



T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YENİLEBİLİR NAR ÇEKİRDEĞİ YAĞININ RAFİNASYON ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

Mustafa TOPKAFA

DOKTORA TEZİ

Kimya Anabilim Dalı

Eylül-2013
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

DOKTORA TEZİ

YENİLEBİLİR NAR ÇEKİRDEĞİ YAĞININ RAFİNASYON ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

Mustafa TOPKAFA

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Hüseyin KARA

2013, 184 Sayfa

Jüri
Prof. Dr. Adnan KENAR
Prof. Dr. Hüseyin KARA
Prof. Dr. Mehmet Emin AYDIN
Yrd. Doç. Dr. Semahat KÜÇÜKKOLBAŞI
Yrd. Doç. Dr. Fatih DURMAZ

Bu tez çalışmasında; yüksek konjuge linolenik asit içeriğiyle (~%80) yağlı çekirdek tohumları arasında oldukça önemli bir yere sahip olan, fakat şimdiye kadar yemeklik yağ olarak üretimi yapılmamış ve rafinasyon özellikleri hiç incelenmemiş nar çekirdeği yağının temel özelliklerinin ve rafinasyon boyunca yağda meydana gelen fiziksel & kimyasal değişiklikler ortaya çıkartılarak rafinasyon şartlarının tespit edilmesi amaçlanmıştır.

Rafinasyon süresince nar çekirdeği yağında meydana gelen değişiklerin gözlenmesi amacıyla gerçekleştirilen yağ asit kompozisyonu, sterol, wax, polar ve polimerik madde, vitamin & tokoferol-tokotrienol, trigliserit, antioksidan kapasitesi, spektrofotometrik FTIR ve TGA/DTG analizlerinin yürütülmesinde; literatürde yer alan metotların yanı sıra, nar çekirdeği yağı ve bu tür özel yağlar için kullanılmak üzere tarafımızdan geliştirilen yeni metotlar da kullanılmıştır.

Araştırma bulguları, nar çekirdeği yağının vitamin, tokoferol-tokotrienol, sterol, wax ve antioksidan içeriğinin rafinasyon prosesi boyunca azaldığını, yağ asit kompozisyonu, polar ve polimerik madde miktarı, trigliserit düzeyi, spektrofotometrik FTIR ve TGA/DTG özelliklerinin de proses parametrelerine bağlı olarak değişime uğradığını göstermiştir. Ayrıca; konjuge linolenik yağ asidi içeriği bakımından özel bir yere sahip olan nar çekirdeği yağının rafinasyonu sırasında yağ asitlerinin önemli ölçüde izomerizasyona uğradığı da tespit edilmiş, elde edilen değerler trigliserit analizi ile doğrulanmıştır.

Nar çekirdeği yağının yapısında meydana gelen fiziksel & kimyasal değişikliklere ilişkin elde edilen değerler, bir yemeklik yağın sahip olması gereken sınır değerler arasında yer almakta olup; gerçekleştirilen rafinasyon prosesinin istenilen seviyede ve doğrulukta yapıldığının bir göstergesi olarak; rafine nar çekirdeği yağının polimerik madde içeriği: % 6.18, wax miktarı: 24 ppm, klorofil miktarı: 0.012 ppm, tokoferol-tokotrienol içeriği: 700 ppm, sterol içeriği: 4313 ppm ve β-karoten içeriği: 0.747 ppm olarak tespit edilmiştir.

Seçkin tat ve kararlılığa, yüksek miktarda konjuge linolenik asit, vitamin ve tokoferol-tokotrienol içeriğine sahip, diğer bitkisel yağlardan kolaylıkla ayırt edilebilen özellikte ve hastalıklardan korunmada ideal bir yağ olan nar çekirdeği yağının yüksek kalitede rafinasyonu ile ülkemiz ve dünya gıda sektöründe yemeklik yağ olarak kullanılması umut edilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Nar Çekirdeği Yağı, Konjuge Linolenik Asit (CLnA), Tokoferol-Tokotrienol, Sterol, Vaks, Trigliserit, Vitamin, Kromatografi.

ABSTRACT

Ph.D THESIS

INVESTIGATION OF REFINING PROPERTIES FOR EDIBLE POMEGRANATE SEED OIL

Mustafa TOPKAFA

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF SELÇUK UNIVERSITY

DOCTOR OF PHILOSOPHY

IN CHEMISTRY

Advisor: Prof. Dr. Hüseyin KARA

2013, 184 Pages

Jury
Prof. Dr. Adnan KENAR
Prof. Dr. Hüseyin KARA
Prof. Dr. Mehmet Emin AYDIN
Assist. Prof. Dr. Semahat KÜÇÜKKOLBAŞI
Assist Prof. Dr. Fatih DURMAZ

In this study, it was aimed to reveal that the main properties of pomegranate seed oil, which has a very important place with high content of conjugated linoleic acid (~ 80%) among the oily seeds but so far its refining properties is uninvestigated, by determining chemical and physical changes occurred in the oil.

In the realization of required analyses such as fatty acids composition, sterols, waxes, polar and polymeric substances, vitamins and tocopherol-tocotrienol, triglyceride levels, antioxidant capacity, spectrophotometric FTIR and TGA / DTG assays performed in order to observe the changes occurred in pomegranate seed oil during the refining process, as well as methods in the literature, several new methods developed by us were used to be used in analyses for pomegranate seed oil and the other specialty oils.

The research findings showed that vitamins, tocopherol-tocotrienol, sterols, waxes and antioxidant content of pomegranate seed oil decreases during the refining process, while the composition of fatty acids, the amount of polar and polymeric material, triglyceride level, and spectrophotometric FTIR and TGA / DTG results undergone a change depending on the process parameters. In addition, fatty acids in pomegranate seed oil were found to have suffered substantial isomerization during the refining of pomegranate seed oil and the obtained values were confirmed by triglycerides analyses.

The values obtained indicating the physical and chemical changes occurred in the structure of pomegranate seed oil is located within the limit values and as an indicator of been done the refining process conducted at the desired level of accuracy. The values of refined pomegranate seed oil are as follows: polymeric substances: 6.18%, wax: 24 ppm, chlorophyll: 0.012 ppm tocopherol-tocotrienol: 700 ppm, sterol: 4313 ppm, and β-carotene: 0.747 ppm, respectively.

It is hoped with this study that pomegranate seed oil, which can be easily distinguished from other vegetable oils with its distinguished taste and stability, high amounts of conjugated linolenic acid, tocopherols and tocotrienol and also prevention of some disease, becomes available as high quality refined edible oil in the food industry of our country and the world.

Keywords: Pomegranate Seed Oil, Conjugated Linolenic Acid (CLnA), Tocopherol-Tocotrienol, Sterol, Wax, Triglyceride, Vitamin, Chromatography.

ÖNSÖZ

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

Çalışmada; insan sağlığı ve beslenmede vazgeçilmez bir yere sahip olan nar çekirdeği yağının kalitesini belirlemede ve kontrolünü sağlamada kullanılan yağ analizlerinden; yağ asit kompozisyonu, sterol, vaks, polar ve polimerik madde, tokoferol-tokotrienol, vitamin, trigliserit, antioksidan kapasitesi tayinleri kromatografik, spektrofotometrik, FTIR ve TGA/DTG sistemleri kullanılarak yapılmış ve geliştirilen metotlar, ülkemizin kalkınmasında küçük de olsa bir pay sahibi olabileceği düşüncesiyle kullanıma sunulmuştur. Geliştirilen metotlar kullanılan metotlara kıyasla; doğru ve daha olduğu düşüncesiyle çalışmanın, literatüre kazandıracağı katkıların yanı sıra, özel özelliklere sahip diğer yağların analizleri için de yol gösterici olacağı düşünülmektedir. Geliştirilen metotların uygulandığı taktirde; düşük maliyetli, yüksek katma değerli ürünlerin elde edilebilmesinde ülke ekonomisine katkıda bulunabileceğine inanılmaktadır.

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışmanın konu seçiminden tez oluşumuna kadar her safhasında, ilmî ve ahlakî sorumluluk bilincimin gelişmesine büyük katkı sağlayan kıymetli Hocam Prof. Dr. Hüseyin KARA Beyefendi'ye, bu çalışmanın yürütülmesinde bilgi ve önerileri ile benden yardımlarını esirgemediği için kendisine minnetlerimi sunarım.

Çalışmalarım süresince sonuçların değerlendirilmesi ve olgunlaşmasında büyük rol oynayan saygıdeğer hocam, Arş. Gör. Dr. H. Filiz AYYILDIZ`a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım süresince maddî ve manevî yardımlarından ötürü başta Doktora Öğrencisi arkadaşım Arş. Gör. İsmail TARHAN`a, Yüksek Lisans Öğrencileri Huriye ÇAKIR ve Polat KILIÇ'a da ayrı ayrı saygı ve şükranlarımı sunarım.

Burada isimlerini sayamadığım, tezim süresince desteklerini ve dualarını benden esirgemeyen çok kıymetli arkadaşlarıma ve yakınlarıma da teşekkürü bir borç bilirim.

Bana çalışmalarım sırasında maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyen sevgili eşim Raziye TOPKAFA`ya, üzerimde büyük emek sahibi annem Havva

TOPKAFA'ya, babam Mehmet TOPKAFA'ya, sevgili kardeşlerim ve eşlerine sonsuz kere teşekkür ederim.

Son olarak; bir gülüşü yüzlerce doktora tezine bedel olan kızım Havva Berru'ya teşekkür ederek, bu doktora tezini babam Mehmet TOPKAFA'ya ve Kızım Havva Berru TOPKAFA'ya atfediyorum.

Mustafa TOPKAFA
KONYA-2013

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iv**

ABSTRACT ..... **v**

ÖNSÖZ ..... **vi**

İÇİNDEKİLER ..... **viii**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **xi**

1. GİRİŞ **1**

1.1. Yağın Tanımı ve Önemi 2
1.1.1. Yağın Genel Özellikleri 4
1.1.1.1. Trigliseritler 4
1.1.1.2. Yağ asitleri 5
1.1.1.3. Steroller 8
1.1.1.4. Vakslar (mum) 9
1.1.1.5. Tokoferol ve tokotrienoller 11
1.1.1.6. Vitaminler 13
1.1.1.7. Polar ve Polimerik Maddeler 17
1.1.1.8. Spektroskopik özellikler 18
1.1.1.9. Antioksidan kapasiteleri 20
1.2. Nar Çekirdeği ve Yağının Özellikleri 21
1.3. Yağların Rafinasyonu 24
1.3.1. Rafinasyon Kademeleri 25
1.3.1.1. Degumming 27
1.3.1.2. Nötralizasyon 27
1.3.1.3. Ağartma 28
1.3.1.4. Vinterizasyon 30
1.3.1.5. Deoderizasyon 30
1.4. Yağ Analizleri 31

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI **36**

2.1. Nar Çekirdeği Yağı Üzerine Yapılan Çalışmalar 36
2.2. Kromatografi ve Diğer Yöntemlerle Yapılan Yağ Analizleri 40
2.3.Çalışmanın Amacı 49

3. MATERYAL VE METOT **50**

3.1. Kullanılan Kimyasallar ve Kolonlar 50
3.2. Kullanılan Cihazlar 52
3.3. Kullanılan Yağlar 52
3.4. Yağ Numuneleri Üzerinde Gerçekleştirilen Analizler 53
3.4.1. Fosfor tayini 53
3.4.2. Serbest yağ asidi (%FFA) tayini 54

3.4.3. Peroksit sayısı (PV) tayini 55
3.4.4. Sabun miktarı tayini 55
3.4.5. Renk tayini 56
3.4.6. Bulanıklık tayini 56
3.4.7. İyot sayısı (IV) tayini 56
3.4.8. Yağ asit kompozisyonu analizleri 57
3.4.8.1. Yağ asit metil esterlerinin elde edilmesi 57
3.4.8.2. Kromatografik şartların belirlenmesi 58
3.4.9. Sterol analizleri 60
3.4.9.1. Kromatografik şartların belirlenmesi 61
3.4.10. Vaks analizleri 62
3.4.11. Polar ve polimerik madde tayinleri 63
3.4.11.1. Polar ve apolar madde tayini (ön ayırmalı prosedür) 64
3.4.11.2. Toplam polimerik madde tayini (direk enjeksiyonlu prosedür) 64
3.4.12. Vitamin ve Tokoferol – Tokotrienol analizi 65
3.4.12.1. Uygun dedektör ve dalga boylarının tespiti 65
3.4.12.2. Kromatografik şartların belirlenmesi 65
3.4.13. Trigliserit analizi 66
3.4.13.1. Kromatografik şartların belirlenmesi 66
3.4.14. Uv-Visible spektrofotometrik analizler 67
3.4.14.1. Klorofil ve β-karoten tayini 67
3.4.14.2. Birincil ve ikincil oksidasyon ürünlerinin (Özgül Abs.) tayini 67
3.4.15. FTIR analizleri 68
3.4.16. Antioksidan akivitesi ve toplam fenolik madde tayinleri 68
3.4.17. Termogravimetrik analizler 70

