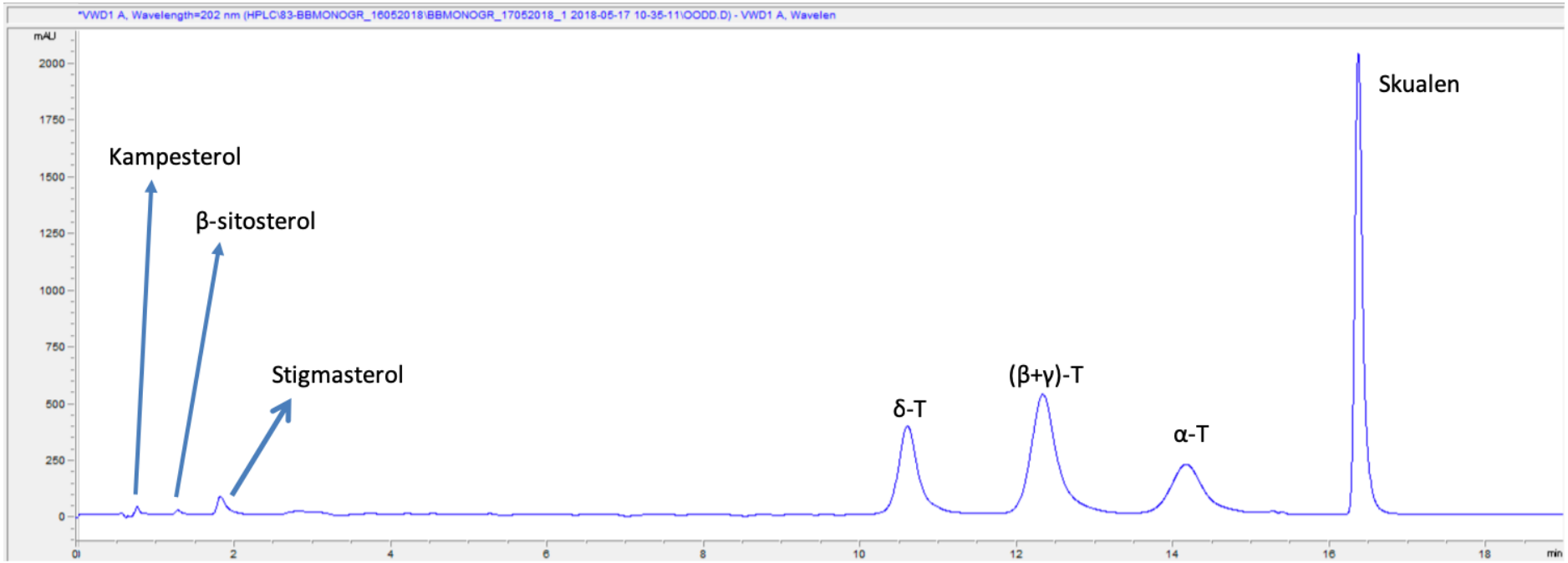
MA2 metodunun validasyonu için tez kapsamında temin edilen OODD numunesi sabunlaştırma işlemine tabi tutulmuştur. İlgili işleme göre uygun ve temiz bir balon içerisine OODD numunesinden 0.7800 g tartılmış ve 1 N 100 mL Et-KOH ile geri soğutucu altında 90^{o}C de 1 saat kaynatılmıştır. Ardından dietileter ve su ile ekstrakte edilmiş ve ayrılan organik faz su ile 4 kez yıkanmıştır. Geriye kalan organik fazın çözücüsü döner buharlaştırıcı ile uçurularak geriye kalan sabunlaşmayan madde 25 mL metanolde çözülmüştür. Ardından 25 mm PTFE şırınga filtreden geçirilmiş ve 1.5 mL hacme sahip kapaklı cam viallere doldurularak analize hazır hale getirilmiştir. Bu sayede OODD numunesinin sadece sabunlaşmayan türleri (sterol, tokotrienol, tokoferol ve skualen) elde edilmiştir. Sabunlaştırılan ve analize hazır hale gelen OODDS numunesi 3 tekrarlı olarak optimize edilen MA2 metoduna göre HPLC sistemine enjeksiyonu yapılmıştır. Analizden elde edilen kromatogram Şekil 6.81'de verilmiştir.

Şekil 6.81'de görüleceği üzere OODD numunesinin MA2 metodu ile analizi sonucu sterol, tokoferol ve skualen türleri pikler vermiştir. Tokotrienol türlerine ait herhangi bir pik tespit edilememiştir. Başlık 6.1.11'de standart kromatografik metotla yapılan tokotrienol analizinde de herhangi bir tokotrienol türü tespit edilememiştir. Bu sebeple elde edilen sonuç, daha önce yapılan analizi doğrular niteliktedir.

Şekil 6.81'de tespit edilen her bir türün pik alanı ve Çizelge 6.42'deki kalibrasyon grafiği verileri kullanılarak, OODD numunesinin ihtiva ettiği biyoaktif türlerin miktarları MA2 metodu kapsamında tayin edilmiştir (Çizelge 6.43).

Çizelge 6. 43. OODD numunesinin biyoaktif türlerinin MA2 metoduyla elde edilen miktarları

Tür	**Miktarı (mg/kg ± SD)**
Kampesterol	11.77 ± 0.25
Beta-sitosterol	14.67 ± 0.30
Stigmasterol	108.56 ± 0.18
Toplam sterol	135.00 ± 0.48
δ-tokoferol	358.40 ± 1.57
(β+γ)-tokoferol	16657.92 ± 15.67
α-tokoferol	15435.48 ± 17,76
Toplam tokoferol	32451.80 ± 1.97
Skualen	83454.99 ± 1.33



Şekil 6. 81. MA2 metoduna göre analizi gerçekleştirilen OODDS numunesinin kromatogramı

OODD numunesinin Başlık 6.1.12'deki standart metotla ve geliştirilen MA2 metoduyla elde edilen toplam sterol miktarları karşılaştırmalı olarak Çizelge 6.44'de verilmiştir. Ayrıca her iki metottan elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir farkın olup olmadığının kontrolü için Denklem 6.1 kullanılarak yapılan T testi verileri de Çizelge 6.44'de verilmiştir.

Çizelge 6. 44. OODD numunesinin standart ve MA2 metoduyla elde edilen toplam sterol miktarlarının karşılaştırılması

Metot	**Toplam Sterol (mg/kg)**	**y**	**w**	**T_d**	**T_d kritik (P: 0.05)**
Standart ± SD	138.41 ± 2.67	138.41	5.34	1.08	1.27
MA2 ± SD	135.00 ± 0.48	134.00	0.96		

Çizelge 6.44'de OODD numunesinin hem standart metotla hem de MA2 metodundan bulunan toplam sterol değerleri karşılaştırılmıştır. Ayrıca her iki metottan elde edilen sonuçlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olup olmadığının kontrolü için T testi uygulanmıştır. Tüm değerler için hesaplanan T_d değeri, kritik T_d değerinden küçük çıkmıştır ve sıfır hipotezi reddedilemez. Bu sebeple iki metottan elde edilen ortalama değerlerin, P: 0.05 ihtimaliyet seviyesinde birbirinden farklı olmadığı tespit edilmiştir. OODD numunesinin toplam sterol türlerinin MA2 metoduyla tayininden elde edilen diğer istatistiksel veriler Çizelge 6.45'de verilmiştir.

Çizelge 6. 45. OODD numunesinin toplam sterol miktarının MA2 metoduyla tayininden elde edilen istatistiksel veriler

İstatistiksel Parametre	**Değer**	**Açıklama**
SD	0.48	3 tekrar
RSD	%0.36	P: 0.05
s^2	0.23	
cv	%0.036	
LOD	1.44	SSx3
LOQ	4.80	SSx10
Doğruluk (Bağıl hata)	% 2.46	%5'ten az olmalı

OODD numunesinin Başlık 6.1.11'deki standart metotla ve geliştirilen MA2 metoduyla elde edilen toplam tokoferol miktarları karşılaştırmalı olarak Çizelge 6.46'da verilmiştir. Ayrıca her iki metottan elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir farkın olup olmadığının kontrolü için Denklem 6.1 kullanılarak yapılan T testi verileri de Çizelge 6.46'da verilmiştir.

Çizelge 6. 46. OODD numunesinin standart ve MA2 metoduyla elde edilen toplam tokoferol miktarlarının karşılaştırılması

Metot	Toplam Tokoferol (mg/kg)	y	w	T_d	T_d kritik (P: 0.05)
Standart ± SD	32449.17 ± 0.83	32449.17	1.66	0.94	1.27
MA2 ± SD	32451.80 ± 1.97	32451.80	3.84		

Çizelge 6.46'da OODD numunesinin hem standart metotla hem de MA2 metodundan bulunan toplam tokoferol değerleri karşılaştırılmıştır. Ayrıca her iki metottan elde edilen sonuçlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olup olmadığının kontrolü için T testi uygulanmıştır. Tüm değerler için hesaplanan T_d değeri, kritik T_d değerinden küçük çıkmıştır ve sıfır hipotezi reddedilemez. Bu sebeple iki metottan elde edilen ortalama değerlerin, P: 0.05 ihtimaliyet seviyesinde birbirinden farklı olmadığı tespit edilmiştir. OODD numunesinin toplam tokoferol türlerinin MA2 metoduyla tayininden elde edilen diğer istatistiksel veriler Çizelge 6.47'de verilmiştir.

Çizelge 6. 47. OODD numunesinin toplam tokoferol miktarının MA2 metoduyla tayininden elde edilen istatistiksel veriler

İstatistiksel Parametre	Değer	Açıklama
SD	1.97	3 tekrar
RSD	%0,006	P: 0.05
s^2	3.88	
cv	%0.0006	
LOD	5.91	SSx3
LOQ	19.70	SSx10
Doğruluk (Bağıl hata)	% 0.0081	%5'ten az olmalı

OODD numunesinin Başlık 6.1.13'deki standart metotla ve geliştirilen MA2 metoduyla elde edilen skualen miktarları karşılaştırmalı olarak Çizelge 6.48'de verilmiştir. Ayrıca her iki metottan elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir farkın olup olmadığının kontrolü için Denklem 6.1 kullanılarak yapılan T testi verileri de Çizelge 6.48'de verilmiştir.

Çizelge 6. 48. OODD numunesinin standart ve MA2 metoduyla elde edilen skualen miktarlarının karşılaştırılması

Metot	Skualen (mg/kg)	y	w	T_d	T_d kritik (P: 0.05)
Standart ± SD	83454.84 ± 1.51	83454.84	3.02	0.05	1.27
MA2 ± SD	83454.99 ± 1.33	83454.99	2.66		

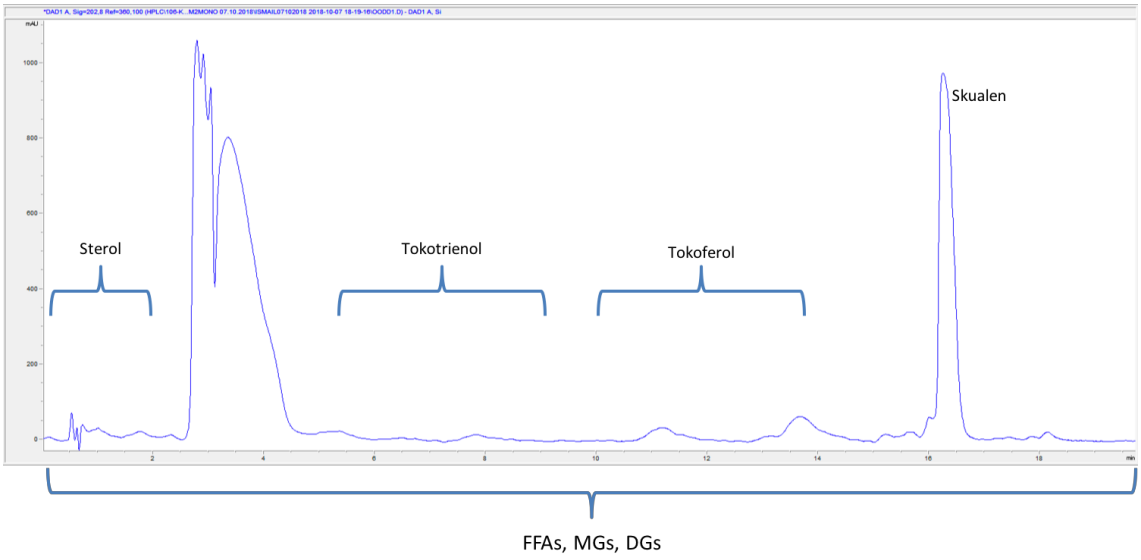
Çizelge 6.48'de OODD numunesinin hem standart metotla hem de MA2 metodundan bulunan skualen değerleri karşılaştırılmıştır. Ayrıca her iki metottan elde edilen sonuçlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olup olmadığının kontrolü için T testi uygulanmıştır. Tüm değerler için hesaplanan T_d değeri, kritik T_d değerinden küçük çıkmıştır ve sıfır hipotezi reddedilemez. Bu sebeple iki metottan elde edilen ortalama değerlerin, P: 0.05 ihtimaliyet seviyesinde birbirinden farklı olmadığı tespit edilmiştir. OODD numunesinin skualen türünün MA2 metoduyla tayininden elde edilen diğer istatistiksel veriler Çizelge 6.49'da verilmiştir.

Çizelge 6. 49. OODD numunesinin skualen miktarının MA2 metoduyla tayininden elde edilen istatistiksel veriler

İstatistiksel Parametre	**Değer**	**Açıklama**
SD	1.33	3 tekrar
RSD	%0,002	P: 0.05
s^2	1.77	
cv	%0,0002	
LOD	3.99	SSx3
LOQ	13.30	SSx10
Doğruluk (Bağıl hata)	%0.00018	%5'ten az olmalı

Geliştirilmiş olan MA2 metodunun validasyonunu güçlendirmek amacıyla aşağıda listelenen numuneler analiz edilmiştir. Analizler için Çizelge 6.40'daki optimum kromatografik şartlar kullanılmıştır.