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA 71

4.1. Fosfor, Serbest Yağ Asidi, Peroksit Sayısı, Renk, Bulanıklık ve İyot Sayısı Tayinleri 73
4.2. Yağ Asit Kompozisyonu Analizleri 75
4.2.1. Yağ asit metil esterlerinin elde edilmesi 76
4.2.2. Kromatografik şartların belirlenmesi 79
4.2.3. Rafinasyon kademelerindeki değişim 83
4.3. Sterol Kompozisyonu Analizleri 90
4.3.1. Kromatografik şartların belirlenmesi 90
4.3.2. Rafinasyon kademelerindeki değişim 94
4.4. Vaks Analizleri 97
4.5. Polar ve Polimerik Madde Tayinleri 101
4.5.1. Polar ve apolar madde tayini (ön ayırmalı prosedür) 101
4.5.2. Toplam polimerik madde tayini (direk enjeksiyonlu prosedür) 104
4.6. Vitamin ve Tokoferol – Tokotrienol Analizi 107
4.6.1. Uygun dedektör ve dalga boylarının tespiti 107
4.6.2 Kromatografik şartların belirlenmesi 110
4.6.3. Rafinasyon kademelerindeki değişim 114
4.7. Trigliserit Analizi 120
4.7.1 Kromatografik şartların belirlenmesi 120
4.7.2. Rafinasyon kademelerindeki değişim 123
4.8. Uv-Visible Spektrofotometrik Analizler 128
4.8.1. Klorofil ve β-karoten tayini 129

4.8.2. Birincil ve ikincil oksidasyon ürünlerinin (Özgül Abs.) tayini 131
4.9. FTIR Analizleri 133
4.10. Antioksidan aktivitesi ve toplam fenolik madde tayinleri 137
4.10.1. Toplam fenolik madde tayini.....137
4.10.2. Serbest radikal yakalama aktivitesi (DPPH Testi) tayini 138
4.10.3. Toplam antioksidan kapasite tayini.....139
4.11. Termogravimetrik Analizler.....141
4.12. Yağ Analiz Sonuçları.....145

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....150

5.1. Sonuçlar 150

KAYNAKLAR 154

EKLER 162

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

- **%T** : % geçirgenlik
- **µM** : Mikro molar
- **A°** : Agstrom
- **Ab** : Absorbansı
- **Ab_{232}** : 232 nm dalga boyundaki absorbans değeri
- **Ab_{269}** : 269 nm dalga boyundaki absorbans değeri
- **c** : cis
- **cm^{-1}** : Dalga sayısı
- **G** : Kütle
- **H** : Tabaka yüksekliği
- **k`** : Kapasite faktörü
- **K_{232}** : 232 nm`de konjuge dienlerin ölçümü
- **K_{269}** : 269 nm`de konjuge trienlerin ölçümü
- **m /z** : Kütle-yük oranı
- **m** : Analitik eğrinin eğimi
- **M** : Molarite
- **N** : Normalite
- **N** : Tabaka sayısı
- **nm** : Nanometre
- **NTU** : nephelometric turbidity unit
- **Rs** : Ayırma gücü
- **t** : trans
- **V** : Hacim
- **α** : Alfa
- **α** : Seçicilik
- **β** : Beta
- **γ** : Gama
- **δ** : Sigma
- **λ_{Em}** : Emisyon Dalga Boyu
- **λ_{Ext}** : Uyarma Dalga Boyu
- **λ_{max}** : Maksimum Dalga Boyu
- **ω-2** : Linoleik asit
- **ω-3** : Linolenik asit

Kısaltmalar

- **%FFA** : Serbest yağ asitleri (% oleik asit cinsinden)
- **A, Abs.** : Absorbans
- **AOAC** : The Association of Official Analytical Chemists
- **AOCS Ca-5a-40** : Serbest yağ asidi tayini için AOCS metodu
- **AOCS Cd 8b-90** : Peroksit sayısı tayini için AOCS metodu
- **AOCS** : American Oil Chemists Society
- **ATR-FTIR** : Attenuated Total Reflectance- Fourier transform infrared spectroscopy
- **AV** : Anisidin sayısı
- **BHA** : Bütillendirilmiş hidroksianisol
- **BHT** : Bütillendirilmiş hidroksitolüen
- **CLA** : Konjuge linoleik asit
- **CLnA** : Konjuge linolenik asit
- **COI** : Uluslar Arası Zeytinyağı Konseyi

- **DAD** : Diyod array dedektör
- **DBP** : Vitamin D bağlayan protein
- **DGs** : Diaçilgliseroller
- **min** : Dakika
- **DPPH** : 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
- **DSC** : Differential scanning calorimetry
- **DTG** : Differential thermogravimetric analysis
- **Emi** : Emisyon
- **Exc** : Uyarma
- **FAME** : Fatty acid methyl esters, yağ asidi metil esterleri
- **FID** : Alev iyonlaşmalı dedektör
- **FID** : Flame Ionization Detector, Alev iyonlaşmalı dedektör
- **FLD** : Floresans dedektör
- **FTIR** : Fourier transform infrared spectroscopy
- **GAE** : Gallik asit eşdeğeri
- **GC-FID** : Gaz kromatografisi-Alev iyonlaşmalı dedektör
- **GC-MS** : Gaz kromatografisi-Kütle spektrometresi
- **h** : Saat
- **H•** : Hidrojen radikali
- **HDL** : Yüksek yoğunluklu lipoprotein
- **HPLC** : Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
- **HPSEC** : Yüksek Performanslı Boyut Eleme Kromatografi
- **FTIR** : Infrared
- **IUPAC** : The International Union of Pure and Applied Chemistry
- **IV** : İyot sayısı
- **LDL** : Düşük yoğunluklu lipoprotein
- **LLL** : Linoleik-Linoleik-Linoleik
- **LLLn** : Linoleik-Linoleik-Linolenik
- **LLnLn** : Linoleik-Linolenik-Linolenik
- **LLPu** : Linoleik-Linoleik-Pünisik
- **LnPuCa** : Linolenik-Pünisik-Katalpik
- **LPO** : Linoleik-Palmitik-Oleik
- **mAU** : Mili absorbans unit
- **MGs** : Monoaçilgliseroller
- **MS** : Kütle spektrometresi
- **MUFA** : Tekli doymamış yağ asitleri
- **NMR** : Nükleer manyetik rezonans
- **NP-HPLC** : Normal faz-Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
- **O2·−** : Süperoksit radikali
- **OH•** : Hidroksil radikali
- **OLL** : Oleik-Linoleik-Linoleik
- **OLLn** : Oleik-Linoleik-Linolenik
- **OOL** : Oleik-Oleik-Linolenik
- **OOLn** : Oleik-Oleik-Linolenik
- **OOO** : Oleik-Oleik-Oleik
- **OOPu** : Oleik-Oleik-Pünisik
- **Oxd.** : Okside olmuş
- **PLL** : Palmitik-Linoleik-Linoleik
- **PLLn** : Palmitik-Linoleik-Linolenik
- **PLS** : Palmitik-Linoleik-Stearik
- **POO** : Palmitik-Oleik- Oleik
- **POP** : Palmitik-Oleik-PAlmitik
- **POPu** : Palmitik-Oleik-Pünisik
- **POS** : Palmitik-Oleik-Stearik

- **PPL** : Palmitik-Palmitik-Linoleik
- **ppm** : Per part million(milyonda bir)
- **PRM** : Primer referans madde
- **PSO** : Pomegranate seed oil (nar çekirdeği yağı)
- **PTGs** : Polimerleşmiş triaçillgliseridler
- **PuCaEl** : Pünisik-Katalpik-β-eleostearik
- **PUFA** : Çok doymamış yağ asitleri
- **PuPuPu** : Pünisik-Pünisik-Pünisik
- **PV** : Peroksit sayısı
- **PV** : Peroksit sayısı
- **R•** : Serbest radikal
- **R-H** : Yağ asidi
- **ROO•** : Lipid peroksit radikali
- **ROOH** : Hidroperoksit
- **ROS** : Reaktif oksijen türü
- **RSO2•** : Tiyil peroksit radikalleri
- **s** : Saniye
- **SLL** : Stearik-Linoleik-Linoleik
- **SLO** : Stearik-Linoleik-Oleik
- **SOO** : Stearik-Oleik-Oleik
- **SPE** : Katı faz ekstraksiyon
- **SPE-HPLC** : Katı faz ekstraksiyon- Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
- **SSPu** : Stearik-Stearik-Pünisik
- **TFA** : Trans yağ asitleri
- **TG** : Thermogravimetric analysis
- **TGA** : Thermogravimetric analysis
- **TGK** : Türk gıda kodeksi
- **TGs** : Driaçilgliseroller
- **TLC** : İnce tabaka kromatografisi
- **Tokol** : Tokoferol ve tokotrienollerin birleşik ismi
- **TPC** : Toplam polar madde miktarı
- **UV** : Ultra viyole

1. GİRİŞ

Dünya nüfusunun hızla artması, öte yandan sanayileşen ve kalkınan toplumlarda hayat seviyesinin yükselmesi, değişik kullanım alanlarıyla meyve ve tohumlarının, ülkemiz ve dünya tarım, sanayi ve ticaretinde önemli bir konuma sahip olmalarına neden olmaktadır. Seçkin tat ve kokuya sahip olmaları, kolesterolü bünyelerinde hiç bulundurmamaları nedeniyle bu meyve çekirdeği ve tohumları, insan sağlığı açısından son derece ideal yağ içeriğine sahiptirler.

Gıdaların hazırlamasında kullanılacak yağların, tat, koku ve kararlılıklarının yanında insan sağlığı açısından önemli maddelerin miktarlarının uygun düzeyde ve sınırlarda olması istenmektedir. Sağlıklı yağ asit profili, yüksek oksidatif ve tat kararlığı ve tüketilebilme kolaylığı gibi özellikler de yağlar için son derece önemli olup; yağın sahip olduğu yağ asit kompozisyonlarına, nasıl üretildiğine, bünyesinde bulunan diğer yağ dışı maddelere bağlıdır.

Çeşitli hastalıkların tedavisinde destek olarak doğal kaynakların tercih edilir olması, hayvan yemi ve atık olarak kullanılan nar çekirdeklerinin yağlık bir hammadde olarak kullanımlarını artırdığı görülmektedir. Nar çekirdeğinin yararları hakkında çok olumlu araştırma sonuçları ortaya çıkmaya başladıkça, nar çekirdeği içeren ürün çeşitlerinin hem arzı hem de tüketimi artmaya başlamıştır. Nar üreticiliği bölgesi olarak adlandırılan Akdeniz bölgesinde bulunmamız nedeniyle de Ülkemizde, nar çekirdeği büyük bir önem kazanmaya başlamıştır.

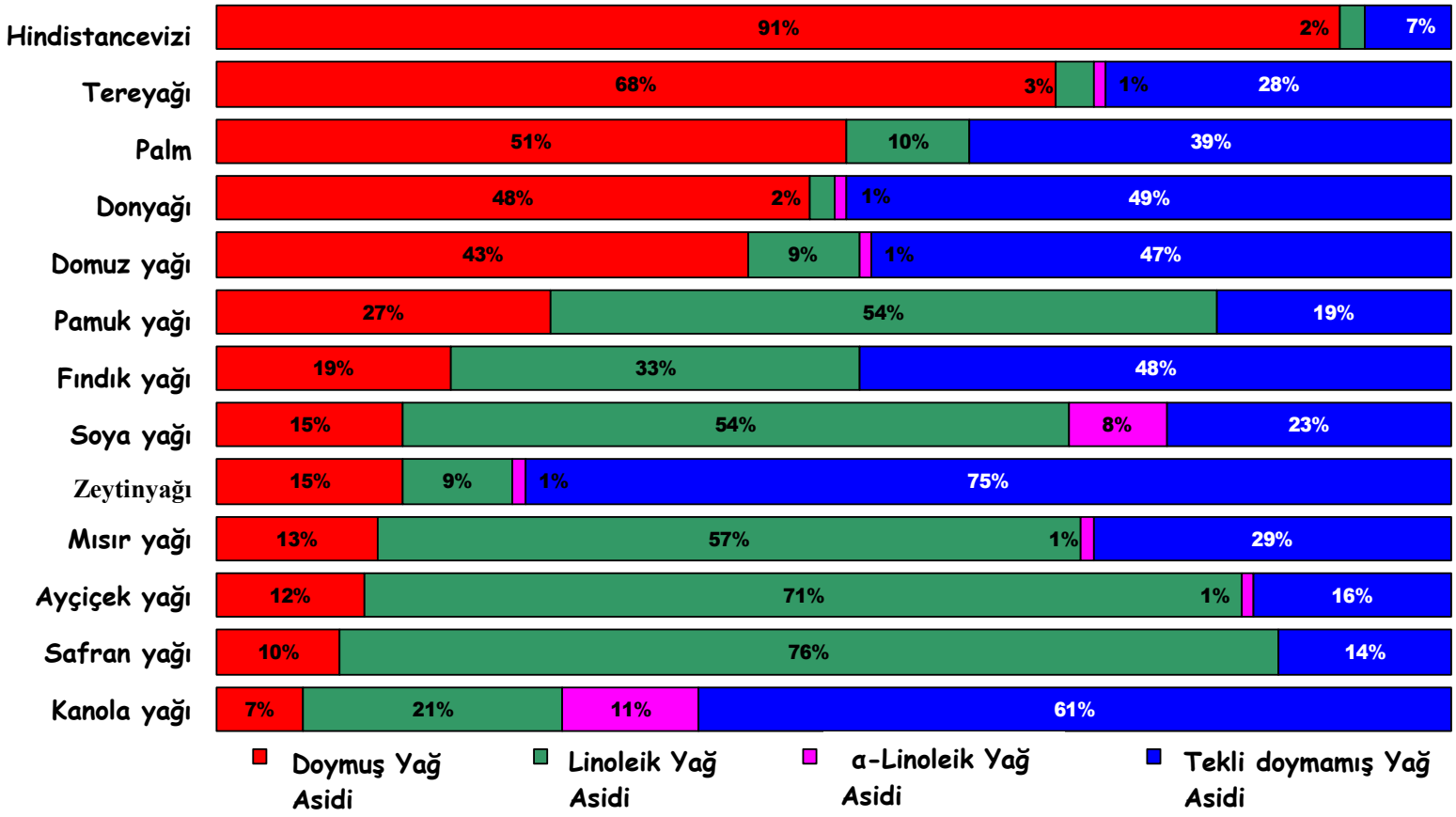
Vücutta sentezlenemeyen ve elzem olarak adlandırılan çoklu doymamış yağ asitleri insan sağlığı için gerekli olduğundan nar çekirdeği yağı, yüksek miktarda doymamış konjuge yağ asidi içerdiğinden dolayı oldukça değerli bir yağdır. Ayrıca nar çekirdeği yağı, yapısında yüksek miktarda konjuge yağ asitleri bulundurmasından dolayı çok büyük oranda tokoferolleri ve yağda çözünen vitaminleri de bulundurur. Tokoferoller gibi antioksidanlar ve vitaminler, vücudumuzda kimyasal reaksiyonlar sonucu oluşan veya dışardan stres, güneş ışınları, sigara, alkol ve çevre kirliliği gibi etkenler sonucu alınan ve yaşlanma sürecini arttıran zararlı serbest radikalleri etkisiz hale getirerek, yaşlanma sürecinin yavaşlatılmasında önemli rol oynarlar.

Bu tez çalışmasında; rafinasyon özellikleri hiç incelenmemiş ve yemeklik olarak üretilmemiş olan nar çekirdeği yağının; rafinasyon özellikleri araştırılarak, rafinasyon sırasında yağda meydana gelen fiziksel ve kimyasal özellikleri incelenmiştir

1.1. Yağın Tanımı ve Önemi

Bitkisel ve hayvansal yağlar insan beslenmesinde karbonhidratlar ve proteinler gibi önemli yer tutan önemli bir enerji kaynağıdırlar. Bunun yanı sıra hücre yapısı için gerekli olan insan vücudunun sentezleyemediği esansiyel yağ yağ asitlerini(linoleik ve linolenik asit) içermesi ve yağda çözünen A, D, E ve K vitaminlerini taşıması gibi özellikleri ile yağlar, insan sağlığına katkıları ve yüksek besin değerine sahip olmaları bakımından ayrı bir yere sahiptirler (Arslan 2009, Ayyıldız 2010). Bu nedenle yağlar pek çok gıda da bileşen olarak ya da söz konusu gıdalarda yardımcı madde olarak kullanılmaktadırlar (Yemişçioğlu 2002).

Günümüz toplumlarında yağlar, insan besini olarak kullanılmaları yanında fizyolojik faliyetlerin yerine getirilmesi, sağlıklı ve uzun bir yaşam sürülmesi, hastalıklardan korunma ve tedaviler sırasında kullanılması, bazı besin maddelerin dış etkenlerden korunması, yemeklerde ve salatalara lezzet katması gibi hayatın birçok alanında önemli bir kullanıma sahiptirler. Bebeklik dönemimizden başlayıp hayatımızın her aşaması ve alanında yer alan yağlar, yağ asitlerinin gliserolle esterleşmesi sonucu oluşan trigliseritlerdir. **Şekil 1. 1**`de de görüldüğü gibi yağların doymuşluk ve doymamışlık dereceleri biribirinden farklılık göstermektedir. Doymuşluk derecesi yüksek olan Hindistan cevizi, tereyağı, palm ve donyağı yağları katı halde iken tekli doymamış yağ oranı yüksek olan pamuk, zeytin ve fındık yağları oda sıcaklığında sıvı ancak sıfırın altındaki sıcaklıklarda ise katı halde bulunabilirken, çoklu doymamış yağ asidi oranı fazla olan mısır, ayçiçeği, soya ve kanola gibi yağlar hem oda sıcaklığında hem de sıfırın altındaki sıcaklılarda sıvı halde bulunmaktadır. Bu katı ve sıvı halde bulunma sebebi iyot sayısından kaynaklanmaktadır. Doymuş yağ asidi oranı yüksek olan yağların iyot sayısı 50 `nin altında iken doymamış yağ asidi oranı yüksek olan yağlarınki 100`ün üzerindedir.



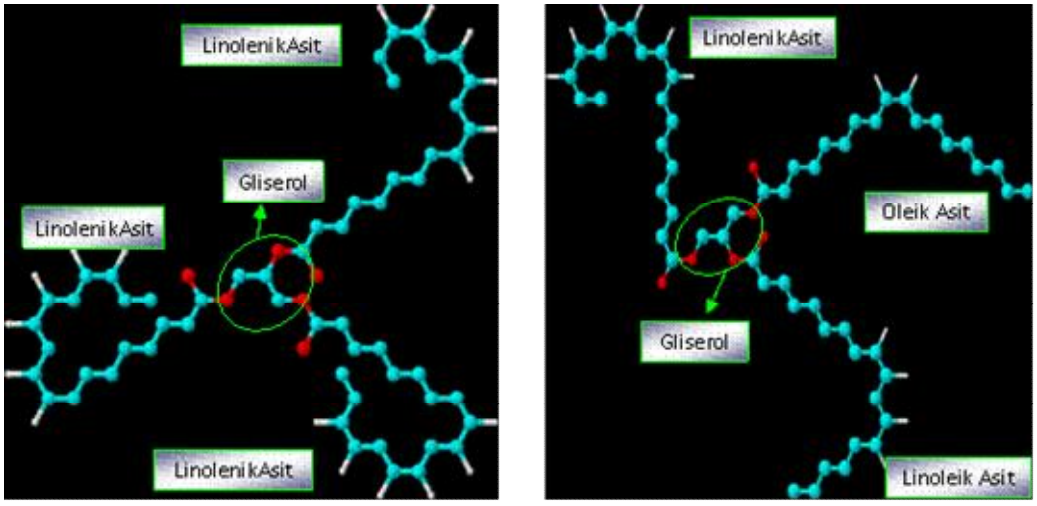
Şekil 1. 1 Bazı Yağlara Ait Yağ Asit Kompozisyon Değerleri, % (Ayyıldız, 2010)

1.**1.1. Yağın Genel Özellikleri**

Trigliseritler yağların % 95-99 oluştururken % 1-5 lik kısmını ise minör bileşik olarak nitelendirilen serbest yağ asitleri, fosfatitler, tokoferoller, steroller, wakslar, A,D,E ve K vitaminleri, fenolik bileşikler, metaller, renkli maddeler, ester bileşikleri, peroksitler, aldehit ve ketonlar, polimerik maddeler ve diğer maddelerden oluşmaktadır (Arslan 2009).

1.1.1.1. Trigliseritler

Bir trigliserid 3 mol yağ asidi ile 1 mol gliserinin esterleşmesi sonucu oluşmaktadır. Trigliseridler yapılarındaki yağ asitlerinin kompozisyonuna göre ikiye ayrılırlar (Arslan 2009). Trigliseriti oluşturan yağ asitlerin hepsi aynı türden ise bu *basit trigliserid* olarak isimlendirilirken iki veya üç yağ asidinden oluşuyorsa buna da *karışık trigliserid* olarak isimlendirilir (**Şekil 1. 2**) (Arslan 2009).



Şekil 1. 2 Basit ve Karışık Trigliserit Yapılar (Ayyıldız 2010)

Karışık lipitlerin esas bileşeni yağ asitleridir. Bu yağ asitlerine fosforik asit bağlandığında fosfolipitler, uzun zincirli alkol bağlandığında vakslar, sfingozin ve karbonhidrat bağlandığında glikolipidler meydana gelirler (Ergün 2004).

Genel olarak yağların trigliserit kompozisyonu isimlendirmesi yapılırken trigliseriti oluştran yağ asitlerinin birinci ve ikinci sessiz harfleri kullanılarak isimlendirme yapılır. Örneğin linoleik, oleik ve linolenik asitten oluşan bir

trigliseritin isimlendirilmesi LOLn `dir. Bazı yağlara ait trigliserit kompozisyonu değerleri **Çizelge 1. 1**`de yer almaktadır.

Çizelge 1. 1 Yağların Trigliserit Yapıları

	MISIR	**AYÇİÇEK**	**SOYA**	**KANOLA**	**FINDIK**	**ZEYTİN**
Trigliserit	%	%	%	%	%	%
LLnLn	0,27	0,72	1,65	0,61	0,18	0
LLLn	0,93	1,26	7,81	3,63	0,14	0
LLL	13,36	24,77	21,04	5,55	3,3	0,26
OLLn	0,78	0	0	0	0	0,29
PLLn	0,52	0,4	3,54	1,53	0,16	0,24
OLL	21,34	30,11	16,15	9,9	6,2	1,84
LPnO	0	0	0	0	0	1,19
PLL	11,93	8,2	13,78	10,88	1,4	0,55
OOLn	0	0	0	0	0	0,58
OOL	14,98	12,7	7,19	15,9	14,52	13,33
POL+SLL	14,28	10,5	12,16	7,13	3,44	6,38
PPL	2,4	0,73	2,23	1,02	0,35	0,89
OOO	6,26	3,88	2,61	23,92	51,53	39,85
SLO+POO	7,92	4,2	5,6	7,1	11,65	23,52
PLS	1,1	1,05	2,13	1,44	0,75	3,46
POP	1,55	0,78	1,81	3,3	0,34	0,59
SOO	0,44	0,85	1,36	1,46	5,14	5,05
POS	1	0,24	0,95	0,77	0,75	1,32

Çizelge 1. 1`den de görüldüğü gibi yağların cinsleri değiştikçe yağı oluşturan trigliseritlerin % değerleri ve cinsleri de değişmektedir. Linolenik asit (ω-3) bakımından zengin olan soya yağının trigliserit kompozisyonuna bakıldığında LLnLn yapısının diğer yağlara göre daha büyük olduğu görülmektedir. Aynı şekilde oleik asit bakımından zengin olduğu bilinen zeytin ve fındık yağlarının OOO yapısının diğer yağlara göre daha büyük oldukları açık bir şekilde görülmektedir.

1.1.1.2. Yağ asitleri

Yağlar dışarıdan gıdalarla alındıktan sonra birtakım metabolik yollardan geçerek önce bileşenlerine ayrılır. Daha sonra ihtiyaç duyulan yağ asitleri mevcut yağ asitlerinden veya asetil koenzim-A'lardan yeniden sentezlenir. Bunlar da gliserin molekülü ile birleşerek yeniden yağ elde edilir ve vücudun enerji ihtiyacı için kullanılırlar. Yağ asitleri yapı taşı olarak tüm hücre ve dokularda bulunurlar.

Yağların birbirlerinden ayrılığı yağ asitlerinin farklılığından kaynaklanır. Bu yağ asitleri hayvanî ve nebatî yağlarda farklı olduğu gibi, her ikisi içinde de

değişiklik gösterir. Meselâ, zeytinyağındaki yağ asitleriyle, ayçiçeği veya mısırözü yağının yağ asitleri arasında, hem miktar hem de cins bakımından farklılıklar vardır. Yani her yağ çeşidinin kendine has bir yağ asidi kompozisyonu vardır. Biz bu yağları değişik kaynaklardan gıda olarak aldığımız zaman yağ asitlerini de almış oluruz. Eğer aldığımız gıdalarla ihtiyacımız olan yağları kâfi miktarda temin edemiyorsak bunu telâfi için vücudumuzda yağ sentezi olmaktadır. Ayrıca ihtiyacımızdan fazla miktarda karbonhidrat alıyorsak o zaman bu fazla karbonhidratlar yağa dönüştürülür ve vücutta depolanır. Her iki durumda da yağ yapımı glukozdan (yani şekerden) olur (Topkafa 2004).

Yağ asitleri genel olarak çift karbon sayılı, cis konfigürasyonda, dallanmamış ve düz zincirli (asiklik) monokarboksilik asitlerdir. Az olmakla birlikte doğada trans konfigürasyonda (elaidik asit), tek karbon sayılı (propiyonik asit, valerik asit gibi) ve dallanmış yağ asitleri (tüberkülostearik asit veya laktobasillik asit metil grubu ile dallanma gösteren doymuş yağ asitleridir) ile siklik yağ asitleri de(hidnokarpik asit ve şolmugrik asit) bulunmaktadır (Topkafa 2004).