- OODD
- %50 OODD + %50 HPY
- OODDS
- HPYS
- S(%50 OODD + %50 HPY)



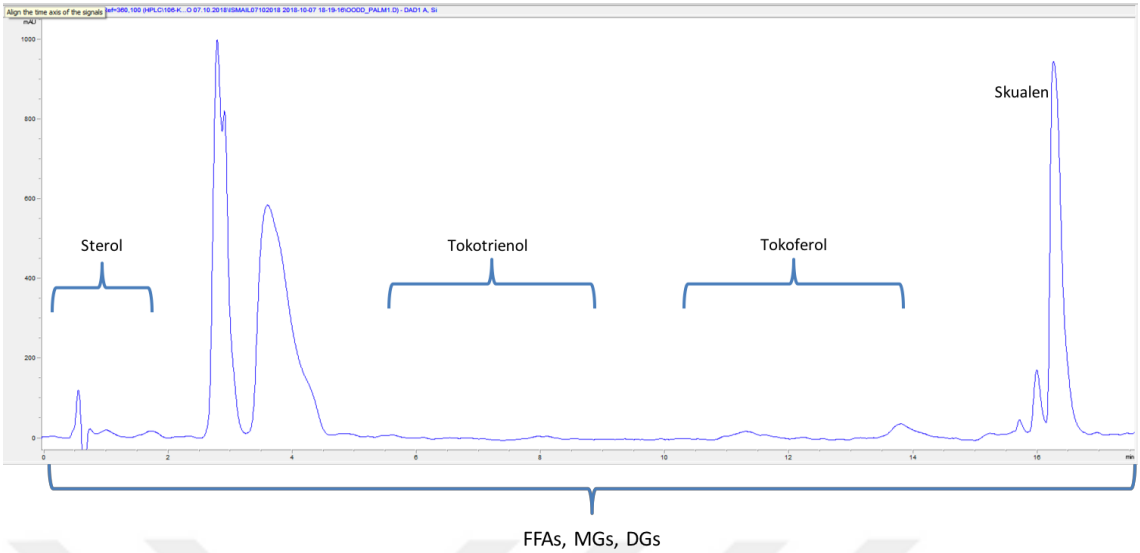
Şekil 6. 82. MA2 metodun göre analiz edilen OODD numunesinin kromatogramı

Sabunlaştırılmadan direk MA2 metoduna göre analizi gerçekleştirilen OODD numunesinin kromatogramı Şekil 6.82'de verilmiştir.

Şekil 6.82'deki OODD numunesine ait kromatogramda steroller, tokotrienoller ve tokoferoller in çıkması beklenen bölgeleri yatay parantez ile gösterilmiştir. Ayrıca 16. dk civarı çıkan skualen türüne ait kromatogram da etiketlenmiştir. Bu analizde OODD numunesinde sabunlaştırma işlemi yapılmadan direk enjeksiyonu yapıldığı için tanımlanamayan pikler de çıkmıştır. Bu piklerin farklı karbon ve çift bağ sayılarına sahip FFA, MG ve DG türleri olabileceği düşünülmektedir. OODD numunesinin %87 oranında FFA içerdiği bilindiği için 2.5. dk civarında çıkan büyük piklerin FFA türleri olduğu düşünülmektedir. Sabunlaştırma işlemi yapılmadığı için Şekil 6.82'de sterol, tokotrienol ve tokoferol bölgesinde çıkan piklerin bu türlere ait olup olmadığı netleştirilememektedir.

Şekil 6.83'deki (%50 OODD + %50 HPY) numunesine ait kromatogramda steroller, tokotrienoller ve tokoferollerin çıkması beklenen bölgeleri yatay parantez ile gösterilmiştir. Ayrıca 16. dk civarı çıkan skualen türüne ait kromatogram da etiketlenmiştir. Fakat FFA ve skualen türlerine ait kromatogramlar bu analizde daha düşük şiddette pikler vermiştir. Bunun sebebinin OODD numunesine göre daha düşük miktarlarda FFA ve skualen içeren HPY'ndan ileri geldiği düşünülmüştür. Ayrıca bu analizde de beklediğimiz türlerle aynı bölgede netleştirilemeyen pikler çıkmıştır.

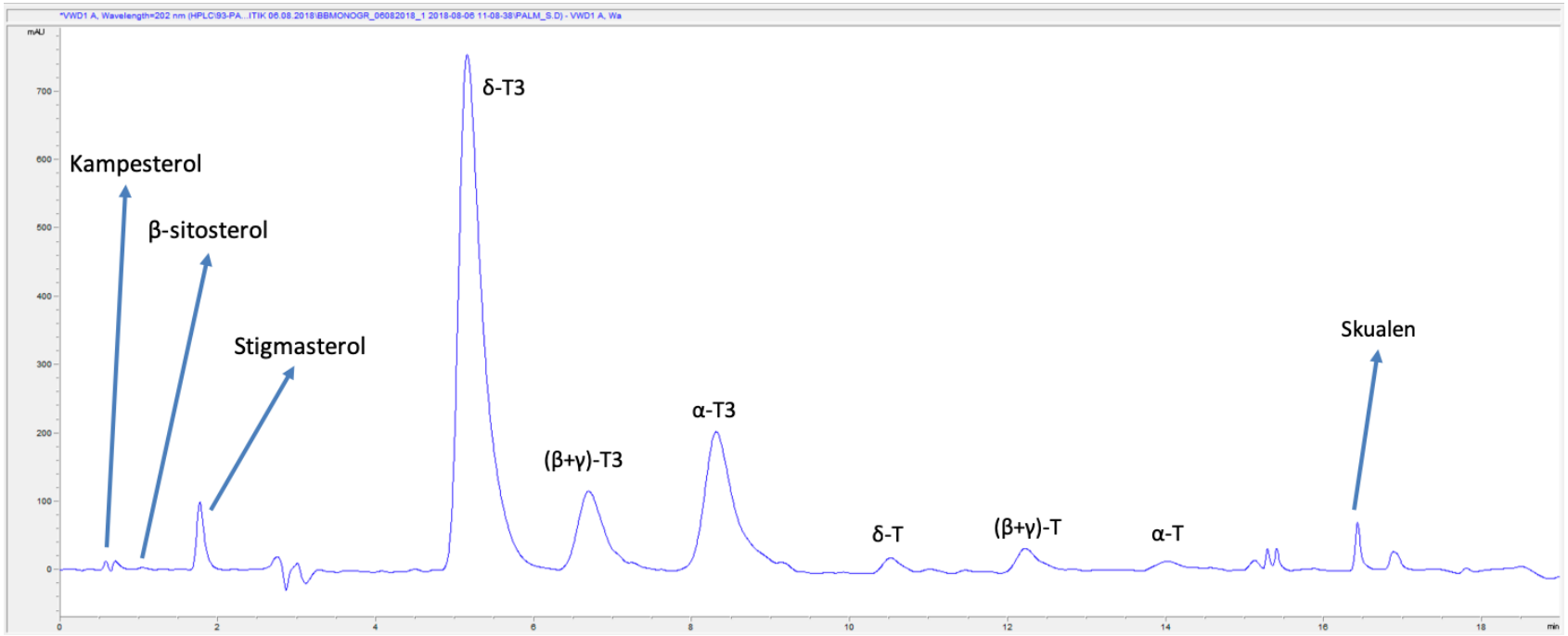
MA2 metoduna göre analizi yapılan HPYS numunesinin kromatogramı Şekil 6.84'de verilmiştir.



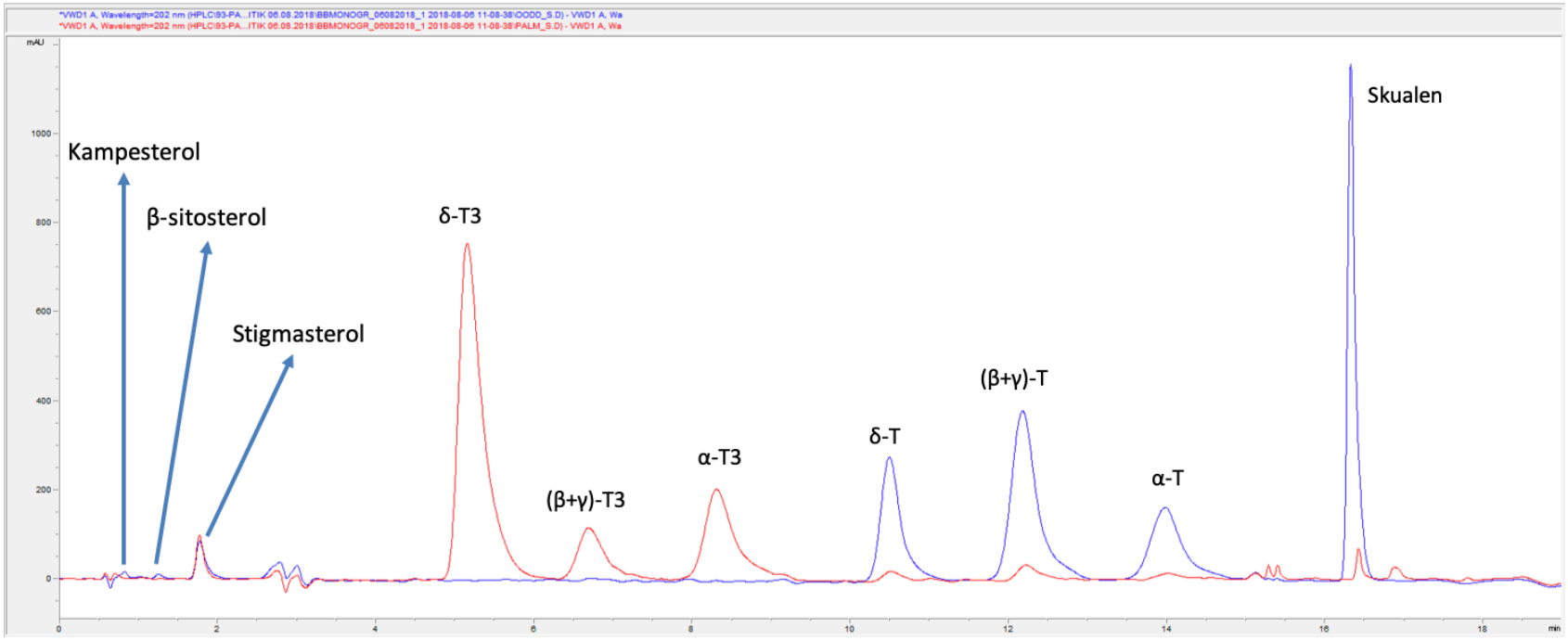
Şekil 6. 83. MA2 metodun göre analiz edilen (%50 OODD + %50 HPY) numunesinin kromatogramı

Türleri tespit edilen kampesterol, β-sitosterol, stigmasterol, δ-tokotrienol, (β+γ)-tokotrienol, α-tokotrienol, δ-tokoferol, (β+γ)-tokoferol, α-tokoferol ve skualen türlerine ait kromatogramlar etiketlenmiştir. Özellikle yüksek çıkan tokotrienol türleri dikkat çekmiştir. HPYS numunesinin sterol, tokoferol ve skualen türleri bu analizde de düşük miktarlarda çıkmıştır. Şekil 6.84'de verilen kromatogramdan da görüleceği üzere monolitik kolon kullanılarak tüm biyoaktif bileşenler başarılı bir şekilde ayrılmıştır.

MA2 metoduna göre analizi yapılan OODDS ve HPYS numunelerinin kromatogramları Şekil 6.85'de verilmiştir.



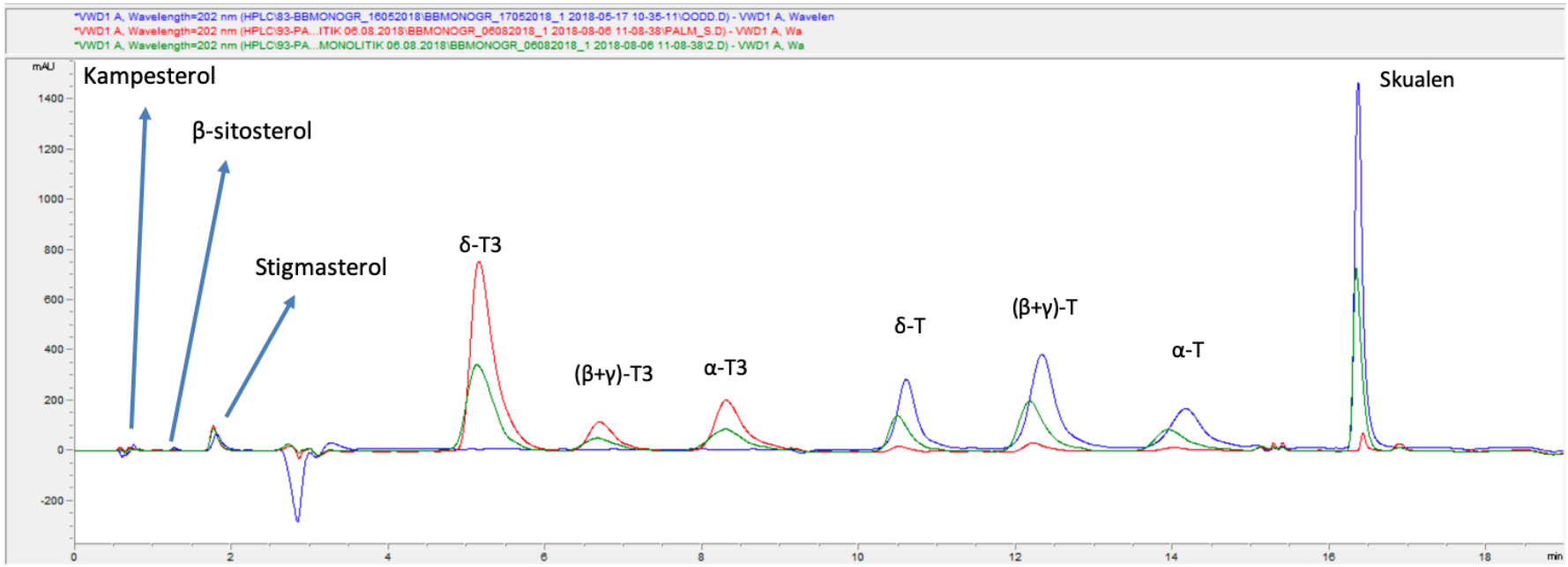
Şekil 6. 84. MA2 metodun göre analiz edilen HPYS numunesinin kromatogramı



Şekil 6. 85. MA2 metodun göre analiz edilen OODDS (Mavi) ve HPYS (Kırmızı) numunelerinin kromatogramları

Şekil 6.85 incelendiğinde numunelerden gelen türler açıkça görülmektedir. Türleri tespit edilen (kampesterol+β-sitosterol), stigmasterol, δ-tokotrienol, (β+γ)-tokotrienol, α-tokotrienol, δ-tokoferol, (β+γ)-tokoferol, α-tokoferol ve skualen türlerine ait kromatogramlar etiketlenmiştir. Yüksek tokotrienol içeriğiyle HPYS öne çıkarken; yüksek tokoferol ve skualen içeriği ile OODDS öne çıkmıştır. Ayrıca HPYS numunesinin az miktarlarda tokoferol türlerini içerdiği tespit edilmiştir. Sterol türleri ise her iki numunede yakın değerlerde çıkmıştır.