Yağ asitlerindeki karbon sayısı 2-34 arasında değişmektedir. Yağ asidi molekülünde karbon sayısı 6 dan az ise "kısa", 6-10 arasında ise "orta" ve 12 ila daha fazla ise "uzun zincirli" yağ asidi olarak tekrar bir alt gruplandırma oluşturulabilir. Yağ asitleri doğal sıvı ve katı yağlar içerisinde esterler halinde bulunurlar. Ancak plazmada transport şekli olan serbest yağ asidi olarak esterleşmemiş halde bulunmaktadır (Topkafa 2004). Hayvansal ve bitkisel yağlarda bulunan yağ asitleri **Çizelge 1. 2**`de verilmiştir.

Çizelge 1. 2 Doymuş ve Doymamış Yağ Asitleri

Laurik Asit	$C_{12}H_{24}O_2$	$CH_3\,(CH_2)_{10}\,COOH$
Miristik Asit	$C_{14}H_{28}O_2$	$CH_3\,(CH_2)_{12}\,COOH$
Palmitik Asit	$C_{16}H_{32}O_2$	$CH_3\,(CH_2)_{14}\,COOH$
Stearik Asit	$C_{18}H_{36}O_2$	$CH_3\,(CH_2)_{16}\,COOH$
Araşidik Asit	$C_{20}H_{40}O_2$	$CH_3\,(CH_2)_{18}\,COOH$
Behenik Asit	$C_{22}H_{44}O_2$	$CH_3\,(CH_2)_{20}\,COOH$
Lignoserik Asit	$C_{24}H_{48}O_2$	$CH_3\,(CH_2)_{22}\,COOH$
Palmitoleik Asit	$C_{16}H_{30}O_2$	$CH_3(CH_2)_5\,CH = CH(CH_2)_7\,COOH$
Oleik Asit	$C_{18}H_{34}O_2$	$CH_3(CH_2)_7\,CH = CH(CH_2)_7\,COOH$
Linoleik Asit	$C_{18}H_{32}O_2$	$CH_3(CH_2)_4\,CH = CHCH_2CH = CH(CH_2)_7\,COOH$
Linolenik Asit	$C_{18}H_{30}O_2$	$CH_3CH_2CH = CHCH_2CH = CHCH_2CH = CH(CH_2)_7\,COOH$
Araşidonik Asit	$C_{20}H_{32}O_2$	$CH_3(CH_2)_4CH{=}CHCH_2CH{=}CHCH_2CH{=}CHCH_2CH{=}CH(CH_2)_3COOH$

Hayvan ve insan organizmasında ancak bir tek çift bağlı yağ asitleri sentezlenebilmektedir. Birden fazla doymamış bağa sahip olan linoleik, alfa - linolenik ve araşidonik asitler, hayvan ve insan organizmasında sentez edilemez ve mutlaka dışarıdan alınması gereklidir. İşte organizmada sentezlenemeyen ve besinlerle birlikte alınması gerekli olan linoleik, linolenik ve araşidonik asitlere, esansiyel yağ asitleri denir. Bu yağ asitlerinin organizmaya yeterli miktarlarda alınamaması sonucunda büyüme durur, dermatitis oluşur. Böbreklerde harabiyet ve hematüri görülür (Topkafa 2004).

Doymamış yağ asitleri doğada genellikle doymuşlara göre daha fazla bulunduğu bilinmektedir. Özellikle oleik ve linoleik asit doğada en fazla bulunan yağ asitleridir. Ancak bu yağ asitlerinin çift bağ sayısı arttıkça oksidasyona uğrama hızı da parelel olarak artmaktadır. Tekli doymamış bir yağ asidinin oksidayon hızı bir olarak nitelendiğinde çoklu doymamış bir yağ asidinin oksidasyon hızı tekli doymamış yağ asidine göre yaklaşık iki yüz kata kadar daha hızlı oksidasyona uğradığı bilinmektedir. Bazı yağlara ait yağ asit kompozisyonu **Çizelge 1. 3**`de yer verilmiştir.

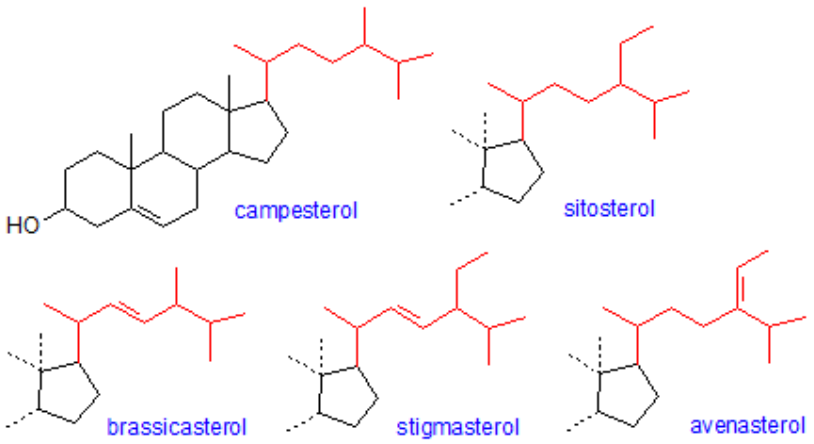
Çizelge 1. 3 Bazı Yağlara ait Yağ Asit Kompozisyonları

Karbon sayısı	Mısır	Ayçiçek	Soya	Kanola	Fındık	Zeytin
C14:0	0.03	0.06	0.07	0.04	0.03	0.02
C16:0	11.52	6.02	10.7	4.4	5.35	12.37
C16:1	0	0.16	0.1	0.21	0.18	0.9
C18:0	1.99	4.01	4.26	1.64	2.7	2.61
C18:1	29.8	27.17	23.93	60.5	77.5	70.6
C18:2	54.18	60.8	52.31	20.67	13.2	11.6
C20:0	0.46	0.29	0.37	0.2	0.3	0.44
C18:3	1.23	0.28	7.31	9.5	0.28	0.88

Çizelge 1. 3`te de görüldüğü gibi yağları oluşturan yağ asit türleri ve miktarları birbirinden farklılık göstermektedir. Bu değişimin nedeni yağın trigliserit yapısından kaynaklanmaktadır. Yağın trigliserit yapısı değiştikçe yağ asit kompozisyonu da buna paralel olarak değişmektedir.

1.1.1.3. Steroller

Steroid alkol olan steroller, hayvansal ve bitkisel yağlarda bulunurlar ve 8-10 karbonlu bir yan zincirle alkol grubu içeren steran halkalı bileşiklerdir (Başoğlu 2006, Arslan 2009). Fitosteroller olarak isimlendirilen bitkiselsteroller, katı ve sıvı yağlarda glukozitler, serbest ve yağ asidi esterleri halinde bulunurlar (Arslan 2009). Kimyasal yapıları ile kolesterole çok benzeyen sitosteroller yan zincir grubu farklılığıyla kolesterolden ayrılırlar (Sivrikaya 2007). Yağ, tohum, fındık, ceviz ve bazı sebze ve meyvelerde bulunan bitki sterolleri hayvanlarda bulunan sterollerden oldukça farklılık gösterirler. Bu nedenle %5'i emilen bitki sterollerinin sağlıklı kişilerdeki plazma seviyeleri çok düşüktür (Sivrikaya 2007). Bitkisel steroller genel olarak **Şekil 1. 3**`de de gösterildiği kampesterol, β-sitosterol, stigmasterol ve Δ5-avenasterolleri içerirler.



Şekil 1. 3 Sterol Bileşikleri (Christie. 2011)

Sterollerin farklı türleri fotosentetik organizmalarda farklı oranlarda ve türde bulunabilmektedir. 200'den fazla farklı sterollerin doğada mevcut olduğu bilinmektedir. Örneğin mısır yağında 60 farklı sterol olduğu yapılan çalışmalarda ortaya konulmuştur. Kaba bir genelleme yapılacak olunursa tipik bir bitki sterol karışımında 70% sitosterol, 20% stigmasterol ve 5% campesterol (yada >70% 24-ethyl-sterol ve <30% 24-methyl-sterol) olacaktır. Bazı bitkilere ait sterol kompozisyonu **Çizelge 1. 4**`de yer verilmiştir (Christie. 2011).

Çizelge 1. 4 Bazı Bitkilere Ait Sterol Kompozisyonları (Christie. 2011)

	Corn oil	cottonseed	olive	palm	rapeseed	safflower	soybean	sunflower
cholesterol	-	-	-	26	-	-	-	-
campesterol	2691	170	28	358	1530	452	720	313
stigmasterol	702	42	14	204	-	313	720	313
β-sitosterol	7722	3961	1310	1894	3549	1809	1908	2352
Δ5-avenasterol	468	85	29	51	122	35	108	156
Δ7-stigmastenol	117	-	58	25	306	696	108	588
Δ7-avenasterol	-	-	-	-	-	104	36	156
brassicasterol	-	-	-	-	612	-	-	-
other	-	-	-	-	-	69	-	39

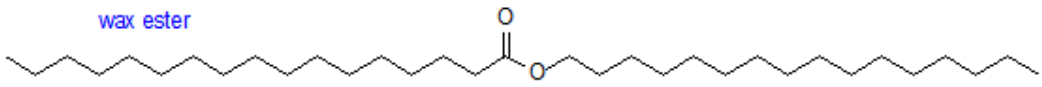
Kolesterol gibi bitki sterolleride amfifilik ve tüm membranlarda bulunurlar ve özellikle plazma zarı, mitokondriyal dış zarı, endoplazmik retikulumun önemli bileşenleridir. Bitki sterollerinin düzlemsel yüzeylerde olduğu gibi molekülün hem alt hem üst yüzeylerinde membranların katı sterol ve diğer moleküller arasında çoklu hidrofobik etkileşimlere izin veren üç boyutlu bir yapısı vardır. Sitosterol ve 24-methylcholesterol memeli hücrelerindeki kolesterole benzer bir şekilde yağ açil zincirlerinin hareketliliğini kısıtlayan bitki membranlarındaki membran akışkanlığını ve geçirgenliğini düzenlenmesinin mümkün olduğuna inanılmaktadır. Bu bitki membranları sıcaklık değişimlerine adapte olabilmektedirler. Stigmasterolün daha az lipid sıralaması üzerine ve membran geçirgenliği üzerinde bir etkisi vardır. Plazma zarındaki bitkisel steroller hayvan hücrelerindekilere benzer şekilde glikosphingolipids ile ilişkilendirilirler (Christie. 2011). Ayrıca yapılan çalışmalarda bitki sterollerinin kolon kanseri gelişimini de engellediği gösterilmiştir (Sivrikaya 2007).

Sağlık ve beslenme endüstrisi için önemli tarım ürünleri olan bitki sterolleri, kozmetik sektörü için emülsiyon oluşturucu ve steroit hormon ilaçlarının üretimi için prokürsör ve ara kaynağı, kızarma yağları için anti-polimarizasyon ajanları ve margarinlerde kolesterol absorpsiyonunu düşürücü olarak kullanılmaktadırlar (Yücel 2006).

1.1.1.4. Vakslar (mum)

Biyokimyacılar hayvanların derisi ya da böcekler için yüzeylerinin kaplanmasını sağlayan veya bitkilerin yapraklarını kaplayan yağ bileşenleri ile wakslar arasında bağlantı kurarlar. Uzun zincirli yağ alkolleri ile uzun zincirli yağ

asitlerinin esterleri temel bileşen olarak vaks esterlerini içerme eğilimindedir. Vaks'lar doğal olarak oluşan ve uzun zincirli yağ asitleri ile alkollerden oluşan esterlerdir (genellikle C36 - C50). (Christie. 2011).



Şekil 1. 4 Vaks Esteri

Bitkilerin yaprak yüzeyleri sayısız fonksiyona sahip vakssı ince tabakalı bir materyal ile kaplanmıştır. Bu tabaka cuticular membran, dış sınırını oluşturan ve yapısındaki mikrokristalindir. Yani bitki ile atmosfer arasındaki ara yüzeydir. Örneğin vakslar, zararlıları caydırmak ya da yararlı böcekler; çekebilecek uçucu bileşiklerin kontrollü salınımına izin verirken, su ve çözünen yayılmasını sınırlayan pek çok amaca hizmet eder. Vakslar hastalıklara ve böceklere karşı koruma sağlarken bitkileri kuraklığa karşı korumada da yardımcı olurlar. Bitki wakslarındaki lipid türlerinin aralığı doğasına ve kompozisyonuna bağlı olarak oldukça yüksek değişkenlik göstermektedir. Lipid bileşenlerinin doğası mumsu malzemenin kaynağı ile büyük ölçüde değişebilir. Zincir uzunluğu ve doymamışlık derecesi ve alifatik bileşenlerinin dallanması vaksın kökeni ile değişebilir (Christie. 2011).

Vaks esterleri ω-2 ve ω-3 pozisyonlarındaki hidroksil grupları ile 16:0 ve 18:0 yağ asitlerine dayalı C40 - C46 moleküler türlerinden oluşur. Buna ek olarak, 64 karbona kadar bazı diesters, triesters, hidroksi-polyesterler ve serbest asitleri (esterleşmiş asitlerden farklı kompozisyonu ve yapısı olan) ile birlikte bulunabilir (Christie. 2011).

Meksika ve ABD'nin yarı-kurak bölgelerde yetişen Jojoba bitkisi (simmondsia chinensis), vaks esterlerinin üretiminde tohumdaki triaçilgliserollerin yerine geçerek benzersiz ve önemli bir ürün haline gelmiştir. 18:1 (6%), 20:1 (35%) ve 22:1 (7%) yağ asitlerine bağlı 20:1 (22%), 22:1 (21%) ve 24:1 (4%) yağ alkollerinden oluşur. Bağlı çift bağ bulunmadığından oksidasyona karşı oldukça dayanıklıdırlar. Vaksların bir kısmı kozmetik, yağlar, cila, yüzey kaplama, mürekkep ve diğer birçok uygulamada kullanım için büyük miktarlarda ticari olarak üretilmektedir. Bunlardan bazıları (örneğin Montan vaksı kahverengi kömür / turba

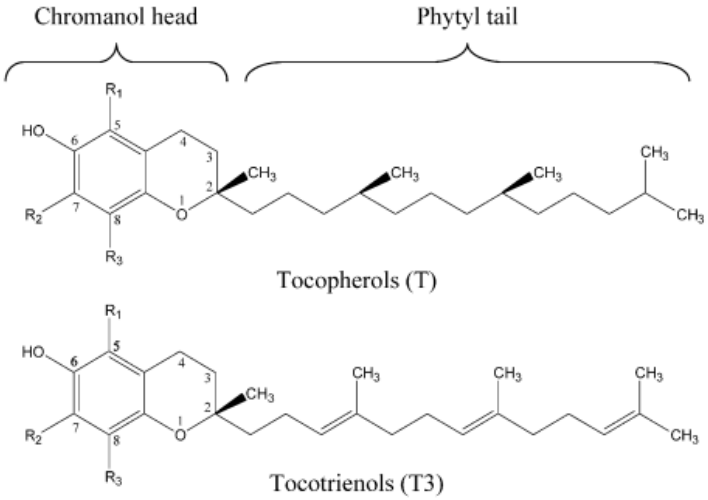
depozit) mineral kökenlidir. Ayçiçek ve zeytinyağlarına ait vaks kompozisyonu analizleri **Çizelge 1. 5**`de gösterilmiştir. Çizelgeden de görüldüğü gibi yağ cinsi ve çeşidi değiştikçe yağda bulunan vaks esterinin cinsi ve miktarı değişmektedir. Özellikle sızma ürünlerdeki vaks oranının rafine ürünlerdekinden daha az olduğu yapılan çalışmalarda görülmüştür (Aragon 2011).

Çizelge 1. 5 Bazı Yağlara Ait Vaks Kompozisyonları (Aragon 2011)

mg/kg	Sızma Zeytin Yağı	Rafine Zeytin Yağı	Rafine Ayçiçek Yağı
C40	29,06	48,06	80,20
C42	28,49	72,31	64,21
C44	20,31	80,31	35,39
C46	13,14	45,24	-
Toplam	91,00	245,95	179,80

1.1.1.5. Tokoferol ve tokotrienoller

Tokoferol ve tokotrienoller, pek çok bitkisel yağda doğal olarak bulunan önemli izo bileşenlerdir. Tokoferol ve tokotrienoller, uzun ve doymuş izoprenoid yan zincir taşıyan 6-hidroksi kroman türevleridir ve birlikte tokol diye kısaltılırak E vitamini terimi altında tanımlanırlar. Metil halkasının yeri ve adedine bağlı olarak sekiz çeşidi vardır. Bu tokol türleri **Şekil 1. 5**`da gösterilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi tokoferoller phytyl, tocotrienoller isoprenyl yapısında bulunmaktadırlar. Her iki yapıda da metil grubunun pozisyonu tokoferol ve tokotrienolün α, β, γ ve δ yapısının oluşmasına neden olmaktadır. Metil grupları 5,7,8 pozisyonlarında olduğunda alfa , 5,8 pozisyonunda beta, 7,8 pozisyonunda gama, 8 pozisyonunda olduklarında delta tokoferol ve tokotrienol isimlerini oluşturmaktadırlar (Kamal-Eldin ve ark., 2000).



Isomers	R_1	R_2	R_3	Position of Methyl Group
α	CH_3	CH_3	CH_3	5,7,8-Trimethyl
β	CH_3	H	CH_3	5,8-Dimethyl
γ	H	CH_3	CH_3	7,8-Dimethyl
δ	H	H	CH_3	8-Monomethyl

Şekil 1. 5 Tokoferol ve Tokotrienollerin Kimyasal Yapıları (Chuna ve ark., 2006)

Tokoferoller (E vitamini) ve tokotrienoller, antioksidan özellikleri gösteren ve bu özellikleri sebebiyle yemeklik yağların raf ömürlerini arttırarak yağları oksidasyona karşı dirençli kılan önemli biyoaktif maddelerdir.

Yapılan birçok çalışma; bu bileşiklerin kardiyovasküler hastalıklar, bazı kanser türleri ve diğer kronik hastalıkların riskini azalttığını, LDL oksidasyonunu engellediğini, lipoproteinlerdeki lipit oksidasyonunu önlemede belirleyici rol oynayarak kalbin çalışmasını rahatlatdıkları ve kansızlığa karşı koruyucu etki gösterdikleri vurgulanmıştır (Uncu 2008).

Çizelge 1. 6 Bazı Yağlara Ait Tokoferol ve Tokotrienol İçerikleri (Ghosh 2009)

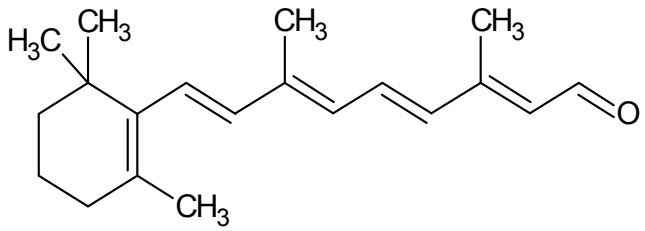
	Tokoferol (mg/100gms)					Tokotrienol (mg/100gms)				
Kaynak	**Alfa**	**Beta**	**Gama**	**Delta**	**Toplam**	**Alfa**	**Beta**	**Gama**	**Delta**	**Toplam**
Palm Yağı	20.5	-	43.9	9.4	73.8	15.2	-	-	-	15.2
Pirinç Kepeği	23.6	-	34.9	-	58.5	32.4	1.8	5.3	-	39.5
Ruşeym	2.4	16.5	-	-	18.9	117.9	39.8	49.3	11.8	218.8
Arpa	67	12	12	-	91	35	5	5	-	45
Yulaf	18	-	3	-	21	18	2	5	5	30
Hindistan Cevizi	0.5	0.1	1.9	-	2.5	0.5	-	-	0.6	1.1
Palm Çekirdeği Yağı	2.1	-	-	-	2.1	1.3	-	-	-	1.3
Soya Yağı	-	-	-	-	0	10.1	-	59.3	26.4	95.8
Aspir Yağı	-	-	-	-	0	38.7	-	38.7	-	77.4
Fıstık Yağı	-	-	-	-	0	13.0	21.6	2.1	-	36.7
Kakao Yağı	0.2	-	-	-	0.2	1.1	-	17	1.7	19.8
Zeytin Yağı	-	-	-	-	0	5.1	-	-	-	5.1
Ayçiçek Yağı	-	-	-	-	0					48.7
Kanola Yağı	-	-	-	-	0					65

Çizelge 1. 6`da da görüldüğü gibi yağlarda bulunan tokoferol ve tokotrienol miktarları birbirinden farklılık göstermektedir. α-ve γ-tokoferoller bitkisel yağlardaki temel tokoferoller olduğu yapılan çalışmalarda kanıtlanmıştır. Buğday tohumu yağı α- tokoferol için, soya, soğuk preslenmiş kanola ve mısır yağı da γ-tokoferol için en iyi kaynaklar oldukları yapılan çalışmalarda görülmüştür. Buğday tohumu yağı, camelina, kolza, mısır ve ayçiçek yağları içerdiği tokoferoller bakımından en önemli bir kaynak olmaları yanında endüstriyel bir yağ olarak kullanılan palm yağı ve türevleri ve rice bran da tokotrienol bakımından en zengin kaynaktırlar. Yapılan birçok çalışmada farklı yağlarda bulunan tokotrienollerin analizinde tokotrienollerin yerlerinin tespiti ve miktarlarının hesaplanmasında palm yağları standart madde olarak kullanıldığı bilinmektedir.

1.1.1.6. Vitaminler

Yağda ve suda çözünebilen olarak iki grupta sınıflandırılan vitaminler, canlılardaki hücre ve organların düzgün çalışabilmesi, metabolik olayların gerçekleşebilmesi, sağlıklı durumun sürdürülebilmesi için gerekli, yiyecekler ya da içeceklerle belirli miktarda alınması gereken, ileri biyolojik etkinliğe sahip organik bileşiklerdir (İreş 2009, Bilber 2010). Sadece karbon, hidrojen ve oksijenden oluşan yağda çözünen A, D, E ve K vitaminleri, provitamin halinde bulunurlar ve bunlar hayvan ve insan vücudunda bağırsaklarda yağ olduğu sürece emilerek aktif vitamine dönüşürler (İreş 2009).

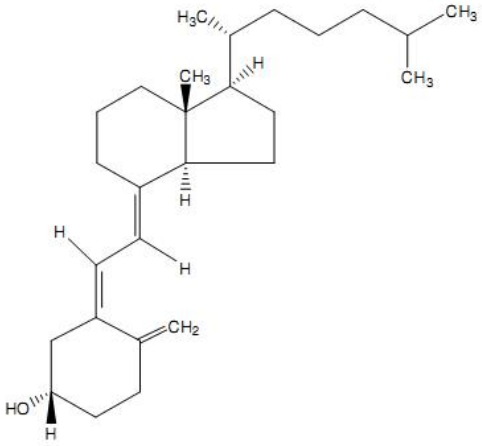
Tüm canlılar için gerekli olan A vitamini; hayvansal dokulardan; retinol, hidroretinol ve retinal esterler olarak veya bitkisel kaynaklardan; provitamin A karotenoidleri olarak iki değişik formda vücuda alınırlar (Bilber 2010, Sırt 1991). **Şekil 1. 6**`de de görüldüğü gibi çok sayıda konjuge çift bağ içeren karotenoidler, sekiz izopren artığının simetrik olarak diziliminden oluşurlar (Sırt 1991).



Şekil 1. 6 Vitamin A`nın Kimyasal Yapısı (All Trans Retinal)

Hastalıklara karşı direnç kazandırarak antioksidan özelliklere sahip esansiyel bir vitamin olanVitamin A; büyüme, göz ve epidel dokunun sağlığında, adrenal bezden salgılanan kortisteron sentezinde ve kırmızı kan hücresi yapımında yer almaktadır (Sırt 1991, Gökhan 2005). Eksikliğinde büyüme durur, kanser riski artar, gece körlüğü meydana gelebilir ve sinirsel bozukluklar oluşur (İreş 2009, Bilber 2010).

D vitamini stereoidler içerisinde antiraşitikler olarak anılmaktadır. Bu gurubun en önemli iki üyesi Vitamin D2 (ergokalsiferol) ve Vitamin D3 (kolekalsiferol) dir (Bilber 2010). Vitamin D2 bitkisel kaynaklı olup bir bitkisel stereoit olan ergesterolden türemiştir (Bilber 2010). **Şekil 1. 7**`de de görüldüğü gibi D3 vitamini ise 7-dehidrokollesterolden türemiştir. Ergesterol ve 7-dehidrokolesterolün D vitamini aktivitesi kazanmaları için, Ultraviyole ışınlarının etkisiyle stereoit yapıdaki halkanın 9-10 karbonları arasındaki bağın kopması gerekmektedir (İreş 2009, Bilber 2010). Bu pozisyonlar arasındaki b halkası açılmadıkça beslenme açısından önemi yoktur (İreş 2009).

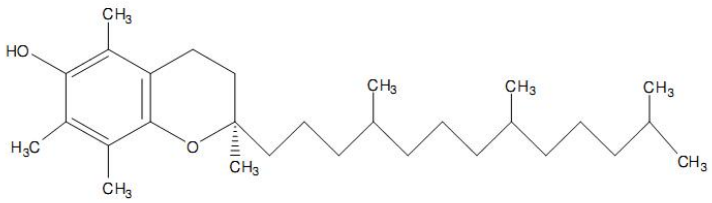


Şekil 1. 7 Vitamin D3`ün Kimyasal Yapısı (Cholecalciferol)

İnce barsaklarda emilen D3 vitamini, dışarıdan uygulandığında veya ağızdan alındığında sedef hastalığını iyileştirdiği, deride tümör oluşumunu önlediği, dişlerin oluşumunda yer aldığı , kemik yapısının güçlenmesinde önemli bir role sahip olduğu yapılan birçok çalışmada bildirilmiştir. (Bozkurt 2005, İreş 2009).