Şekil 6.86'daki OODDS, HPYS ve S(%50 OODD + %50 HPY) numunelerine ait kromatogramlarda tespit edilen kampesterol, β-sitosterol, stigmasterol, δ-tokotrienol, (β+γ)-tokotrienol, α-tokotrienol, δ-tokoferol, (β+γ)-tokoferol, α-tokoferol ve skualen türlerine ait kromatogramlar etiketlenmiştir. İlgili analizde OODDS ve HPYS numuneleri karıştırıldığı için tokotrienol piklerinin alanları azalırken; tokoferol ve skualen türlerinin pik alanları artmıştır.



Şekil 6. 86. MA2 metodun göre analiz edilen OODDS (Mavi), HPYS (Kırmızı) ve S(%50 OODD + %50 HPY) (Yeşil) numunelerinin kromatogramları

7. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

7.1. Sonuçlar

Gerçekleştirilmiş olan bu doktora tezinde; zeytinyağının rafinasyonu esnasında deoderizasyon kademesinde elde edilen deoderize distilatının, fiziksel ve kimyasal özellikleri titrimetrik, spektroskopik ve kromatografik standart metotlarla incelenmiş ve FFA, sterol, tokoferol, tokotrienol ve skualen gibi katma değeri yüksek ve insan sağlığı açısından son derece önemli biyoaktif bileşenleri kantitatif olarak incelenmiştir. İncelenen türlerin daha hızlı ve kolay analiz edilebilmelerini sağlamak için spektroskopik, kromatografik ve kemometrik metotlar kullanılarak tez çalışmaları kapsamında yeni tayin metotları geliştirilmiştir. Yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar ayrı ayrı özetlenmek istenirse;

Birinci basamakta tez çalışması kapsamında incelenen OODD numunesinin uluslararası standart metotlar kullanılarak fiziksel ve kimyasal kompozisyonu tespit edilmiştir. FFA miktarı standart titrimetrik metotla tayin edilmiş ve kütlece %88.57 ± 0.28 olarak tespit edilmiştir. IV değeri ise standart titrimetrik metotla tayin edilmiş ve 78.78 ± 0.82 olarak tespit edilmiştir.

OODD numunesinin birincil (A_{S232}) ve ikincil (A_{S270}) oksidasyon ürünlerinin tayini için standart titrimetrik metotla gerçekleştirilen çalışmada EVOO ve RAY da incelenmiş ve sonuçlar karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre OODD numunesinin A_{S232} değeri 6.52 ± 0.01 ve A_{S270} değeri ise 4.27 ± 0.01 olarak diğer numunelere göre yüksek miktarlarda tespit edilmiştir. Bu durum OODD numunesinin rafinasyon işlemi gereği hiperoksit, aldehit ve keton türevlerini yüksek miktarlarda bulundurduğunu göstermiştir.

Alfa-beta doymamış aldehit türlerinin oranının tayini için yapılan standart titrimetrik metotla gerçekleştirilen AV ve TV değeri tayininde OODD, EVOO ve RAY numuneleri karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir. En yüksek AV ve TV değerlerinin OODD numunesinde olduğu ve OODD numunesinin AV değerinin 85.37 ± 0.01 olarak diğer yağlara göre yüksek miktarlarda olduğu tespit edilmiştir. Bu durum OODD numunesinin rafinasyon işlemi gereği alfa-beta doymamış aldehit türevlerini yüksek miktarlarda bulundurduğunu göstermektedir. Deoderizasyon işleminin asıl amacı, yenilebilir yağların bünyelerinde bulunan oksidasyonu ürünlerinin uzaklaştırılması olduğundan deoderize distilatlardaki yüksek oksidatif madde miktarı normal

karşılanmalıdır. Ayrıca deoderize distilatlardaki yüksek oksidatif madde miktarı, deoderizasyon işleminin verimini de göstermesi açısından önemlidir.

OODD numunesinin ve karşılaştırma yapabilmek için EVOO numunesinin yağ asidi kompozisyonları standart GC metodu kullanılarak tayin edilmiştir. Sonuçlara göre yağ asidi kompozisyonu analizi yapılmış olan OODD ve EVOO numunelerinin yağ asidi yüzdelerinin birbiri ve literatürle uyumlu olduğu tespit edilmiştir. Özellikle C18:1, C16:0 ve C18:0 yağ asidi yüzdeleri, çalışma kapsamında analizi gerçekleştirilmiş olan OODD numunesinin zeytinyağına ait bir rafinasyondan elde edildiğini göstermektedir.

Çalışma kapsamında OODD numunesinin ve karşılaştırma yapabilmek için RSY numunesinin TG analizleri standart sıvı kromatografi metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yapılmış olan TG analizlerinde OODD numunesinde herhangi bir TG yapısı tespit edilememiştir. Deoderizasyon işleminin bir gereği olarak distilatlara az da olsa TG taşınması bekleniyorken; OODD numunesinin içerisinde tayin sınırının altında düşük konsantrasyonda TG tespit edilebilmiştir.

OODD numunesinin ve karşılaştırma yapabilmek için EVOO numunesinin polar ve apolar madde analizleri standart sıvı kromatografi metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Özellikle fiziksel rafinasyon sonucu elde edilen deoderize distilatlar, içerisinde bulunan tüm FFA'ların deoderizasyon basamağında uzaklaştırıldığı için yüksek FFA oranlarına sahip olmaktadırlar. OODD numunesinin apolar fraksiyonları incelendiğinde en yüksek apolar madde oranı FFA'dan %71.93 ± 0.24 olarak elde edilmiştir.

Çalışma kapsamında OODD numunesinin ve karşılaştırma yapabilmek için HPY numunesinin polimerik madde analizleri standart sıvı kromatografi metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Polar apolar madde analizi çalışmasında olduğu gibi OODD numunesinin polimerik madde fraksiyonları incelendiğinde en yüksek oran FFA'dan %76.16 ± 0.20 olarak elde edilmiştir.

OODD numunesinin tokoferol-tokotrienol miktarının tayini kapsamında yapılmış olan çalışmalarda standart sıvı kromatografi metodu kullanılmıştır. Özellikle yüksek oranda tokoferol içeren yenilebilir yağların deoderize distilatları tokoferol miktarınca zengin olmaktadır. Yapılmış olan çalışmada kullanılan OODD numunesinin toplam tokoferol miktarı da literatüre uygun ve yüksek bir miktarda 32449.17 ± 0.83 mg/kg olarak çıkmıştır. En yüksek değer özellikle E vitamini etkinliği ile bilinen α-tokoferolden

15413.14 ± 0.53 mg/kg olarak elde edilmiştir. Yapılmış olan çalışmalar neticesinde OODD numunesinde herhangi bir tokotrienol türü tespit edilememiştir.

Standart kromatografik metoda göre sabunlaştırılan ve silillenen OODD numunesinin içerdiği sterol türleri, GC-MS cihazı ile tespit edildikten sonra miktar tayini için daha hassas bir detektöre sahip GC-FID cihazı kullanılmıştır. Ede edilen sonuçlara göre OODD numunesinin toplam sterol miktarı literatüre uygun bir aralıkta 138.41 ± 2.67 mg/kg olarak çıkmıştır. En yüksek değer stigmasterol türünden 109.92 ± 2.04 olarak elde edilmiştir. OODD numunesinin içerdiği sterol türleri standart kromatografik metotla tayin edildikten sonra tespit edilen türler için HPLC sisteminde bir tayin metodu geliştirilmiştir. Bu amaçla hem en küçük kareler hem de standart ekleme modelleri kullanılmış ve her iki modelden elde edilen sonuçlara göre türleri belli olan sterol türlerinin geliştirilen HPLC metodu ile doğru bir şekilde tayin edilebileceği görülmüştür.

OODD numunesinin standart sıvı kromatografisi ile skualen miktarının tayini kapsamında yapılmış olan çalışmalarda ilk önce en küçük kareler metodu ardından da standart ekleme metodu kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre OODD numunesinin hem en küçük kareler hem de standart ekleme metodundan elde edilen değerlerinin birbirinden farklı olmadığı tespit edilmiştir. Özellikle yüksek oranda skualen içeren zeytin yağlarının deoderize distilatları skualen miktarınca zengin olmaktadır. Yapılmış olan çalışmada kullanılan OODD numunesinin skualen miktarı da 83454.84 ± 1.51 mg/kg olarak literatüre uygun bir aralıkta çıkmıştır.

Gerçekleştirilmiş olan bu tez çalışmasının birinci basamakta elde edilen verileri Çizelge 6.50'de tekrar verilmiştir.

Çizelge 6. 50. OODD numunesinin uluslararası standart metotlar kullanılarak tespit edilen kimyasal bileşimi ve karşılaştırılması

Kullanılan standart metot	**Bileşen**	**OODD ± SD** (Bu çalışmada)	**EVOO ± SD** (Bu çalışmada)	**TSE** (TSE 2004)	**COI** (COI 2015)	**CAC** (CAC 2015)	**OODD** (Literatürde)
AOAC1990	Nem miktarı	%0.87 ± 0.01	-	≤ %0.2	≤ %0.2	≤ %0.2	-
AOCS, Ca 5a-40	FFA	%88.57 ± 0.28	%0.76 ± 0.33	≤ %1.00	≤ %0.80	≤ %0.80	%50-90 (Naz ve ark 2012)
AOCS, Cd 1-25	IV	78.78 ± 0.82	-	78-88	-	75-94	-
Alfa Laval	Birincil ve ikincil oksidasyon ürünleri						
	As_{232}	6.52 ± 0.01	2.28 ± 0.01	-	≤ 2.50	≤ 2.50	-
	As_{270}	4.27 ± 0.00	0.20 ± 0.01	≤ 0.25	≤ 0.22	≤ 0.22	-
AOCS, Cd 8b-90	PV	15.74 ± 0.33	-	≤ 20.0	≤ 20.0	-	-
AOCS, Cd 18-90	AV	85.37 ± 0.01	3.41 ± 0.00	-	-	-	-
AOCS, Cd 8b-90, Cd 18-90	TV	116.85 ± 0.67	-	-	-	-	-
AOCS, Ce 5b-89	TG	te	-	-	-	-	-
EC, 14105	Yağ asit kompozisyonu						
	C14:0	-	-	≤ %0.05	≤ %0.03	%0.0-%0.05	Uygun (Gutiérrez ve ark 2014)
	C16:0	%10.42 ± 0.01	%11.41 ± 0.15	%7.5-%20.0	%7.5-%20.0	%7.5-%20.0	
	C16:1 cis9	%0.74 ± 0.01	%0.84 ± 0.11	%0.3-%3.5	%0.3-%3.5	%0.3-%3.5	
	C17:0	-	-	≤ %0.3	≤ %0.3	%0.0-%0.3	
	C17:1	-	-	≤ %0.3	≤ %0.3	%0.0-%0.3	
	C18:0	%2.81 ± 0.02	%3.07 ± 0.09	%0.5-%5.0	%0.5-%5.0	%0.5-%5.0	
	C18:1 cis9	%72.90 ± 0.00	%74.80 ± 0.13	%55.0-%83.0	%55.0-%83.0	%55.0-%83.0	
	C18:2 cis9,12	%9.71 ± 0.02	%8.19 ± 0.14	%3.5-%21.0	%2.5-%21.0	%3.5-%21.0	
	C20:0	%0.44 ± 0.04	%0.43 ± 0.10	≤ %0.6	≤ %0.6	%0.0-%0.6	
	C18:3 cis6,9,12	%0.59 ± 0.01	%0.54 ± 0.12	≤ %0.9	≤ %1.0	-	
	C22:0	%0.22 ± 0.02	%0.11 ± 0.13	≤ %0.2	≤ %0.2	%0.0-%0.2	

	C20:1	-	-	≤ %0.4	≤ %0.4	%0.0-%0.4	
	C20:3 cis11.14.17	%1.81 ± 0.00	%0.60 ± 0.08	-	-	-	
	C24:0	-	-	≤ %0.2	≤ %0.2	%0.0-%0.2	
	C24:1cis15	%0.36 ± 0.03	-	-	-	-	
	ΣSFA	%13.89	%15.02	-	-	-	
	ΣMUFA	%74.00	%75.64	-	-	-	
	ΣPUFA	%12.11	%9.33	-	-	-	
IUPAC	Apolar madde fraksiyonu						
	Fraksiyon Oranı	%94.40	%93.68	-	-	-	-
	PTGs	te	te	-	-	-	
	TGs	%0.54 ± 0.20	%91.74 ± 0.18	-	-	-	
	DGs	%0.54± 0.21	%3.91 ± 0.25	-	-	-	
	MGs	%0.74 ± 0.17	%2.51 ± 0.25	-	-	-	
	FFA	%98.18 ± 0.24	1.84 ± 0.24	-	-	-	
IUPAC	Polar madde fraksiyonu						
	Fraksiyon Oranı	%5.60	%6.32	-	-	-	-
	Oks. PTGs	te	te	-	-	-	
	Oks. TGs	%1.80 ± 0.20	%46.34 ± 0.12	-	-	-	
	Oks. DGs	%25.06 ± 0.21	%33.76 ± 0.11	-	-	-	
	Oks. MGs	%5.11 ± 0.17	%5.15 ± 0.09	-	-	-	
	Oks. FFA	%68.03 ± 0.24	%14.73 ± 0.21	-	-	-	
IUPAC	Polimerik madde türleri						
	PTGs	te	te	-	-	-	-
	TGs	%0.29 ± 0.26	%91.25 ± 0.31	-	-	-	
	DGs	%1.79 ± 0.22	%5.57 ± 0.21	-	-	-	
	MGs	%9.12 ± 0.23	%1.51 ± 0.23	-	-	-	

	FFA	%88.80 ± 0.20	%1.67 ± 0.18	-	-	-	
AOCS, Ce 8-89 / Agilent, 5991-2180EN	Tokoferol kompozisyonu						
	α-tokoferol	15413.14 ± 0.53 mg/kg	-	-	-	-	-
	β-tokoferol	3705.20 ± 1.33 mg/kg	-	-	-	-	-
	γ-tokoferol	12968.11 ± 1.44 mg/kg	-	-	-	-	-
	δ-tokoferol	361.92 ± 2.06 mg/kg	-	-	-	-	-
	Toplam tokoferol	32449.17 ± 0.83 mg/kg	219.57 ± 13.41	*	*	-	20000-150000 mg/kg (Verleyen ve ark 2001)
AOCS, Ce 8-89 / Agilent, 5991-2180EN	Tokotrienol kompozisyonu						
	α-tokotrienol	te	te	-	-	-	-
	β-tokotrienol	te	te	-	-	-	
	γ-tokotrienol	te	te	-	-	-	
	δ-tokotrienol	te	te	-	-	-	
	Toplam tokotrienol	te	te	-	-	-	
COI/T.20	Sterol kompozisyonu						
	Kampesterol	12.73 ± 0.54 mg/kg	3.53 ± 0.10	≤ %4.0 **	≤ %4.0 **	≤ %4.0 **	-
	Stigmasterol	109.92 ± 2.04 mg/kg	0.62 ± 0.10	***	***	****	-
	β-sitosterol	15.76 ± 0.40 mg/kg	66.91 ± 0.51	-	-	-	-
	Toplam sterol	138.41 ± 2.67 mg/kg	70.82 ± 0.68	≥ 1000.0 mg/kg	≥ 1000.0 mg/kg	≥ 1000.0 mg/kg	120-250 mg/kg (Gutiérrez ve ark 2014)
Agilent, 5991-2774EN	Skualen miktarı	83454.84 ± 1.51 mg/kg	2.090.51 ± 2.44	-	-	-	70.000-200.000 mg/kg

							(Cruz ve ark 2016)

te: Tespit edilemedi
*: Katılmasına izin verilmez
**: Toplam sterolün kütlece yüzdesi
***: Kampesterol için bulunan değer
****: Kampesterol kadar

Tez çalışmasının ikinci basamağında ise OODD numunesinin ve diğer DD numunelerinin %FFA miktarlarının kolay ve hızlı bir şekilde tayini için farklı IR spektroskopik tayin metotları geliştirilmiş ve bunlardan FT-NIR tekniği ile geliştirilen metodun, OODD numunesinin %FFA miktarını doğru bir şekilde tayin ettiği tespit edilmiştir.

Geliştirilmiş olan bir diğer FT-IR metodunda ise OODD numunesinin ve diğer DD numunelerinin iyot sayılarının kolay ve hızlı bir şekilde tayini için farklı IR spektroskopik tayin metotları geliştirilmiş ve bunlardan SB-ATR-FT-IR tekniği ile geliştirilen metodun, OODD numunesinin IV değerini doğru bir şekilde tayin ettiği tespit edilmiştir.

Geliştirilmiş olan bir diğer FT-IR metodunda ise EVOO'larının %FFA miktarının kantitatif olarak tayini için kemometrik metotlardan ve farklı ölçüm modlarına sahip FT-IR spektroskopisi tekniğinden faydalanılmış ve bu amaçla 12 farklı PLS kalibrasyon modeli geliştirilmiştir. Bu modellerden en iyi kalibrasyon değerlerine sahip olanının normal spektrumun kullanıldığı transmisyon modu olduğu tespit edilmiştir. Tez çalışması kapsamında geliştirilen PLS kalibrasyon modelinin, EVOO'larının %FFA miktarlarını hesap etmede güçlü bir metot olduğu görülmüştür.

Geliştirilmiş olan bir diğer FT-IR metodunda ise EVOO'larının diğer zeytinyağlarından ve yenilebilir yağlardan kolay ve hızlı bir şekilde ayırt edilebilmesi için PLS-DA modelinden faydalanılarak orta, yakın ve raman IR spektroskopik teknikleri karşılaştırılmıştır. Geliştirilen PLS-DA modellerinden elde edilen dendrogram ve benzerlik haritaları yorumlanmış ve EVOO'larının diğer zeytinyağlarından ve yenilebilir yağlardan ayırt edilebilmesini sağlamak için en başarılı tekniğin FT-NIR tekniği olduğu tespit edilmiştir.

Tez çalışmasının son basamağında ise monolitik kolon analizleri gerçekleştirilmiştir. Monolitik kolon kullanılarak geliştirilen ilk metot MA1 metodu ile herhangi bir ön işlem yapmadan numunelerin direk HPLC sistemine enjeksiyonu ile TG ve TG harici yapılar tayin edilebilmiştir. Bu sayede analizi yapılacak olan numunenin TG

kompoziyonu açığa çıkarılarak hangi yağ türü olduğu tespit edilebilmiştir. Geliştirilmiş olan metodun, OODD numunesine uygulanmasına rağmen EVOO ve diğer yağlar için de kullanılabilir olduğu tespit edilmiştir.

Monolitik kolon kullanılarak geliştirilen ikinci ve en önemli metot MA2 ile, her biri ayrı bir standart metotla tayin edilen sterol, tokotrienol, tokoferol ve skualen biyoaktif türleri, Araştırma Grubumuzca 3 boyutlu kromatografik ayırmalardan elde edilen bilgiler yardımıyla monolitik kolon kullanılarak tek boyutta ve tek bir analiz metoduyla tayin edilebilmiştir. İlgili metodun hareketli faz polaritesi (P'), hareketli faz akış hızı (mL/dk) ve kolon fırını sıcaklığı (^{o}C) gibi önemli parametreleri kemometrik yöntemler ve deneysel tasarımlardan faydalanılarak optimize edilmiştir. Hareketli faz olarak farklı oranlarda metanol-su kullanılmış ve bu şekilde analiz esnasında hareketli fazın polaritesi değiştirilebilmiştir. Standart maddelerle kalibrasyonu; OODD numunesi ile de validasyonu gerçekleştirilen MA2 metodunun, sabunlaştırılmış herhangi bir yenilebilir yağ ya da bir DD numunesinde bulunan tüm biyoaktif türleri başarılı bir şekilde, tek bir analizle ve yüksek doğrulukla tespit edebildiği görülmüştür.

7.2. Öneriler

Dünyada ve Ülkemizde her yıl milyonlarca ton ham yağ içerdiği safsızlıkların uzaklaştırılması amacıyla rafine edilmektedir. Ülkemizde ise senede 1.500.000 ton ham yağ, rafinasyon işlemine tabi tutulmakta ve bu proseste büyük miktarlarda önemli yan ürünler elde edilmektedir. Birçok biyoaktif bileşenin yağdan uzaklaşıp distilata geçtiği deoderizasyon kademesinde yağın %1'i kadar deoderize distilat (DD) oluşmaktadır. Başta küçük gibi görünen bu oranın, yılda rafine edilen yağ miktarı dikkate alındığında (15.000 ton) önemi anlaşılmaktadır. Zeytinyağı üretiminde lider ülkeler arasında olan ülkemizde direkt kullanımı uygun olmayan binlerce ton zeytinyağı fiziksel ya da kimyasal rafinasyon yöntemleriyle kullanıma uygun hale getirilmektedir. Deoderizasyon kademesinde meydana gelen OODD, FFA, sterol, tokotrienol, tokoferol ve skualen gibi her biri ayrı bir ticari öneme ve değere sahip önemli biyoaktif bileşenleri yüksek oranlarda içermektedir. Yüksek katma değere sahip olan ve genellikle ithal edilen bu önemli biyoaktif bileşenlerin kolay, hızlı, düşük maliyetli ve güvenilir bir biçimde analiz edilebilmeleri; ilgili maddelerin geri kazanılması ve değerli ürünlere dönüştürülmesi açısından ayrı bir öneme sahip olmaktadır. Yapılmış olan bu doktora tez çalışması

kapsamında OODD ve diğer yağların deoderize distilatlarının içerdiği biyoaktif türlerin kolay, hızlı, düşük maliyetli ve güvenilir bir biçimde analiz edilebilmeleri için mevcut standart metotlara alternatif olabileceği düşünülen spektroskopik ve kromatografik yeni metotlar geliştirilmiştir. Yapılmış olan bu çalışmanın sonuçları sadece analiz verilerini ihtiva etmemekte, aynı zamanda biyoaktif bileşenlerin izole edilip ayrılması ve ayrı ayrı değerlendirilmesini sağlayacak preparatif kromatografik sistemler için de çok etkili ayırma metotlarını önermektedir. Geliştirilmiş olan metotların uluslararası literatüre önemli katkıları olacağı ve bu metotların kullanılması ile başta ülkemiz olmak üzere tüm Dünya'da faaliyet gösteren yemeklik yağ endüstrilerine önemli faydaları olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Abdalla AEM, 1999. Antioxidative effect of olive oil deodorizer distillate on frying oil and quality of potato chips. Lipid / Fett, 101, 2, 57-63.

Agilent, (2016). Determination of squalene in virgin olive oil. ABD, Agilent. **5991-2774EN**.

Agilent, (2016). Quantification of tocopherols and tocotrienols in virgin olive oil using the Agilent 1260 Infinity Bio-inert Quaternary LC system. ABD, Agilent. **5991-2180EN**.

Akgün NA, 2011. Separation of squalene from olive oil deodorizer distillate using supercritical fluids. European Journal of Lipid Science and Technology, 113, 12, 1558-65.

AOAC, (1990). Determination of Moisture Content in Edible Oils. Arlington, Association of Official Analytical Chemists.

AOCS, (2017). AOCS Official Method: Free Fatty Acids in Crude and Refined Fats and Oils. Urbana, IL, American Oil Chemists' Society. **Ca 5a-40**.

AOCS, (2017). AOCS Official Method: Iodine Value of Fats and Oils, Wijs Method. Urbana, IL, American Oil Chemists' Society. **Cd 1-25**.

AOCS, (2017). AOCS Official Method: p-Anisidine Value. Urbana, IL, American Oil Chemists' Society. **Cd 18-90**.

AOCS, (2017). AOCS Official Method: Tocopherols and Tocotrienols in Vegetable Oils and Fats by HPLC. Urbana, IL, American Oil Chemists' Society. **Ce 8-89**.

AOCS, (2017). AOCS Official Method: Triglycerides in Vegetable Oils by HPLC. Urbana, IL, American Oil Chemists' Society. **Ce 5b-89**.

Aparicio R, Luna G, 2002. Characterisation of monovarietal virgin olive oils. European Journal of Lipid Science and Technology, 104, 9-10, 614-27.

Apers S, Naessens T, Van Den Steen K, Cuyckens F, Claeys M, Pieters L, Vlietinck A, 2004. Fast high-performance liquid chromatography method for quality control of soy extracts. Journal of Chromatography A, 1038, 1, 107-12.

Arapitsas P, Turner C, 2008. Pressurized solvent extraction and monolithic column-HPLC/DAD analysis of anthocyanins in red cabbage. Talanta, 74, 5, 1218-23.

Arslan FN, 2009. Ülkemizde Üretilen Pamuk Yağlarının Rafinasyonunun İyileştirilmesiyle Kullanım Verimliliklerinin Artırılması, Selçuk Üniversitesi, Konya.

Ayyıldız HF, 2010. Otomatikleştirilmiş Akış Enjeksiyon Sistemleriyle Yağ Analiz Metotlarının Geliştirilmesi, Selçuk University, Konya.

Azizian H, Mossoba MM, Fardin-Kia AR, Delmonte P, Karunathilaka SR, Kramer JKG, 2015. Novel, Rapid Identification, and Quantification of Adulterants in Extra Virgin Olive Oil Using Near-Infrared Spectroscopy and Chemometrics. Lipids, 50, 7, 705-18.

Baccouri B, Zarrouk W, Baccouri O, Guerfel M, Nouairi I, Krichene D, Daoud D, Zarrouk M, 2008. Composition, quality and oxidative stability of virgin olive oils

from some selected wild olives (Olea europaea L. subsp. oleaster). 2008, 59, 4, 6.

Ballesta-Claver J, Valencia MC, Rostagno LF, Palma M, Barroso CG, 2007. Anal. Chim. Acta, 582, 243.

Ballus CA, Meinhart AD, de Souza Campos FA, da Silva LFdO, de Oliveira AF, Godoy HT, 2014. A quantitative study on the phenolic compound, tocopherol and fatty acid contents of monovarietal virgin olive oils produced in the southeast region of Brazil. Food Research International, 62, Supplement C, 74-83.

Baydar H, 2000. Bitkilerde yağ sentezi, kalitesi ve kaliteyi artırmada ıslahın önemi. Ekin Dergisi, 11, 50-7.

Beltrán G, Jiménez A, del Rio C, Sánchez S, Martínez L, Uceda M, Aguilera MP, 2010. Variability of vitamin E in virgin olive oil by agronomical and genetic factors. Journal of Food Composition and Analysis, 23, 6, 633-9.