Vitamin D3 yetersizliğinde; kemiklerde zayıflama, eğrilik, kırılganlık, bacak çarpıklıkları, dişlede hızlı çürüme ve deri kanserlerine karşı eğilim sergiledikleri bilinmektedir (İreş 2009, Bilber 2010).

Metabolizmada biyolojik antioksidant olarak görev yapan, doğal halinde hemen bozulabilen, doğada 8 formu bulunan (α-, β-, γ-, δ- tokoferol ve tokotrienol) Vitamin E, yağda çözünen 6 hidroksi kroman bileşiklerinin genel ismidir (İreş 2009, Bilber 2010). Bitkisel ve hayvansal kaynaklarda en yaygın ve aktif olanı α-tokoferoldür (**Şekil 1. 8**).

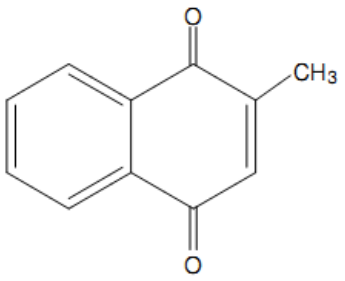


Şekil 1. 8 Vitamin E`nin Kimyasal Yapısı (α-Tokoferol)

Doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu önleyen ve yağların raf ömrünü arttıran E vitamini, canlı metabolizması içinde önemli bir bioaktif bileşiktir. Canlılar için hastalıklara karşı direnç kazandıran E vitamininin; sinir sisteminin, kasların, hipofiz ve sürrenaller gibi endokrin bezlerin ve üreme organlarının fonksiyonları, atardamar hastalıklarının ve kanserin önlenmesi, nükleik asit metabolizması, askorbik asit sentezi, ve kükürtlü aminoasit metabolizması için önemli oldukları yapılan bir çok çalışmada vurgulanmıştır (Vikipedi, 2012).

Yapılan çalışmalarda E vitamini noksanlığında; kaslarda daha çok oksijen kullanıldığı, normal büyümeyinin durduruğu, hücrelerde doymamış yağ asitlerinin azaldığı ve mitokondrilerde, lizozomlarda ve hatta hücre zarı gibi organellerde anormal yapısal ve işlevsel değişikliklerin meydana geldiği görülmüştür (Bilber 2010,Vikipedi, 2012).

ismini kanı pıhtılaştıran anlamına gelen Koagülan kelimesinin baş harfinden alan, yağda eriyen esansiyal bir vitamin olan K vitamini, proteinlerin biyosentezi sırasında glutamik asidin, γ-karboksi glutamik aside (Gla) dönüştüğü enzimatik reaksiyonda görev alır (Doğan 2005, Gürbüz 2006). **Şekil 1. 9**`de de gösterildiği gibi temel yapısı 2-metil-1,4 naftokinon olan K vitaminin; K1 ve K2 şeklinde gösterilen iki doğal, K3 (Menadione) adında da bir sentetik türevi mevcuttur (Doğan 2005).



Şekil 1. 9 Vitamin K3`ün Kimyasal Yapısı (Menadione)

Isıya dayanıklı olan, bazlar, kuvvetli asitler, radyasyon ve yükseltgenler tarafından etkisizleştirilebilen, ince barsaktan emilen K vitaminleri, karaciğer, yağ dokusu ve kemikte depolanırlar (Doğan 2005, Çoban 2007).

Bazı özel durumlar hariç sık görülmeyen K vitamini eksikliklerinde, kanın pıhtılaşma süresi uzadığı, karaciğerde protrombin sentezini engellediği, anemi ve genel olarak vücut yüzeyinde hemoraji oluşduğu, kuslarda bazı patolojik durumlara yol açtığı, göbek, dişeti ve burun kanaması olduğu, kanamanın durdurulamadığı ve yara üzerinde kabuk oluşamadığı yapılan çalışmalarda vurgulanmıştır (Doğan 2005, Çoban 2007, Bilber 2010).

1.1.1.7. Polar ve Polimerik Maddeler

Polimerizasyon, polimerize olabilen iki molekülün birleşerek makro ya da daha büyük formda yeni bir molekül formu oluşturmasıdır. Polimerizasyonun devam etmesi halinde giderek büyüyen ve daha yüksek moleküler ağırlığına sahip moleküller oluşur.

Isıl işlemler, hidroliz, oksidasyon ve triaçilgliserol moleküllerinin polimerizasyonu, bozunma ürünlerinin oluşumu, uçucu veya kalıcı bileşikleri de içine alan çeşitli kimyasal reaksiyonların oluşmasına yol açar. Isıtma işlemi sırasında, farklı trigliseritlerdeki doymamış yağ asitlerinin farklı reaksiyonları geniş bir ürün çeşitliliğine neden olabilir. Bu reaksiyonlar sırasında oluşan dimer, oligomer ve polimerler de dahil olmak üzere polimerize triaçillgliseridler (PTGs), önemli bir alt grup oluştururlar (Kuligowski 2010). Bozunma ürünlerinin çoğu ısıtma işlemi sırasında oluştuğundan, yağın polimerleşmesi sırasında kaybolurlar.

Yağın aşırı ısıtılması ve ısıtma işleminin devamı sırasında yağ kalite parametrelerinden olan polimerik ve polar madde miktarı da artacağından belli bir sınır değere ulaşıldığında yağların atılması gerekmektedir. Özellikle gıdaların kızartılması sırasında yağ kalitesi düşmüş bir yağ ile kızartma işlemine devam edilmesi halinde insan sağlığı açısından telafisi mümkün olmayan sonuçların oluşabileceği unutulmamalıdır. Bu nedenle kızartma yağları sınır bir değere ulaştığında atılmaları gerekmektedir. Bu değer ülkeden ülkeye değişmekle beraber toplam polar madde miktarı (TPC) %23-29 iken, polimerik triaçilgliserol (PTG) % 13-15 arasında değişmektedir. Türk Gıda Kodeksinde bu değerler toplam polar madde miktarı (TPC) %25 ve polimerik triaçilgliserol (PTG) % 15 olarak belirlenmiştir(Arslan 2009).

1.1.1.8. Spektroskopik özellikler

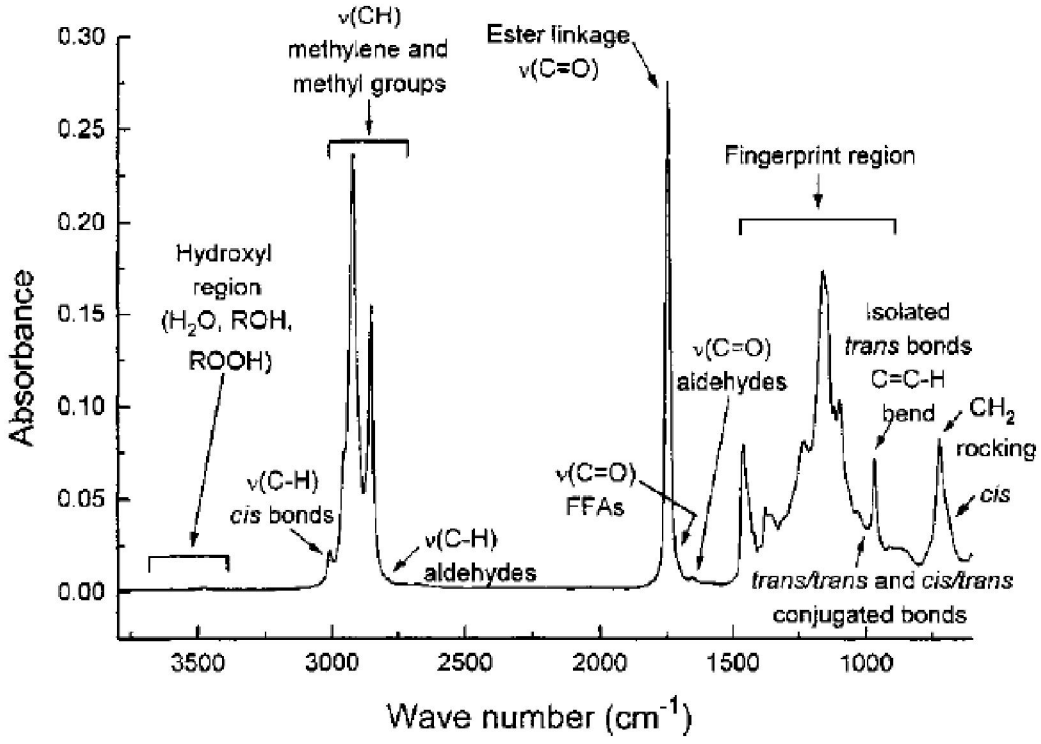
UV ve görünür spektroskopi, yağ analizleri için az kullanılanılan bir metot olmasına rağmen lipidlerin tanımlanması ve ölçülmesi için özel uygulamaları olan bir metottur. organik bileşiklerin UV ve görünür spektrumları elektronik uyarmalar veya geçişlerle ilişkilendirilirler. Çift, üçlü yada konjuge çift bağlı organik moleküller ile karbonil yada nitro grupları gibi yüksek elektron yoğunluklu fonksiyonel gruplar, karakteristik dalga boylarında ve molar uyarma değerlerinde ultraviyole veya görünür bölgedeki ışınları absorplarlar (Shahidi 2002). Yağların uv-visible spektro fotometrik tayinleri genel olarak; renk pigmentleri, konjuge dien ve trienelerin tayini, ağartılabilme indeksleri ve fosfor miktarı analizleri gibi oksokrom ve kromofor grupların analizleri üzerinedir (**Çizelge 1. 7**.). Özellikle klorofil, β-karoten ve renk değerleri yağ kalitesinin önemli bir parametresi olması hasebiyle yağ rafinasyonu sırasında ve son üründe yapılması gereken önemli parametrelerdir. Aynı şekilde birincil ve ikincil oksidasyon ürünlerinin direk tayin metodu olan konjuge dien ve trienler yağ kalite parametre değerleri için de özellikle kontrol edilmesi gereken parametrelerdirler.

Çizelge 1. 7 Bazı Kromofor Grupların Uv Absorpsiyon Özellikleri (Shahidi 2002)

Kromofor	Örnek	λ_{max}	ε_{max}	Çözücü
-C=C-	Okten	177	12,600	Heptan
-C/C-	Oktin	178	10,000	Heptan
		196	2,100	
-C=C-C=C-	Butadien	217	20,900	Hekzan
$-(C=C)_n-$	Konjuge Polienler	217 + 30(n-2)	20,000-100,000	Hekzan
C_6H_6	Benzen	184	47,000	Siklohekzan
		202	7,000	
		255	230	
$-(C=C-C=C)_n-$	β-Karoten	452	139,000	Hekzan
		478	12,200	
HC=O	Asetaldehit	290	17	Hekzan
C=O	Aseton	275	17	Etanol
-COOH	Asetik-Palmitik Asit	208-210	32-50	Etanol

IR spektroskopisi Lipidlerin analizi için uygulanan ilk spektroskopik yöntemdir. Bir yağın IR spektrumu, yağın yapısı ve fonksiyonel grupları üzerine ve yağla ilgili kirlilikler hakkında önemli bilgiler verir. Bu bilgiler, **Şekil 1. 10**'de de gösterildiği gibi, pik zirveleri ya da omuzları olarak temsil edilmektedir. IR absorpsiyon sinyalleri yağların kalitatif olarak yapısal ve fonksiyonel grupları

hakkında bilgi verir ve analizine imkan sağlar. IR bant yoğunlukları doğrusal emici moleküler türlerin konsantrasyonu ile ilgili olduğundan, lipid hakkında nicel bilgi de elde edilebilir. IR spektroskopisi polimorfizm, kristal yapısı, uyumu ve zincir uzunluğu hakkında bilgi almak için katı yağlar için de uygulanmıştır. Yağlarda IR yaygın olarak trans doymamışlığının varlığını ve içeriğini tespitinde kullanılmaktadır. Tekli trans çift bağlar 968 cm^{-1}`de karakteristik bir absorbsiyon bandı gösterir ve bu ek konjuge çift bağlar olmadığı sürece, frekans değişmez. Bu durum doymamış cis IR bandları için geçerli değildir. Yapılan birçok çalışmada yağların temel sınıflarının tanımlanması için teşhis değerlere sahip karakteristik IR absorpsiyon frekanslarının olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca fosfolipidlerin iyonik formlarının spektrumlarının yorumlanmasını etkileyen fosfat grupları ile ilişkili absorpsiyon bantlarının etkisi olduğu da rapor edilmiştir. FTIR spektrometresi iyot değeri, sabunlaşma değeri ve FFAs ölçümlerinde kullanımları bulunmaktadır. Peroksitler ve ikincil oksidasyon ürünlerinin oluşumuna yansıyan lipid oksidasyon kararlılığı FTIR tarafından da belirlenebilmektedir (Shahidi 2002).