Bendini A, Cerretani L, Vecchi S, Carrasco-Pancorbo A, Lercker G, 2006. Protective Effects of Extra Virgin Olive Oil Phenolics on Oxidative Stability in the Presence or Absence of Copper Ions. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54, 13, 4880-7.

Bewig KM, Clarke AD, Roberts C, Unklesbay N, 1994. Discriminant analysis of vegetable oils by near-infrared reflectance spectroscopy. Journal of the American Oil Chemists' Society, 71, 2, 195-200.

Bezerra MA, Santelli RE, Oliveira EP, Villar LS, Escaleira LA, 2008. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. Talanta, 76, 5, 965-77.

Biesaga M, Ochnik U, Pyrzynska K, 2007. Analysis of phenolic acids in fruits by HPLC with monolithic columns. Journal of Separation Science, 30, 17, 2929-34.

Bignardi C, Elviri L, Penna A, Careri M, Mangia A, 2010. Particle-packed column versus silica-based monolithic column for liquid chromatography–electrospray-linear ion trap-tandem mass spectrometry multiallergen trace analysis in foods. Journal of Chromatography A, 1217, 48, 7579-85.

Bondioli P, Mariani C, Lanzani A, Fedeli E, Muller A, 1993. Squalene recovery from olive oil deodorizer distillates. Journal of the American Oil Chemists' Society, 70, 8, 763-6.

Borràs E, Mestres M, Aceña L, Busto O, Ferré J, Boqué R, Calvo A, 2015. Identification of olive oil sensory defects by multivariate analysis of mid infrared spectra. Food Chemistry, 187, Supplement C, 197-203.

Boskou D, 2006. Analysis and Authentication. In: Olive Oil Chemistry and Technology. Eds: Angerosa F, Campestre C, Giansante L, Second Edition. Champaign, Illinois: AOCS Press, p. 113-72.

Boskou D, 2006. Characteristics of the Olive Tree and Olive Fruit. In: Olive Oil Chemistry and Technology. Eds: Boskou D, Second Edition. Champaign, Illinois: AOCS Press, p. 13-9.

Boskou D, 2006. The Culture of the Olive Tree (Meditrranean world). In: Olive Oil Chemistry and Technology. Eds: Polymerou-Kamilakis A, Second Edition. Champaign, Illinois: AOCS Press, p. 1-12.

Boskou D, 2006. Olive Oil Composition. In: Olive Oil Chemistry and Technology. Eds: Boskou D, Blekas G, Tsimidou M, Second Edition. Champaign, Illinois: AOCS Press, p. 41-72.

Boskou D, 2006. Olive Oil in the World Market. In: Olive Oil Chemistry and Technology. Eds: Zampounis V, Second Edition. Champaign, Illinois: AOCS Press, p. 21-39.

Boskou D, Morton ID, 1975. Changes in the sterol composition of olive oil on heating. Journal of the Science of Food and Agriculture, 26, 8, 1149-53.

Brereton RG, 1997. Multilevel Multifactor Designs for MultivariateCalibration. Analyst, 122, 12, 1521-9.

Cabrera K, 2004. Applications of silica-based monolithic HPLC columns. Journal of Separation Science, 27, 10-11, 843-52.

CAC, (2015). Standard for Olive Oils and Pomace Oils Codex Alimentarius Commission. **CODEX STAN 33-1981**.

Calapaj R, Chiricosta S, Saija G, 1993. Evaluation of Gas Chromatographic and Spectrophotometric Analytical Results to Check the Presence of Seed Oils in Olive Oil Samples. Riv. Ital. Sost. Grasse, 70, 585-94.

Can NO, Arli G, Lafci Y, 2011. A novel RP-HPLC method for simultaneous determination of potassium sorbate and sodium benzoate in soft drinks using C 18-bonded monolithic silica column. Journal of Separation Science, 34, 16-17, 2214-22.

Cañabate-Díaz B, Segura Carretero A, Fernández-Gutiérrez A, Belmonte Vega A, Garrido Frenich A, Martínez Vidal JL, Duran Martos J, 2007. Separation and determination of sterols in olive oil by HPLC-MS. Food Chemistry, 102, 3, 593-8.

Carmona MA, Jiménez C, Jiménez-Sanchidrián C, Peña F, Ruiz JR, 2010. Isolation of sterols from sunflower oil deodorizer distillate. Journal of Food Engineering, 101, 2, 210-3.

Cavalli J-F, Fernandez X, Lizzani-Cuvelier L, Loiseau A-M, 2003. Comparison of Static Headspace, Headspace Solid Phase Microextraction, Headspace Sorptive Extraction, and Direct Thermal Desorption Techniques on Chemical Composition of French Olive Oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 26, 7709-16.

Cert A, Alba J, León-Camacho M, Moreda W, Pérez-Camino MC, 1996. Effects of Talc Addition and Operating Mode on the Quality and Oxidative Stability of Virgin Olive Oils Obtained by Centrifugation. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44, 12, 3930-4.

Che Man YB, Ammawath W, Mirghani MES, 2005. Determining α-tocopherol in refined bleached and deodorized palm olein by Fourier transform infrared spectroscopy. Food Chemistry, 90, 1, 323-7.

Chen H, Angiuli M, Ferrari C, Tombari E, Salvetti G, Bramanti E, 2011. Tocopherol speciation as first screening for the assessment of extra virgin olive oil quality by reversed-phase high-performance liquid chromatography/fluorescence detector. Food Chemistry, 125, 4, 1423-9.

Chocholouš P, Šatínský D, Sladkovský R, Pospíšilová M, Solich P, 2008. Determination of pesticides fenoxycarb and permethrin by sequential injection chromatography using miniaturized monolithic column. Talanta, 77, 2, 566-70.

COI, (2001). International Olive Oil Council Official Method: Determination of Stigmastadienes in Vegetable Oils. Madrid, International Olive Oil Council. **COI/T.20/Doc. No. 11/Rev. 2**.

COI, (2010). International Olive Oil Council Official Method: Determination of The Composition and Content of Sterols by Capillary-Column Gas Chromatography. Madrid, Spain, International Olive Oil Council. **COI/T.20**.

COI, (2015). Trade Standard Applying to Olive oils and Olive-Pomace Oils. Madrid, Spain, International Olive Oil Council. **COI/T.15/NC No 3/Rev.8**.

Conte L, Caboni M, Lercker G, 1993. Olive Oils Produced in Romagne. Note 1. Oils From Lamone River Valley. Riv. Ital. Sost. Grasse, 70, 157-60.

Cruz MV, Araújo D, Alves VD, Freitas F, Reis MAM, 2016. Characterization of medium chain length polyhydroxyalkanoate produced from olive oil deodorizer distillate. International Journal of Biological Macromolecules, 82, 243-8.

de Souza LM, de Santana FB, Gontijo LC, Mazivila SJ, Borges Neto W, 2015. Quantification of adulterations in extra virgin flaxseed oil using MIR and PLS. Food Chemistry, 182, Supplement C, 35-40.

Demirci M, 2005. Beslenme, İstanbul, Onur Grafik Yayıncılık, p. 79-91.

Dobarganes MC, Velasco J, Dieffenbacher A, (2000). Determination of polar compounds, polymerized and oxidized triacylglycerols, and diacylglycerols in oils and fats: results of collaborative studies and the standardized method (Technical report). Pure and Applied Chemistry. **72:** 1563.

Dumont M-J, Narine SS, 2007. Soapstock and deodorizer distillates from North American vegetable oils: Review on their characterization, extraction and utilization. Food Research International, 40, 8, 957-74.

EC, (2011). Determination of free and total glycerol and mono, di, and triglyceride contents. Brussels, European Committee for Standardization. **14105**.

EC Regulation 2568, (1991). Communities CotE, Official Journal of the European Communities. **2568/91**.

Eghbali H, Sandra K, Detobel F, Lynen F, Nakanishi K, Sandra P, Desmet G, 2011. Performance evaluation of long monolithic silica capillary columns in gradient liquid chromatography using peptide mixtures. Journal of Chromatography A, 1218, 21, 3360-6.

Esti M, Cinquanta L, Carrone A, 1996. Anti-oxidative Compounds and Quality Parameters in Virgin Olive Oils Produced in Molise. Riv. Ital. Sost. Grasse, 73, 147-50.

Evans HM, Emerson OH, Emerson GA, 1974. The Isolation From Wheat Germ Oil Of An Alcohol, A-Tocopherol, Having The Properties Of Vitamın E. Nutrition Reviews, 32, 3, 80-2.

Fedeli E, Cortesi N, 1993. Quality, Origin and Technology of Virgin Olive Oils. Riv. Ital. Sost. Grasse, 70, 419-26.

Frega N, Bocci, F., Lercker, G. , 1993. Free Fatty Acids and Diacylglycerols as Quality Parameters for Extra Virgin Olive Oil. Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse, 70, 153-6.

Fujimoto C, 1995. Charged Polyacrylamide Gels for Capillary Electrochromatographic Separations of Uncharged, Low Molecular Weight Compounds. Analytical Chemistry, 67, 13, 2050-3.

Fuller MP, Ritter GL, Draper CS, 1988. Partial Least-Squares Quantitative Analysis of Infrared Spectroscopic Data. Part I: Algorithm Implementation. Applied Spectroscopy, 42, 2, 217-27.

Gadoth N, 2008. On fish oil and omega-3 supplementation in children: The role of such supplementation on attention and cognitive dysfunction. Brain and Development, 30, 5, 309-12.

Gemperline P, 2006. Practical Guide To Chemometrics, Second Edition, Boca Raton, CRC Press, p.

Gouvinhas I, de Almeida JMMM, Carvalho T, Machado N, Barros AIRNA, 2015. Discrimination and characterisation of extra virgin olive oils from three cultivars in different maturation stages using Fourier transform infrared spectroscopy in tandem with chemometrics. Food Chemistry, 174, Supplement C, 226-32.

Grams G, Eskins K, 1972. Dye-sensitized Photoxidation of Tocopherols: Correlation Between Singlet Oxygen Reactivity and Vitamin E Activity. Biochemistry, 11, 606-8.

Grob K, Lanfranchi M, Mariani C, 1990. Evaluation of olive oils through the fatty alcohols, the sterols and their esters by coupled LC-GC. Journal of the American Oil Chemists' Society, 67, 10, 626-34.

Guiochon G, 2007. Monolithic columns in high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography A, 1168, 1, 101-68.

Gunawan S, Kasim NS, Ju Y-H, 2008. Separation and purification of squalene from soybean oil deodorizer distillate. Separation and Purification Technology, 60, 2, 128-35.

Gurdeniz G, Ozen B, 2009. Detection of adulteration of extra-virgin olive oil by chemometric analysis of mid-infrared spectral data. Food Chemistry, 116, 2, 519-25.

Gusev I, Huang X, Horváth C, 1999. Capillary columns with in situ formed porous monolithic packing for micro high-performance liquid chromatography and capillary electrochromatography. Journal of Chromatography A, 855, 1, 273-90.

Gutiérrez MC, Siles JA, Chica AF, Martín MA, 2014. Kinetics of biofuel generation from deodorizer distillates derived from the physical refining of olive oil and squalene recovery. Biomass and Bioenergy, 62, Supplement C, 93-9.

Haaland DM, Thomas EV, 1988. Partial least-squares methods for spectral analyses. 1. Relation to other quantitative calibration methods and the extraction of qualitative information. Analytical Chemistry, 60, 11, 1193-202.

Havuz T, 2007. Anod çamurundaki kurşunun sodyum karbonatlı ortamda giderilmesi, Atatürk Üniversitesi, Erzurum.

Hench LL, West JK, 1990. The sol-gel process. Chemical Reviews, 90, 1, 33-72.

Hernández EJ, Luna P, Stateva RP, Najdanovic-Visak V, Reglero G, Fornari T, 2011. Liquid−Liquid Phase Transition of Mixtures Comprising Squalene, Olive Oil, and Ethyl Lactate: Application to Recover Squalene from Oil Deodorizer Distillates. Journal of Chemical & Engineering Data, 56, 5, 2148-52.

Hirri A, Bassbasi M, Platikanov S, Tauler R, Oussama A, 2016. FTIR Spectroscopy and PLS-DA Classification and Prediction of Four Commercial Grade Virgin Olive Oils from Morocco. Food Analytical Methods, 9, 4, 974-81.

Hirri A, Bassbasi M, Souhassou S, Kzaiber F, Oussama A, 2016. Prediction of Polyphenol Fraction in Virgin Olive Oil Using Mid-Infrared Attenuated Total Reflectance Attenuated Total Reflectance Accessory–Mid-Infrared Coupled With Partial Least Squares Regression. International Journal of Food Properties, 19, 7, 1504-12.

Hjertén S, Liao J-L, Zhang R, 1989. High-performance liquid chromatography on continuous polymer beds. Journal of Chromatography A, 473, Supplement C, 273-5.

Hoehler D, Frohlich AA, Marquardt RR, Stelsovsky H, 1998. Extraction of α-Tocopherol from Serum Prior to Reversed-Phase Liquid Chromatography. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46, 3, 973-8.

Holen B, 1985. Rapid separation of free sterols by reversed-phase high performance liquid chromatography, p.

Ismail AA, van de Voort FR, Sedman J, 1997. Chapter 4 Fourier transform infrared spectroscopy: Principles and applications. In: Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry. Eds: Paré JRJ, Bélanger JMR: Elsevier, p. 93-139.

Itoh T, Tamura T, Matsumoto T, 1973. Sterol composition of 19 vegetable oils. Journal of the American Oil Chemists Society, 50, 4, 122-5.

Itoh T, Yoshida K, Yatsu T, Tamura T, Matsumoto T, Spencer GF, 1981. Triterpene alcohols and sterols of Spanish olive oil. Journal of the American Oil Chemists Society, 58, 4, 545-50.

Jandera P, 2013. Advances in the development of organic polymer monolithic columns and their applications in food analysis—A review. Journal of Chromatography A, 1313, Supplement C, 37-53.

Kara H, (2008). Yağ Rafinasyon Teknikleri Dersi Sunumu. Konya, Selçuk Üniversitesi.

Karageorgou EG, Samanidou VF, 2010. Application of ultrasound-assisted matrix solid-phase dispersion extraction to the HPLC confirmatory determination of cephalosporin residues in milk. Journal of Separation Science, 33, 17-18, 2862-71.

Kasim NS, Gunawan S, Ju Y-H, 2009. Isolation and identification of steroidal hydrocarbons in soybean oil deodorizer distillate. Food Chemistry, 117, 1, 15-9.

Khayoon WS, Saad B, Lee TP, Salleh B, 2012. High performance liquid chromatographic determination of aflatoxins in chilli, peanut and rice using silica based monolithic column. Food Chemistry, 133, 2, 489-96.

Kiosseoglou V, Kouzounas P, 1993. The Role Of Diglycerides, Monoglycerides, And Free Fatty Acids In Olive Oil Minor Surface-Active Lipid Interaction With Proteins At Oil-Water Interfaces. Journal of Dispersion Science and Technology, 14, 5, 527-39.

Yağ İşleme Teknolojisi, 2015. Erişim. Erişim adresi, http://content.lms.sabis.sakarya.edu.tr/Uploads/78014/28280/ya%C4%9F_analizleri_1_ve_2._hafta.pdf.

Konishi J, Fujita K, Nakanishi K, Hirao K, 2006. Monolithic TiO2 with Controlled Multiscale Porosity via a Template-Free Sol−Gel Process Accompanied by Phase Separation. Chemistry of Materials, 18, 25, 6069-74.

Kornfeldt A, Croon L-B, 1981. 4-demethyl-,4-monomethyl-and 4.4-dimethylsterols in some vegetable oils. Lipids, 16, 5, 306-14.

Lanzón A, Albi T, Cert A, Gracián J, 1994. The hydrocarbon fraction of virgin olive oil and changes resulting from refining. Journal of the American Oil Chemists' Society, 71, 3, 285-91.

Laval A, (1995). General Manual MA, Alfa Laval Separation. **0901**.

Lechner M, Reiter B, Lorbeer E, 1999. Determination of tocopherols and sterols in vegetable oils by solid-phase extraction and subsequent capillary gas chromatographic analysis. Journal of Chromatography A, 857, 1, 231-8.

Leone AM, Santoro, M., Liuzzi, V.A., Notte, E. la, et al., 1988. The Structure of Diglycerides and Their Occurrence in Olive Oils as a Means to Characterize High Quality Products. Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse Journal, 65, 613-22.

Lerma-García MJ, Ramis-Ramos G, Herrero-Martínez JM, Simó-Alfonso EF, 2010. Authentication of extra virgin olive oils by Fourier-transform infrared spectroscopy. Food Chemistry, 118, 1, 78-83.

Li-Chan ECY, Ismail AA, Sedman J, van de Voort FR, 2006. Vibrational Spectroscopy of Food and Food Products. In: Handbook of Vibrational Spectroscopy. Eds: John Wiley & Sons, Ltd, p.

Lísa M, Holčapek M, Sovová H, 2009. Comparison of various types of stationary phases in non-aqueous reversed-phase high-performance liquid chromatography–mass spectrometry of glycerolipids in blackcurrant oil and its enzymatic hydrolysis mixture. Journal of Chromatography A, 1216, 47, 8371-8.

Litridou M, Linssen J, Schols H, Bergmans M, Posthumus M, Tsimidou M, Boskou D, 1997. Phenolic Compounds in Virgin Olive Oils: Fractionation by Solid Phase Extraction and Antioxidant Activity Assessment. Journal of the Science of Food and Agriculture, 74, 2, 169-74.

Liu Z-S, Zheng C, Yan C, Gao R-Y, 2007. Molecularly imprinted polymers as a tool for separation in CEC. ELECTROPHORESIS, 28, 1-2, 127-36.

Lukić M, Lukić I, Krapac M, Sladonja B, Piližota V, 2013. Sterols and triterpene diols in olive oil as indicators of variety and degree of ripening. Food Chemistry, 136, 1, 251-8.

Lundstedt T, Seifert E, Abramo L, Thelin B, Nyström Å, Pettersen J, Bergman R, 1998. Experimental design and optimization. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 42, 1, 3-40.

Machado M, Machado N, Gouvinhas I, Cunha M, de Almeida JMMM, Barros AIRNA, 2015. Quantification of Chemical Characteristics of Olive Fruit and Oil of cv Cobrançosa in Two Ripening Stages Using MIR Spectroscopy and Chemometrics. Food Analytical Methods, 8, 6, 1490-8.

Malik A, 2002. Advances in sol-gel based columns for capillary electrochromatography: Sol-gel open-tubular columns. ELECTROPHORESIS, 23, 22-23, 3973-92.

Man YBC, Moh MH, 1998. Determination of free fatty acids in palm oil by near-infrared reflectance spectroscopy. Journal of the American Oil Chemists' Society, 75, 5, 557-62.

Manchón N, D'Arrigo M, García-Lafuente A, Guillamón E, Villares A, Martínez JA, Ramos A, Rostagno MA, 2011. Comparison of different types of stationary phases for the analysis of soy isoflavones by HPLC. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 400, 5, 1251-61.

Manzi P, Panfili G, Esti M, Pizzoferrato L, 1998. Natural antioxidants in the unsaponifiable fraction of virgin olive oils from different cultivars. Journal of the Science of Food and Agriculture, 77, 1, 115-20.

Mariani C, Bellan G, Grob K, 1995. On the Complexity of Sterol Fraction in Edible Fats and Oils Separation of "campesterol" Into Two epimers. Riv. Ital. Sost. Grasse, 72, 97-104.

Mariani C, Bellan G, Venturini S, 1998. The Presence of Esterified Erythrodiol in Olive Oils. Riv. Ital. Sost. Grasse, 75, 279-86.

Martins PF, Ito VM, Batistella CB, Maciel MRW, 2006. Free fatty acid separation from vegetable oil deodorizer distillate using molecular distillation process. Separation and Purification Technology, 48, 1, 78-84.

Mateos R, Espartero JL, Trujillo M, Ríos JJ, León-Camacho M, Alcudia F, Cert A, 2001. Determination of Phenols, Flavones, and Lignans in Virgin Olive Oils by Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Ultraviolet Detection. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49, 5, 2185-92.

MEB, (2012). Yemeklik Yağların Analizleri: Peroksit Sayısı. Ankara, TR, Milli Eğitim Bakanlığı. **541GI0123**.

Mendes MF, Pessoa FLP, Uller AMC, 2002. An economic evaluation based on an experimental study of the vitamin E concentration present in deodorizer distillate of soybean oil using supercritical CO2. The Journal of Supercritical Fluids, 23, 3, 257-65.

Mendes TO, da Rocha RA, Porto BLS, de Oliveira MAL, dos Anjos VdC, Bell MJV, 2015. Quantification of Extra-virgin Olive Oil Adulteration with Soybean Oil: a Comparative Study of NIR, MIR, and Raman Spectroscopy Associated with Chemometric Approaches. Food Analytical Methods, 8, 9, 2339-46.

Merck, (2010). Speed and Performance in Monolithic Form. Chromolith® HPLC Columns.

Miller M, (2016). Oxidation of food grade oils. Chemistry TOFSGotNZIo.

Minakuchi H, Nakanishi K, Soga N, Ishizuka N, Tanaka N, 1998. Effect of domain size on the performance of octadecylsilylated continuous porous silica columns in

reversed-phase liquid chromatography. Journal of Chromatography A, 797, 1, 121-31.

Moore JC, Spink J, Lipp M, 2012. Development and Application of a Database of Food Ingredient Fraud and Economically Motivated Adulteration from 1980 to 2010. Journal of Food Science, 77, 4, R118-R26.

Morchio G, Anreis RD, Fedeli E, 1987. Investigations of Total Sterols Content in the Olive Oil and Their Variation During Refining Process. Riv. Ital. Sost. Grasse, 64, 185-92.

Morgan E, 1991. Experimental Design Analytical Chemistry by Open Learning, John Wiley and Son, p.

Nagao T, Kobayashi T, Hirota Y, Kitano M, Kishimoto N, Fujita T, Watanabe Y, Shimada Y, 2005. Improvement of a process for purification of tocopherols and sterols from soybean oil deodorizer distillate. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 37, 1, 56-62.

Naz S, Hussain Sherazi Syed T, Talpur Farah N, Kara H, Uddin S, Khaskheli R, (2014). Chemical Characterization of Canola and Sunflower Oil Deodorizer Distillates. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences. **64:** 115.

Naz S, Sherazi ST, Naz F, Mahesar S, Kara H, 2012. Rapid Determination of Free Fatty Acid Content in Waste Deodorizer Distillates Using Single Bounce-Attenuated Total Reflectance-FTIR Spectroscopy, p.

Naz S, Sherazi STH, Talpur FN, Talpur MY, Kara H, 2012. Determination of Unsaponifiable Constituents of Deodorizer Distillates by GC–MS. Journal of the American Oil Chemists' Society, 89, 6, 973-7.

Nema T, Chan ECY, Ho PC, 2014. Applications of monolithic materials for sample preparation. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 87, Supplement C, 130-41.

Nikolaos, (2010). Panoramio.

Nunes CA, 2014. Vibrational spectroscopy and chemometrics to assess authenticity, adulteration and intrinsic quality parameters of edible oils and fats. Food Research International, 60, Supplement C, 255-61.

Onyx, (2010). Monolithic HPLC Columns.

Otto M, 2007. Chemometrics, Chichester, John Wiley & Sons, p.

Palm A, Novotny MV, 1997. Macroporous Polyacrylamide/Poly(ethylene glycol) Matrixes as Stationary Phases in Capillary Electrochromatography. Analytical Chemistry, 69, 22, 4499-507.

Pearson GF, Greenway GM, Brima EI, Haris PI, 2007. Rapid arsenic speciation using ion pair LC-ICPMS with a monolithic silica column reveals increased urinary DMA excretion after ingestion of rice. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 22, 4, 361-9.

Pennock JF, Hemming FW, Kerr JD, 1964. A reassessment of tocopherol chemistry. Biochemical and Biophysical Research Communications, 17, 5, 542-8.

Peters EC, Petro M, Svec F, Fréchet JMJ, 1997. Molded Rigid Polymer Monoliths as Separation Media for Capillary Electrochromatography. Analytical Chemistry, 69, 17, 3646-9.

Peters EC, Petro M, Svec F, Fréchet JMJ, 1998. Molded Rigid Polymer Monoliths as Separation Media for Capillary Electrochromatography. 1. Fine Control of Porous Properties and Surface Chemistry. Analytical Chemistry, 70, 11, 2288-95.

Peters EC, Petro M, Svec F, Fréchet JMJ, 1998. Molded Rigid Polymer Monoliths as Separation Media for Capillary Electrochromatography. 2. Effect of Chromatographic Conditions on the Separation. Analytical Chemistry, 70, 11, 2296-302.

Petr S, Dalibor S, Martin O, Radek S, Petr S, 2009. Rapid and Simple Determination of Vitamin A and Vitamin E in Human Plasma by Column-Switching High-Performance Liquid Chromatography. Current Analytical Chemistry, 5, 4, 311-5.

Picard RR, Cook RD, 1984. Cross-Validation of Regression Models. Journal of the American Statistical Association, 79, 387, 575-83.

Pól J, Hyötyläinen T, Ranta-Aho O, Riekkola M-L, 2004. Determination of lycopene in food by on-line SFE coupled to HPLC using a single monolithic column for trapping and separation. Journal of Chromatography A, 1052, 1, 25-31.

Posada LR, Shi J, Kakuda Y, Xue SJ, 2007. Extraction of tocotrienols from palm fatty acid distillates using molecular distillation. Separation and Purification Technology, 57, 2, 220-9.

Ranalli A, Angerosa F, 1996. Integral centrifuges for olive oil extraction. The qualitative characteristics of products. Journal of the American Oil Chemists' Society, 73, 4, 417-22.

Randon J, Huguet S, Piram A, Puy G, Demesmay C, Rocca J-L, 2006. Synthesis of zirconia monoliths for chromatographic separations. Journal of Chromatography A, 1109, 1, 19-25.

Ren J, Du Z-J, Zhang C, Li H-Q, 2006. Macroporous Titania Monolith Prepared via Sol-gel Process with Polymer Foam as the Template. Chinese Journal of Chemistry, 24, 7, 955-60.

Repollés C, Herrero-Martínez JM, Ràfols C, 2006. Analysis of prominent flavonoid aglycones by high-performance liquid chromatography using a monolithic type column. Journal of Chromatography A, 1131, 1, 51-7.

Rieux L, Niederländer H, Verpoorte E, Bischoff R, 2005. Silica monolithic columns: Synthesis, characterisation and applications to the analysis of biological molecules. Journal of Separation Science, 28, 14, 1628-41.

Rocha Â, Lourenço NMT, Vidinha P, Simões P, Paiva A, 2014. Separation of free fatty acids from deodorizer distillates using choline hydrogen carbonate and supercritical carbon dioxide. Separation and Purification Technology, 131, Supplement C, 14-8.

Rodríguez-Nogales JM, del Alamo M, García MC, Cifuentes A, Marina ML, 2009. Ultrarapid Quantitation of Maize Proteins by Perfusion and Monolithic Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57, 8, 3014-21.

Rohman A, Che Man YB, Yusof FM, 2014. The Use of FTIR Spectroscopy and Chemometrics for Rapid Authentication of Extra Virgin Olive Oil. Journal of the American Oil Chemists' Society, 91, 2, 207-13.

Rohman A, Man YBC, 2010. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for analysis of extra virgin olive oil adulterated with palm oil. Food Research International, 43, 3, 886-92.

Salvador MD, Aranda F, Fregapane G, 1998. Chemical composition of commercial cornicabra virgin olive oil from 1995/96 and 1996/97 crops. Journal of the American Oil Chemists' Society, 75, 10, 1305-11.