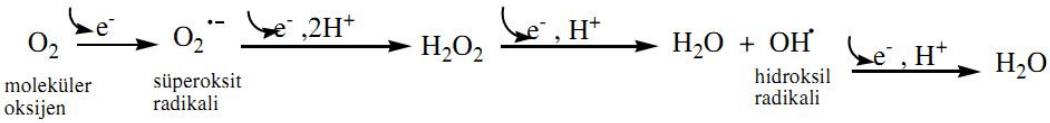


Şekil 1. 10 Yağa Ait FTIR Spektrumu (Shahidi 2002).

Şekil 1. 10`de de görüldüğü gibi 3700–3400 $cm^{-1}$`de su ve hidroperoksitler bulunurken 3700–3400 cm^{-1}`de zayıf CH=CH cis bantları ile kuvvetli yağda bulunan alifatik zincirlerin CH_2 absorpsiyon bantları görülür. Spektrumun merkezine doğru kuvvetli trigliserit yapısını oluşturan gliserin ve yağ asidinin oluşturduğu C=O ester bağları bulunur. Bunun yanında hidrolize olmuş FFA gruplarının COOH bandı bulunur. Aynı bölgede okside olmuş aldehit (R-CHO) ve keton (R-CO-R) grupların karbonil absorpsiyon bantları da bulunur. 900-1500 cm^{-1}`de barmak izi bölgesinde zayıf, yağın moleküler kompozisyonu ve farklı moleküllerin tespit edildiği karakteristik absorpsiyon bantları bulunur. Parmak izi bölgesinin sonunda yağdaki düşük frekanslı CH=CH trans pikleri görülür. Ayrıca bu bölgenin yanında trans-trans ve cis-trans çift bağ içeren konjuge dienler ilgili absorpsiyon bantları da biraz görünür (Shahidi 2002).

1.1.1.9. Antioksidan kapasiteleri

Oksidasyonu önemli düzeyde geciktiren ya da engelleyen maddeler olarak tanımlanan antioksidanlar; oksijenin eksik indirgenmesi ve normal oksijen metabolizması sırasında az miktarda oluşan süperoksit radikali ($O_2^{\cdot -}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali ($OH^{\bullet}$) gibi reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşmasına ve reaktif oksijen türlerinin neden olduğu karbon merkezli organik radikallerin ($R^{\bullet}$), peroksit radikallerinin ($ROO^{\bullet}$), alkoksi radikallerinin ($RO^{\bullet}$), tiyil radikallerinin ($RS^{\bullet}$), sülfenil radikallerinin ($RSO^{\bullet}$), tiyil peroksit radikalleri ($RSO2^{\bullet}$) gibi çeşitli serbest radikallerin oluşumuna engel olurlar (Şerbetci 2007, Sağlam 2007, Aktürk. 2010).



Normal metabolik olaylar esnasında ve organizmanın çeşitli dış etkenlere maruz kalmasıyla oluşan, yaşam süreleri çok kısa, bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron ihtiva eden atom veya moleküller olan serbest radikaller, tamamı membranlı ve metabolik fonksiyonlar için gerekli elemanlar olan hücrelerdeki; protein, lipid ve nükleik asitler gibi önemli makromoleküllerle etkileşerek hücrelerin yapı ve

fonksiyonlarında önemli değişikliklere yol açabilen oldukça reaktif maddelerdirler (Öner. 2008, Akdeniz 2010).,

Okside olabilen substratların oksidasyonlarını önleyen veya geciktiren moleküller olarak tanımlanan, insan vücudunda açığa çıkan serbest radikallerin olumsuz etkilerinden korunmak için savunma mekanizmaları oluşturan, yağlarda lipid peroksit radikallerinin (LOO•) ve bunların meydana getirdiği lipid peroksitlerin (LOOH) , biyolojik olarak aktif olan aldehit ve keton oluşumunu engelleyen antioksidanlar, gıdaların yapısında doğal olarak bulunabildiği gibi, Maillard reaksiyonunda olduğu gibi gıdalardaki kimyasal reaksiyonların sonucunda da oluşabilen vitaminler (C ve E), karotenoidler ve fenolik bileşikler gibi bioaktif bileşiklerdirler ve hem tek başlarına hem de sinerjist olarak görev yaparak oksidatif reaksiyonları geciktirir veya engellerler (Sağlam. 2007, Aktürk. 2010).

Serbest radikallerle antioksidan savunma sistemi arasındaki dengenin serbest radikallerin artması yada antioksidanların azalması sonucu bozulması, oksidatif stresin açığa çıkmasına, çeşitli hastalıkların patogenezine olmasına ve ilerlemesine, aterogeneze, amfizem/bronşite, parkinson hastalığına, duchenne tipi musküler distrofiye, gebelik preeklampsisine, serviks kanserine, alkolik karaciğer hastalığına, akut renal yetmezliğe, down sendromuna, yaşlanmaya, retrolental fibroplaziye, serebrovasküler bozukluklara, iskemi/reperfüzyon injürisine yol açtığına dair görüşler ve bilimsel çalışmalar gün geçtikçe artmaktadır (Öner. 2008, Aktürk. 2010).

1.2. Nar Çekirdeği ve Yağının Özellikleri

Punicacea ailesinden ve bilinen en eski meyve türlerinden biri olan nar (Punica granatum Linn.), tropik ve sub-tropik iklim kuşağında yetişen bir meyvedir (Turfan 2008). Meyvenin olgunlaşması için sıcak ve uzun bir yaz mevsimi gerekli olup yarı kurak iklimlerde ilave sulamaya ihtiyaç duymadan yetişebilmektedir (Turfan 2008, Çam 2009). Nar'ın anavatanı Türkiye, Suriye, Irak, İran, Azerbaycan, Afganistan ve Pakistan'ı içine alan Güneybatı Asya olarak bildirilmektedir. Halen İspanya'dan Türkiye'ye, bütün Akdeniz ülkelerinde, Ürdün, Irak ve İran gibi Ortadoğu ülkelerinde, Kırım'dan başlayıp Gürcistan, Azerbaycan,Hindistan ve Çin'e kadar uzanan Asya ülkelerinde, Şili ve Peru gibi Amerika ülkelerinde nar yetiştiriciliği yapılmaktadır (Yılmaz 2005, Turfan 2008, Çeltikci 2008, Çam 2009).

Ülkemizde; Bilecik, Balıkesir, İzmir, Aydın, Denizli, Antalya, Maraş, Hatay, Bitlis gibi şehirlerde Narlı, Narlık, Narlıca, Narlıdere, Narlıova, Nardüzü, Narlıkuyu, Gülnar gibi yerleşim merkezi adlarını bulunduran nar çeşitleri bulunmaktadır. Ege, Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu bölgeleri başta olmak üzere ülkemizde 48 ilde nar üretimi yapılmaktadır (Turfan 2008, Çam 2009).

Nar meyvesi iri, küresel ve üstten hafif basık, 5-14 cm çapında, 1-5 mm kalınlığında beyazımsı sarı, sarı yeşil veya kırmızı renkli derimsi yapıda bir kabukla kaplı, içi beyaz-sarıdan, pembe, kırmızı ve koyu kırmızı mora kadar değişen renlerde danelerden oluşan, odacıklı bir yapıya sahiptir (Yılmaz 2005).

Besin bileşimiyle insan beslenmesinde önemli faydaları olan narın yenebilen kısmı, yani daneleri, %78'i meyve eti, %22'si ise, çekirdekten oluşmaktadır (Turfan 2008, Çeltikci 2008). Meyve; yüksek oranda şeker, mineraller açısından zengin ve yüksek düzeyde olmasa da A, C, E ve K vitaminlerini içerirken çekirdeği kuru madde üzerinden %6,63-19,3 lipit, lignin, selüloz ve polisakkarit ve yüksek oranda tokoferol ve flavonoid içermektedir (Çeltikci 2008, Çam 2009).

Çizelge 1. 8 100 g Nar Danesinin Özellikleri (Çeltikci 2008)

İçerikler	Miktar (g ve mg)	İçerikler	Miktar (g ve mg)
Su	72.6-86.4 g	Sodyum	3.0 mg
Enerji	63-78 kcal	Potasyum	259 mg
Protein	0.05-1.6 g	Magnezyum	9 mg
Yağ	0.9 grama kadar	Karoten	iz düzeyde
Karbonhidrat	15.4-19.6 g	Thiamin	0.003 mg
Lif	3.4-5.0 g	Riboflavin	0.012-0.03 mg
Kül	0.36-0.73 g	Niasin	0.180-0.3 mg
Kalsiyum	3.0-12.0 mg	Askorbik Asit	4.0-4.2 mg
Fosfor	8.0-37.0 mg	Sitrik Asit	0.46-3.6 mg
Demir	0.3-1.2 mg	Barik Asit	0.005 mg

Son zamanlarda, omega-3, omega-6, omega-9 ve konjuge yağ asitlerine sahip, antioksidan ve vitamin bakımından zengin yağlara olan ilgi gün geçtikçe artmaktadır. Nar çekirdeği yağı, nar ekşisi ve suyu üretimi sırasında yan ürün olarak açığa çıkan, posada bulunan ve çeşitde bağlı olarak kilogram meyve kütlesi başına 40 ila 100 gram arasında değişen nar çekirdeğinden elde edilir (Çam 2009).

Çeşitli hastalıkların tedavisinde destek olarak doğal kaynakların tercih edilir olması, hayvan yemi ve atık olarak kullanılan nar çekirdeklerinin yağlık bir hammadde olarak kullanımlarını artırdığı görülmektedir. Nar çekirdeğinin yararları

hakkında çok olumlu araştırma sonuçları ortaya çıkmaya başladıkça, nar çekirdeği içeren ürün çeşitlerinin hem arzı hem de tüketimi artmaya başlamıştır. Nar üreticiliği bölgesi olarak adlandırılan Akdeniz bölgesinde bulunmamız nedeniyle de Ülkemizde, nar çekirdeği büyük bir önem kazanmaya başlamıştır.

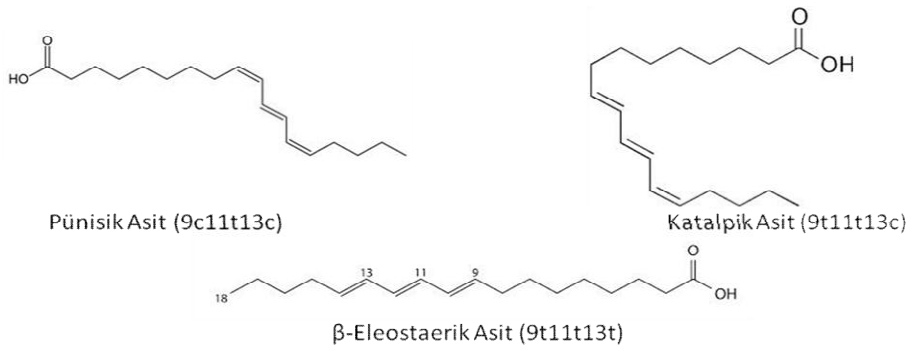
Konjuge yağ asitleri, esansiyel bir yağ asidi olan ve 18 karbon atomu ile iki vea daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin konjuge olmuş çok sayıdaki pozisyonel ve geometrik izomerlerinin karışımı için kullanılan ortak bir terimdir. Bu yağ asitleri genel olarak iki alt grupta toplanırlar; linoleik asitin konjuge formu olan konjuge linoleik asit (CLA) ve linolenik asitin konjuge formu olan konjuge linolenik asit (CLnA). Vücutta sentezlenemeyen ve elzem olarak adlandırılan çoklu doymamış yağ asitleri insan sağlığı için gerekli olduğundan; hayvansal kaynaklarda konjuge çoklu doymamış yağ asitleri genellikle %1 den az bulunmaktadır (Çam 2009). Ancak Pot marigold (Calendula officinalis)", "catalpa (Catalpa ovata)", "tung (Aleutrites fordii)", acı kabak, mahlep ve nar çekirdeği gibi çekirdeklerden elde edilen bitkisel kaynaklı çekirdek yağlarında konjuge linolenik asitler (CLnA) toplam yağ asitlerinin %40-80'lik bölümünü oluşturmaktadır (Yücel 2005, Çam 2009).

Çizelge 1. 9 Nar çekirdeği yağı yağ asit kompozisyonu değerleri

	Schubert 1999	Nagao 2005	Yamasaki 2006	Melgarejo 2000	Habibnia 2012
C16:0 (Palmitic)	4.8	3.1	3.1	5.95	3.16
C18:0 (Stearik)	2.3	2.0	1.8	3.23	2.09
C18:1 (Oleik)	6.3	4.5	5.4	9.01	6.62
C18:2 (Linoleik)	6.6	5.1	5.3	10.09	6.95
C18:3 (Linolenik)	-	-	-	-	-
C18:3 (Punisik)	65.3	71.7	83.1	71.06	79.43
C18:3 (Katalpik)	-	5.1	-	-	-
C18:3 (β-Eleostarik)	-	1.6	-	-	-
C18:3 (α-Eleostarik)	-	2.8	-	-	-
Diğerleri	-	-	-	-	1.72
Bilinmeyen	0.4		-	-	-
Bilinmeyen	8.3		-	-	-
Bilinmeyen	6.0		-	-	-

Konjuge linolenik asit (CLnA) üç konjuge çift bağ içeren oktadekatrienoik asitlerin pozisyonel veya geometrik izomerleridirler. Geometrik izomerleri cis ve trans olarak iki farklı şekilde ve pozisyonel izomerleri çift bağın bağlandığı karbonun zincirdeki yerine göre 8,10,12 veya 9,11,13 olarak iki farklı biçimde oluşur. CLnA'in

bilinen 7 izomeri vardır. Ancak bunlardan en çok bilinen 5 tanesi α-eleostearik asit (c9,t11,t13-18:3), β-eleostearik asit (t9,t11,t13-18:), punisik asit (c9,t11c13-18:3), katalpik asit (t9,t11c13-18:3), kalendik asit (t8,t10,c12-18:3), jakarik asit (c8,t10,c12-18:3)'tir (Yücel 2005, Süzen 2009).