Šefčik J, McCormick AV, 1997. Kinetic and thermodynamic issues in the early stages of sol-gel processes using silicon alkoxides. Catalysis Today, 35, 3, 205-23.

Shakya R, Navarre DA, 2006. Rapid Screening of Ascorbic Acid, Glycoalkaloids, and Phenolics in Potato Using High-Performance Liquid Chromatography. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54, 15, 5253-60.

Shao P, Jiang ST, Ying YJ, 2007. Optimization of Molecular Distillation for Recovery of Tocopherol from Rapeseed Oil Deodorizer Distillate Using Response Surface and Artificial Neural Network Models. Food and Bioproducts Processing, 85, 2, 85-92.

Sinelli N, Casale M, Di Egidio V, Oliveri P, Bassi D, Tura D, Casiraghi E, 2010. Varietal discrimination of extra virgin olive oils by near and mid infrared spectroscopy. Food Research International, 43, 8, 2126-31.

Tanaka N, Kobayashi H, Ishizuka N, Minakuchi H, Nakanishi K, Hosoya K, Ikegami T, 2002. Monolithic silica columns for high-efficiency chromatographic separations. Journal of Chromatography A, 965, 1, 35-49.

Tarhan İ, 2011. Hümik Maddelerin Bazı Biyokimyasal Kaynaklardan Ekstraksiyonu ve Akış Enjeksiyon Sistemleriyle Tayin Metotlarının Geliştirilmesi, Selçuk Üniversitesi, Konya.

Tarhan İ, Ismail AA, Kara H, 2017. Quantitative determination of free fatty acids in extra virgin olive oils by multivariate methods and Fourier transform infrared spectroscopy considering different absorption modes. International Journal of Food Properties, 20, sup1, S790-S7.

Tasioula-Margari M, Okogeri O, 2001. Simultaneous determination of phenolic compounds and tocopherols in virgin olive oil using HPLC and UV detection. Food Chemistry, 74, 3, 377-83.

Tena N, Wang SC, Aparicio-Ruiz R, García-González DL, Aparicio R, 2015. In-Depth Assessment of Analytical Methods for Olive Oil Purity, Safety, and Quality Characterization. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 63, 18, 4509-26.

Tio C, 1996. World Olive Encyclopaedia, Madrid, International Olive Oil Council, p. 389-403.

TSE, (2004). TS 341 Yemeklik Zeytinyağı Standardı, Türk Standartları Enstitüsü. **TS 341**.

Tswett MS, 1903. On the New Category of Adsorption Phenomena and their Applications in Biochemical Analysis, Eschwegen, Woelm, p.

Tswett MS, 1910. Chromophylls in the Plant and AnimalWorld, Poland, Soviet Academy of Science, p.

Tswett MS, Senchenkova EM, 2003. The Creator of Chromatography, Russia, Russian Academy of Sciences, p.

Tzanavaras PD, Themelis DG, 2007. Development and validation of a high-throughput high-performance liquid chromatographic assay for the determination of caffeine in food samples using a monolithic column. Analytica Chimica Acta, 581, 1, 89-94.

Tzanavaras PD, Zacharis CK, Themelis DG, 2010. Rapid determination of methylxanthines in real samples by high-performance liquid chromatography using the new FastGradient® narrow-bore monolithic column. Talanta, 81, 4, 1494-501.

Uncu O, Ozen B, 2015. Prediction of various chemical parameters of olive oils with Fourier transform infrared spectroscopy. LWT - Food Science and Technology, 63, 2, 978-84.

Valavanis P, 2004. Olive Oil and the Ancient Greeks. In: Ode to the Olive Tree. Eds: Athens HFRCotAo. Athens: Hellenic Ministry of Culture, p. 62-73.

Vandeginste BGM, Massart DL, Buydens LMC, De Jong S, Lewi PJ, Smeyers-Verbeke J, 1998. Handbook of chemometrics and qualimetrics: Part B, Amsterdam, Elsevier, p.

Vasconcelos M, Coelho L, Barros A, de Almeida JMMM, 2015. Study of adulteration of extra virgin olive oil with peanut oil using FTIR spectroscopy and chemometrics. Cogent Food & Agriculture, 1, 1, 1018695.

Verleyen T, Verhe R, Garcia L, Dewettinck K, Huyghebaert A, De Greyt W, 2001. Gas chromatographic characterization of vegetable oil deodorization distillate. Journal of Chromatography A, 921, 2, 277-85.

Vichi S, Castellote AI, Pizzale L, Conte LS, Buxaderas S, López-Tamames E, 2003. Analysis of virgin olive oil volatile compounds by headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography with mass spectrometric and flame ionization detection. Journal of Chromatography A, 983, 1, 19-33.

Viñas P, Campillo N, Carrasco L, Hernández-Córdoba M, 2007. Analysis of nitrofuran residues in animal feed using liquid chromatography and photodiode-array detection. Chromatographia, 65, 1-2, 85-9.

Walker PG, Gordon SL, Brennan RM, Hancock RD, 2006. A high-throughput monolithic HPLC method for rapid Vitamin C phenotyping of berry fruit. Phytochemical Analysis, 17, 5, 284-90.

Wang X, Barber WE, Carr PW, 2006. A practical approach to maximizing peak capacity by using long columns packed with pellicular stationary phases for proteomic research. Journal of Chromatography A, 1107, 1, 139-51.

Xynos N, Zervos M, Angelis A, Aligiannis N, Skaltsounis A-L, 2016. A single-step isolation of squalene from olive oil deodorizer distillates by using centrifugal partition chromatography. Separation Science and Technology, 51, 5, 830-5.

Yang H, Yan F, Wu D, Huo M, Li J, Cao Y, Jiang Y, 2010. Recovery of phytosterols from waste residue of soybean oil deodorizer distillate. Bioresource Technology, 101, 5, 1471-6.

Yang X, Ma L, Carr PW, 2005. High temperature fast chromatography of proteins using a silica-based stationary phase with greatly enhanced low pH stability. Journal of Chromatography A, 1079, 1, 213-20.

Zeytinyağı, (2015). 2015 Yılı Zeytin ve Zeytinyağı Raporu, T.C. Gümrük ve Ticaret Bakanlığı Kooperatifçilik Genel Müdürlüğü**:** 4.

ÖZGEÇMİŞ



KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı	**:**	İsmail TARHAN
Uyruğu	**:**	T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi	**:**	Kocaeli 22.05.1987
Telefon	**:**	03322233901
Faks	**:**	03322412499
e-mail	**:**	ismtarhan@gmail.com / ismtarhan@selcuk.edu.tr

EĞİTİM

Derece		**Adı, İlçe, İl**	**Bitirme Yılı**
Lise	:	Seka Çocuk Dostları Lisesi, Derince, KOCAELİ	2004
Üniversite	:	Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü	2009
Yüksek Lisans	:	Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı	2011
Doktora	:	McGill University, Montreal, Quebec, KANADA (Visiting Doctorate Programme)	2016
Doktora	:	Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı	2018

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	**Kurum**	**Görevi**
2010-2013	Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü	Araştırma Görevlisi
2013-2015	Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyokimya Bölümü	Araştırma Görevlisi
2015-2016	McGill University, Faculty of Agricultural and Environmental Sciences, Department of Food Science & Agricultural Chemistry	Ziyaretçi Doktora Öğrencisi
2016-	Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyokimya Bölümü	Araştırma Görevlisi

UZMANLIK ALANLARI

- Humus, hümik asit ve fülvik asit ekstraksiyon ve fraksiyonlama teknikleri
- Gıda analizleri
- Kromatografik (HPLC, GC) ayırma, tayin teknikleri ve uygulamaları
- FTIR spektroskopisi tayin teknikleri ve uygulamaları
- Kemometri ve istatistiksel analiz metotları

YABANCI DİLLER

- İngilizce (Yüksek seviyede yazan, anlayan ve konuşan)
  ÜDS Puanı: 86.25

PROJELERDE YAPTIĞI GÖREVLER

1. Konya Bölgesinde Yetiştirilen Bazı Tıbbi Bitkilerin Tokoferol İçeriginin Belirlenmesi, Yükseköğretim Kurumları Tarafından Destekli Bilimsel Araştırma Projesi, Yürütücü:Koçak Ahmet,Araştırmacı:Tarhan İsmail,Araştırmacı:Tulukcu Eray,Araştırmacı:Yüce Emrah, , 22/02/2018 (Devam Ediyor) (Ulusal)

2. 2223-B Yurt Içi Bilimsel Etkinlik Düzenleme Destegi, Tübitak Projesi, Araştırmacı, , 03/11/2016 - 05/11/2016 (Ulusal)

3. Bazı Natürel Sızma Zeytinyağlarındaki Skualen Miktarlarının İncelenmesi, Yükseköğretim Kurumları Tarafından Destekli Bilimsel Araştırma Projesi, Yürütücü:Kara Hüseyin,Araştırmacı:Tarhan İsmail, , 22/02/2018 (Devam Ediyor) (Ulusal)

4. Konya Bölgesinde Yetiştirilen Bazı Adaçayı Türlerinin Yağ Asitlerinin Tespiti, Yükseköğretim Kurumları Tarafından Destekli Bilimsel Araştırma Projesi, Yürütücü:Koçak Ahmet,Araştırmacı:Tarhan İsmail,Araştırmacı:Tulukcu Eray,Araştırmacı:Koçak Nuriye, , 30/11/2017 (Devam Ediyor) (Ulusal)

5. Zeytinyağı Distilatındaki Biyoaktif Bileşenlerin Ftir Spektroskopik Teknikleriyle İncelenmesi, Yükseköğretim Kurumları Tarafından Destekli Bilimsel Araştırma Projesi, Araştırmacı:Tarhan İsmail,Yürütücü:Kara Hüseyin, 29/09/2016 - 05/07/2017 (Ulusal)

6. Zeytinyağı Distilatındaki Biyoaktif Bileşenlerin Monolitik Kolonlarla İncelenmesi, Yükseköğretim Kurumları Tarafından Destekli Bilimsel Araştırma Projesi, Araştırmacı, , 24/06/2016 (Devam Ediyor) (Ulusal) (Doktora Tezinden Yapılmıştır)

7. Bitkisel Yağların Tek Enjeksiyonlu 3 Boyutlu Kromatografik Analizi İçin Yeni Spe Hplc Fia Birleştirilmiş Sisteminin Oluşturulması Ve Uygulamalarının Geliştirilmesi, Tübitak Projesi, Bursiyer, , 01/01/2012 - 01/01/2015 (Ulusal)

8. Çaydan Hümik Maddelerin Ekstraksiyonu Kantitatif Tayini Ve Karakterizasyonu, Yükseköğretim Kurumları Tarafından Destekli Bilimsel Araştırma Projesi, Araştırmacı, , 04/11/2014 - 30/12/2015 (Ulusal)

9. Hümik Maddelerin Bazı Biyokimyasal Kaynaklardan Ekstraksiyonu Ve Akış Enjeksiyon Sistemleriyle Tayin Metotlarının Geliştirilmesi, Yükseköğretim Kurumları Tarafından Destekli Bilimsel Araştırma Projesi, Araştırmacı, , 01/01/2011 - 01/01/2012 (Ulusal)

ARAŞTIRMA

1. The Investigation of Bioactive Compounds in Olive Oil Distillate by FTIR Spectroscopy, Tübitak 2214-A Yurtdışı Doktora Sırası Araştırma Burs programından kazanılan destek ile Kanada McGill Üniversitesinde 1 yıl süre ile yapılmıştır., McGill Üniversitesi, Araştırma, 24.03.2015-19.03.2016 (Uluslararası) (Başvuru No: 1059B141400950, 12 Ay) (Doktora Tezinden Yapılmıştır)

YAYINLAR

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

1. Tarhan İsmail, Ismail Ashraf A, Kara Hüseyin (2017). Quantitative Determination of Free Fatty Acids In Extra Virgin Olive Oils By Multivariate Methods And Fourier Transform Infrared Spectroscopy Considering Different Absorption Modes. International Journal of Food Properties, 20, 790-797., Doi: Http://Dx.Doi.Org/10.1080/10942912.2017.1312437 (Doktora Tezinden Yapılmıştır)

2. Tarhan İsmail, Kara Hüseyin (2016). A Chemometric Study Automated Flow Injection Analysis Method For The Quantitative Determination Of Humic Acid In Ilgın Lignite. Arabian Journal Of Chemistry, 9(5), 713-720., Doi: 10.1016/J.Arabjc.2014.09.002 (Yükseklisans Tezinden Yapılmıştır)

3. Fakharn Memon, Ayyildiz Hamide Filiz, Kara Hüseyin, Memon Shahabuddin, Kenar Adnan, Leghari Muhammad Khan, Topkafa Mustafa, Sherazi Syed Tufail Hussain, Memon Naeem Ahmed, Durmaz Fatih, Tarhan İsmail (2015). Application Of Central Composite Design For The Optimization Of On Line Solid Phase Extraction Of Cu2 By Calix 4 Arene Bonded Silica Resin. Chemometrics And Intelligent Laboratory Systems, 146, 158-168., Doi: 10.1016/J.Chemolab.2015.05.020

4. Tarhan İsmail, Ayyildiz Hamide Filiz, Topkafa Mustafa, Arslan Fatma Nur, Taş Aslan, Sherazi Syed Tufail Hussain, Kara Hüseyin (2015). Chemical And

Spectroscopic Characterization Of Humic Acid Isolated From Ilgın Lignite Turkey. International Journal Of Scientific And Technological Research, 1(1), 176-183.

5. Arslan Fatma Nur, Kara Huseyin, Ayyildiz Hamide Filiz, Topkafa Mustafa, Tarhan Ismail, Kenar Adnan (2013). A Chemometric Approach To Assess The Frying Stability Of Cottonseed Oil Blends During Deep Frying Process I Polar And Polymeric Compound Analyses. Journal Of The American Oil Chemists' Society, 90(8), 1179-1193., Doi: 10.1007/S11746-013-2266-4

6. Ayyildiz H. Filiz, Topkafa Mustafa, Arslan Fatma Nur, Durmaz Fatih, Kucukkolbasi Semahat, Tarhan Ismail, Kara Huseyin (2012). Removal and Preconcentration of Cobalt Ions from Aqueous Media Using ImHA Packed Column by On Line SPE System. Water, Air, & Soil Pollution, 223(7), 3817-3830., Doi: 10.1007/s11270-012-1150-4

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında (proceedings) basılan bildiriler:

1. Tarhan İsmail, Kara Hüseyin (2018). Quantitative Determination Of Squalene in Olive Oil Deodorizer Distillate By Chromatographic Method. 4th International Turkic World Conference On Chemical Sciences And Technologies (Özet Bildiri/Sözlü Sunum) (Doktora Tezinden Yapılmıştır)

2. Tarhan İsmail, Arslan Fatma Nur, Kara Hüseyin (2018). Quantitative Determination Of Free Fatty Acid Value Of Olive Oil Deodorizer Distillate By Standard Colorimetric Method. 4th International Turkic World Conference On Chemical Sciences And Technologies (Özet Bildiri/Poster) (Doktora Tezinden Yapılmıştır)

3. Tarhan İsmail, Kara Hüseyin (2018). Quantitative Determination Of Tocopherols And Tocotrienols In Olive Oil Deodorizer Distillate By Hplc-Fld. VII. International Congress On Molecular Biology And Biotechnology (Özet Bildiri/Poster) (Doktora Tezinden Yapılmıştır)

4. Tarhan İsmail, Kara Hüseyin (2018). Quantitative Determination Of Sterols in Olive Oil Deodorizer Distillate By Gc-Ms And Gc-Fıd. VII. International Congress On Molecular Biology And Biotechnology (Özet Bildiri/Sözlü Sunum) (Doktora Tezinden Yapılmıştır)

5. Arslan Fatma Nur, Akın Gönül, Serin Atike, Elmas S Nihan Karuk, Tarhan İsmail, Yılmaz İbrahim (2018). Determination Of Cis-, Trans-, Saturated, Monounsaturated, And Polyunsaturated Fatty Acids İn Cold-Pressed Seed Oils By Capillary Glc-Fıd Method. 2nd European Conference On Science, Art Culture Ecsac 2018 Congress (Özet Bildiri/Poster)

6. Tarhan İsmail, Ismaıl Ashraf A, Kara Hüseyin (2017). Development Of A Sb-Atr-FTIR Based Method For The Determination Of İodine Value İn Olive Oil

Deodorizer Distillate. 4th International Turk-Pak Conference On Chemical Sciences (Özet Bildiri/Poster) (Doktora Tezinden Yapılmıştır)

7. Tarhan İsmail, Kara Hüseyin (2017). Quantitative Determination Of Humic Substances in A Wide Range Of Calibration By Flow Injection Systems. Part Two: The Simultaneously Analyze Of Changes Between The Flow Rate And The Temperature By Chemometric Approaches. 4th International Turk-Pak Conference On Chemical Sciences (Özet Bildiri/Poster) (Yüksek Lisans Tezinden Yapılmıştır)

8. Tarhan İsmail, Tarhan Esra, Kara Hüseyin (2017). Development Of A Sb-Atr-Ftır Based Method For The Determination Of Free Fatty Acids in Olive Oil Deodorizer Distillate. 15th Euro Fed Lipid Congress (Özet Bildiri/Poster (Doktora Tezinden Yapılmıştır)

9. Tarhan İsmail, Arslan Fatma Nur, Kara Hüseyin (2017). Rapid Discrimination Of Extra Virgin Olive Oils By Ftır Transmission Spectroscopy. 15th Euro Fed Lipid Congress (Özet Bildiri/Poster) (Doktora Tezinden Yapılmıştır)

10. Arslan Fatma Nur, Tarhan İsmail (2017). Pharmacological Seed Oils With Natural Bioactıve Constituents: Tocochromanol Profiling By Highperformance Liquid Chromatography. 1. Uluslararası Tıbbi Ve Aromatik Bitkiler Kongresi (Özet Bildiri/Poster)

11. Tarhan İsmail, Kara Hüseyin (2017). Rapid Discrımınatıon Of Extra Virgin Olive Oils By Sb-Atr-Ftır And Portable Atr-Ir Spectroscopy. 1. Uluslararası Tıbbi Ve Aromatik Bitkiler Kongresi (Özet Bildiri/Poster) (Doktora Tezinden Yapılmıştır)

12. Arslan Fatma Nur, Kara Hüseyin, Tarhan İsmail, Kenar Adnan (2016). Heart-Cutting Two-Dimensional Column-Switching Hplc/Elsd Method For The Analysis Of Triglycerides in Cold Pressed Oils. 14th Euro Fed Lipid Congress (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)

13. Tarhan İsmail, Ismaıl Ashraf A, Kara Hüseyin (2016). Rapid Discrimination Of Extra Virgin Olive Oils By Ft Nır Spectroscopy. 14th Euro Fed Lipid Congress (Özet Bildiri/Poster) (Doktora Tezinden Yapılmıştır)

14. Tarhan İsmail, Ismaıl Ashraf A, Kara Hüseyin (2016). Quantitative Determination Of Free Fatty Acids in Extra Virgin Olive Oils By Multivariate Methods And Ft Ir Spectroscopy Considering Different Absorption Modes. 14th Euro Fed Lipid Congress (Özet Bildiri/Poster) (Doktora Tezinden Yapılmıştır)

15. Tarhan İsmail, Ismaıl Ashraf A,Kara Hüseyin (2016). Development Of An Ft Nır Based Method For The Determination Of Free Fatty Acids in Olive Oil Deodorizer Distillate. 14th Euro Fed Lipid Congress (Özet Bildiri/Sözlü Sunum) (Doktora Tezinden Yapılmıştır)

16. Memon Fakhar N, Ayyıldız Hamide Filiz, Kara Hüseyin, Memon Shahabuddin, Kenar Adnan, Topkafa Mustafa, Sherazi Syed Tufail Hussain, Memon Naeem Ahmed, Durmaz Fatih, Tarhan İsmail (2016). Optimization Of The On-Line Solid

Phase Extraction Of Heavy Metal Ions By Calix[4]Arene Bonded Silica As A Novel Extractant: Assessment Of Central Composite Design. 11th International Symposium On Analytical And Environmental Chemistry (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)

17. Tarhan İsmail, Ayyıldız Hamide Filiz, Topkafa Mustafa, Arslan Fatma Nur, Kara Hüseyin (2015). A Chemometric Study Automated Flow Injection Analysis Method For The Quantitative Determination Of Humic Acid İn Ilgin Lignite. 98th Canadıan Chemıstry Conference And Exhıbıtıon (Özet Bildiri/Sözlü Sunum) (Yüksek Lisans Tezinden Yapılmıştır)

18. Kara Hüseyin, Ayyıldız Hamide Filiz, Topkafa Mustafa, Arslan Fatma Nur, Tarhan İsmail, Durmaz Fatih (2012). Importance Of Oil Viscosity in Determination Of Ffa Content Of Vegetable Oils By Automated Flow Injection Analysis. 3rd Pak-Turk Conference On Chemical Sciences (Pakturkccs) (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)

19. Tarhan İsmail, Ayyıldız Hamide Filiz, Topkafa Mustafa, Arslan Fatma Nur, Durmaz Fatih, Kara Hüseyin, Kenar Adnan (2012). Quantitative Determination Of Humic Substances İn A Wide Range Of Calibration By Flow Injection Systems Part One The Simultaneously Analyze Of Changes Between The Temperature And The Sample Amount By Chemometric Approaches. 3rd Pak-Turk Conference On Chemıcal Scıences (Pakturkccs) (Özet Bildiri/Poster) (Yüksek Lisans Tezinden Yapılmıştır)

20. Arslan Fatma Nur, Kara Hüseyin, Kenar Adnan, Ayyıldız Hamide Filiz, Topkafa Mustafa, Tarhan İsmail (2012). A Novel Approach Processing Of Hpsec Data For Chemometric Analysis Of Total Polar And Polymeric Compound Formation During Frying Process. 3rd Pak-Turk Conference On Chemical Sciences (Pakturkccs) (Özet Bildiri/Poster)

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:

1. Tarhan İsmail, Kara Hüseyin (2016). Humik Maddelerin Akış Enjeksiyon Sistemleri İle Geniş Bir Kalibrasyon Aralığında Kantitatif Tayini Birinci Aşama Kemometrik Yaklaşımlar İle Sıcaklık Ve Numune Miktarı Arasındaki Değişimlerin Eşzamanlı Analizi. Uluslararası Katılımlı 3. Ulusal Hümik Madde Kongresi (Özet Bildiri/Poster) (Yüksek Lisans Tezinden Yapılmıştır)

2. Taş Aslan, Tarhan İsmail, Kara Hüseyin (2016). Çaydan Hümik Maddelerin Ekstraksiyonu Ve Karakterizasyonu. Uluslararası Katılmlı 3. Ulusal Hümik Madde Kongresi (Özet Bildiri/Poster)

3. Sherazi Syed Tufail Hussain, Kara Hüseyin, Tarhan İsmail (2016). Spectroscopic Studies Of Humic Materials Isolated From Ilgın Lignite Turkey. Uluslararası Katılmlı 3. Ulusal Hümik Madde Kongresi (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)

4. Tarhan İsmail, Ayyıldız Hamide Filiz, Topkafa Mustafa, Arslan Fatma Nur, Durmaz Fatih, Kara Hüseyin (2011). Hümik Maddelerin Akış Enjeksiyon

Sistemleriyle Kantitatif Tayininde Hareketli Fazın Akış Hızının Ve Ph Değerinin Etkisinin İncelenmesi. Uluslararsı Katılımlı 25. Ulusal Kimya Kongresi (Özet Bildiri/Poster) (Yüksek Lisans Tezinden Yapılmıştır)

5. Saraç Ayşe Gökçen, Kara Hüseyin, Ayyıldız Hamide Filiz, Arslan Fatma Nur, Topkafa Mustafa, Tarhan İsmail (2010). Tereyağı Örneklerindeki Konjuge Linoleik Asit Cla İzomerleriningc Fıd Sistemi Kullanılarak Tayini. 24. Ulusal Kimya Kongresi (Özet Bildiri/Poster)

6. Tarhan İsmail, Topkafa Mustafa, Kara Hüseyin (2010). Linyitlerden Elde Edilen Hümik Asit Miktarı Üzerine Oksidasyon Etkisinin İncelenmesi. 5. Ulusal Analitik Kimya Kongresi (Özet Bildiri/Poster) (Yüksek Lisans Tezinden Yapılmıştır)

7. Ayyıldız Hamide Filiz, Arslan Fatma Nur, Topkafa Mustafa, Durmaz Fatih, Saraç Ayşe Gökçen, Tarhan İsmail, Kara Hüseyin (2010). Bitkisel Yağlardaki Serbest Yağ Asidi FFA Miktarının Otomatikleştirilmiş Akış Enjeksiyon Sistemleriyle Tespitinde Sıcaklık Ve Yağ Cinsinin Etkisi. 5.Ulusal Analitik Kimya Kongresi (Özet Bildiri/Poster)

İDARİ GÖREVLER

1. İş Güvenliği Uzmanı, 2016-2017, Selçuk Üniversitesi/İş Sağlığı Ve Güvenliği, Meslek Hastalıkları Uygulama Ve Araştırma Merkezi.

SERTİFİKALAR

1. Gıda ve Biyoteknoloji Alanında Bilimsel Araştırma Projesi Hazırlama Eğitimi, Konya Gıda ve Tarım Üniversitesi tarafından düzenlenen ve Tübitak BİDEB 2237-Proje Eğitimi Etkinlikleri Programı destekli eğitim programı., Hilton Garden Inn Konya, Sertifika, 17.11.2017 -19.11.2017 (Ulusal)

2. FT-IR User Training Course, Bruker Optik GmbH Training Course, Selçuk Üniversitesi, Sertifika, 08.02.2017 -08.02.2017 (Uluslararası)

3. FT-IR User Traininig Course, Bruker Optik GmbH Training Course, Selçuk Üniversitesi, Sertifika, 23.10.2014 -23.10.2014 (Uluslararası)

4. Eppendorf Pipet Semineri, Eppendorf Pipet Klinik, Pipetlemede Prensipler, Pipetlerde Ergonomi ve Dezenfeksiyon, Rixos Konya, Sertifika, 30.04.2013 -30.04.2013 (Ulusal)

5. CAMAG Modern HPTLC / TLC Semineri ve HPTLC Cihaz Kullanımı ve Aplikasyonu Eğitimi, İnfo Kimya Cihaz Eğitimi, Selçuk Üniversitesi, Sertifika, 14.07.2011 -14.07.2011 (Ulusal)

6. Agilent 7890A GC ve 1260 HPLC Cihazları Kullanıcı Eğitimi, SEM-Agilent Eğitim Semineri, Selçuk Üniversitesi, Sertifika, 10.05.2011 -11.05.2011 (Ulusal)

7. Agilent Moleküler Spektroskopi (AAS, ICP-EOS, ICP-MS, FT-IR, UV-VIS) Sistemlerinin Tanıtımı, SEM-Agilent Eğitim Semineri, Swiss Otel, Sertifika, 16.02.2011 -16.02.2011 (Ulusal)

8. Ultra Fast Likit Kromatografi - Kolonlar ve İleri Uygulama Teknikleri Semineri, ANT Teknik Eğitim Semineri, Selçuk üniversitesi, Sertifika, 27.05.2010 - 27.05.2010 (Ulusal)

9. Fikri ve Sınai Mülkiyet Hakları Kapsamında Marka ve Tasarım, Zirveler İçin Yetişin 4. Dönem Eğitm Programı, Selçuk Üniversitesi, Sertifika, 05.05.2010 - 05.05.2010 (Ulusal)
10. Fikri ve Sınai Mülkiyet Hakları Kapsamında Patent ve Faydalı Model, Zirveler İçin Yetişin 4. Dönem Eğitim Programı, Selçuk Üniversitesi, Sertifika, 04.05.2010 -04.05.2010 (Ulusal)