Şekil 1. 11 Nar Çekirdeği Yağında Bulunan Temel Yağ Asitleri

Sitotoksik etkisi olan CLnA'nın, antikanserojen etkisi olduğu bilinen CLA`ya göre daha etkin olduğu, karaciğer, kolon, göğüs ve mide kanserlerinde kanserli hücrelerinin gelişimini ve büyümesini durdurduğu hatta kolon kanserine neden olan hücrelerin hücre ölümlerine yardımcı olduğu ve kandaki yağ oranını da düzenlediği bulunmuştur (Süzen 2009).

Ayrıca nar çekirdeği yağı, yapısında yüksek miktarda konjuge yağ asitleri bulundurmasından dolayı çok büyük oranda tokoferolleri ve yağda çözünen vitaminleri de bulundurur (Caligiani 2010). Tokoferoller gibi antioksidanlar ve vitaminler, vücudumuzda kimyasal reaksiyonlar sonucu oluşan veya dışardan stres, güneş ışınları, sigara, alkol ve çevre kirliliği gibi etkenler sonucu alınan ve yaşlanma sürecini arttıran zararlı serbest radikalleri etkisiz hale getirerek, yaşlanma sürecinin yavaşlatılmasında önemli rol oynarlar (Uncu 2008, İreş 2009, Bilber 2010, Sağlam. 2007, Aktürk. 2010).

1.3. Yağların Rafinasyonu

Yağlı tohumlar ve meyvelereden, kabuk ayırma, kırma, presleme, çözücü ekstraksiyonu ve ayırma metotlarıyla ayrılan yağlara ham yağ denir.

Ham yağ içinde bulunan yabancı maddelerin miktarı ve cinsi;

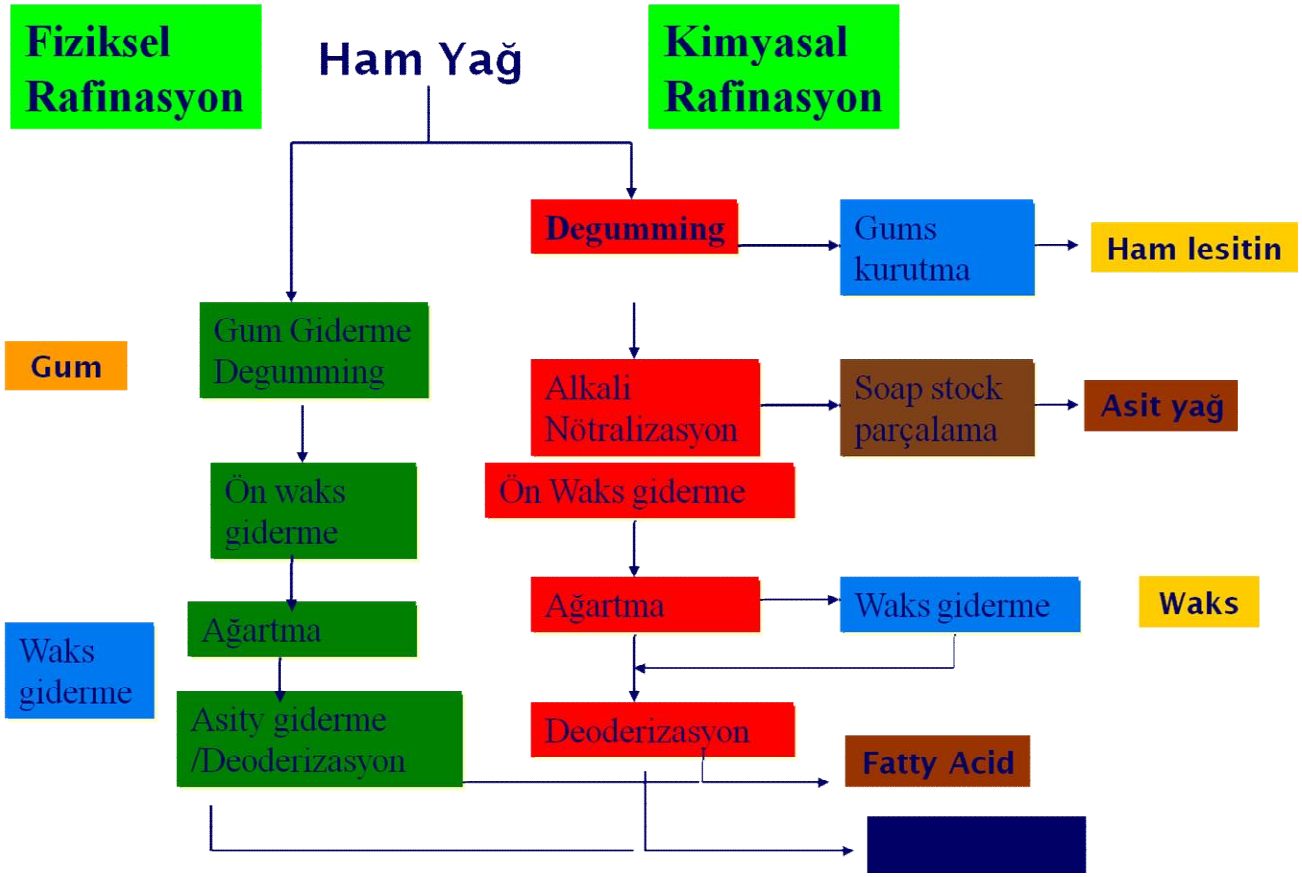
- Bitki yetiştirma koşullarına,
- Toprak yapısına ve iklim şartlarına,
- Depolama şartlarına,
- Tohuma uygulanan işlemlere,
- Yağ alma esnasındaki parametrelere bağlı olarak değişmektedir.

Tadı mükemmel, görüntüsü güzel, raf ömrü uzun ve sağlıklı bir yağ elde etmek için; ham yağın belirli aşamalardan geçirilerek yağ içindeki yabancı maddelerden tamamen uzaklaştırılması; yani rafinasyonu gereklidir. Rafinasyon, yağın tabii özelliğini bozmadan ve yapısını değiştirmeden ham yağdaki safsızlıkları uzaklaştırma işlemidir. Rafinasyonun verimli olabilmesi için, ham yağ eldesi sırasında aşırı ısıtmadan kaçınmak, depolamayı uygun koşullarda yapmak, hava ile teması en aza indirmek, uygun oranlarda ve hızda karıştırma yapmak, rafinasyon esnasında sıcaklık, süre, basınç ve yardımcı madde miktarlarını iyi ayarlamak gereklidir. Bunun için karıştırma, ısıtma-soğutma, aktarma, süzme, kristallendirme ve destilasyon gibi rafinasyon işlemlerinin otomasyonlu sürekli sistemlerde yapılması daha uygundur.

Rafinasyon prosesi yağların kalitesini ve ekonomik performanslarını belirleyen en önemli etkendir. Zayıf rafinasyon prosesleri ile elde edilmiş yağların kalitelerini arttırmak için ilave prosesler uygulanması gerekmekte ve bu da ilave maliyetler gerektirmektedir.

1.3.1. Rafinasyon Kademeleri

Rafinasyon prosesi yaklaşık olarak 30-35 saat süren kompleks bir işlemdir. Temelde ticari olarak uygulanan iki tane rafinasyon prosesi vardır. Bunlar kimyasal rafinasyon ve fiziksel rafinasyondur. Bu basamaklar sürekli, yarı sürekli ve kesikli sistemlerde yapılmaktadır. Rafinasyon 5 temel basamakta yapılmaktadır (**Şekil 1. 12**). Bunlar, kimyasal rafinasyonda; degumming, nötralizasyon, ağartma, vinterizasyon ve deoderizasyon kademeleriyken fiziksel rafinasyonda; degumming, ağartma, vinterizasyonu ve nötralizasyon ve koku giderme işlemlerinin tek kademede yapıldığı buharlı destilasyonu olan deoderizasyon işlemleridir (Başoğlu 2006, Ayyıldız 2010).



Şekil 1. 12 Fiziksel ve Kimyasal Rafinasyon Kademeleri (Kara 2008)

1.3.1.1. Degumming

Ham yağ eldesinde kullanılan bitkinin yetiştirilme koşullarına, toprak yapısına ve iklim şartlarına, depolama şartlarına, tohuma uygulanan işlemlere ve yağ alma esnasındaki parametrelere bağlı olarak başta lesitin olmak ham yağda bulunan fosfolipidler, proteinler, tutkal benzeri maddeler, nişasta, ve metaller oluşur (Başoğlu 2006, Kara 2008, Arslan 2009). Oluşan bu yağ harici maddeler degumming işleminde; su, fosforik asit, kostik ve sıcaklık yardımıyla hidratlaştırılarak ve parçalanarak uzaklaştırılırlar. Uzaklaşan bu maddeler yağda yağ asitlerine bağlanmış halde oldukları için yağda çözünmektedirler. Yağda çözünen bu maddeler fosforik asit ve kostik yardımıyla parçalanmaları sonucunda yağda çözünmeyen suda çözünen yapıya dönüşürler. Bu türler yağlardan uzaklaştırılmadıkları taktirde rafinasyonda kayıplar olmaktadır. . Bu işlem, yağa göre %1.8-2.2 su ilavesiyle (fosforik asit çözeltisi ihtiva eden) 60-65 ^{o}C'de karıştırılarak yapılmaktadır. İşlem sonunda çöken sulu tabaka separatörler yardımıyla santrifüj yapılarak yağdan ayrılır (Başoğlu 2006, Arslan 2009).

Degumming işlemi sonunda yan ürün olarak ortaya çıkan sulu gam lesitin üretiminde ve soya yemine ilave edilerek değerlendirilmektedir (Kara 2008). Bu aşamada gumlar iyi bir şekilde uzaklaştırılmazlar ise bu maddelerin emüsiyona neden olmalarından nötralizasyon kademesinde yağ kaybının artmasına, ağartmada ağartma toprağının gözeneklerinin tıkanmasına bununla beraber fazla miktarda kullanımına, deoderizasyon kademesinde yüksek sıcaklıklarda bozunma ürünleri olan kalıcı renklerin oluşmasına neden olurlar. Bu proses sonucunda yan ürün olarak ticari lesitin oluşur. Ham yağa tahmin edilen gum miktarına bağlı olarak yaklaşık %3`ü kadar buhar ve su verilerek yağ karıştırılır. Elde edilen karışım seperatörlerde ayrılır.

Degumming kademesinde; fosfatidler, proteinler, nişasta ve metaller uzaklaştırılırken, fosforik asit esteri, serbest yağ asidi ve fosfatitik asit oluşmaktadır (Kara 2008).

1.3.1.2. Nötralizasyon

Rafinasyonun ikinci kademesi olan nötralizasyon işleminde; ham yağ içinde bulunan serbest yağ asitleri, NaOH gibi alkalilerle nötralizasyonu sonucu

sabunlaştırılarak yağdan uzaklaştırılırlar. Oluşan sabunlar su ile yıkanarak yağdan uzaklaştırılırlar. Yıkama sonucu oluşan bu yan ürüne soapstok ismi verilmektedir.

Yağda çözünen serbest yağ asitleri ve kostik yardımıyla sabunlaştırılmaları sonucunda yağda çözünmeyen suda çözünen yapıya dönüşürler. Bu türler yağlardan uzaklaştırılmadıkları takdirde rafinasyonun ağartma ve deoderizasyon kademesinde kayıplara neden olmaktadır. Bu işlem, serbest yağ asidi miktarına bağlı olarak yağa, 18 °Be`lik NaOH içeren su ilavesiyle 30 ^{o}C'de mikserler kullanılarak yapılmaktadır. İşlem sonunda çöken sulu tabaka separatörler yardımıyla santrifüj yapılarak yağdan ayrılır (Başoğlu 2006, Arslan 2009).

Nötralizasyon kademesinde kayıpların en aza indirilmesi ve serbest yağ asitlerinin tamamının uzaklaştırlıması için; ham yağ homojen özellikte olmalı ve sürekli karıştırılmalı, ham yağ ve kostik soda akışı sürekli olmalı, kostik soda ham yağ içinde homojen karışmalı, yüksek hızlı karıştırıcıdan cıkan ve separatörlere girecek olan yağ laminar akışlı olmalı, yağ separatörlere girmeden önce en az 60°C`ye ısıtılmalı ve karsı basınç oluşmalıdır (Kara 2008).

Nötralizasyon işlemi sonunda yan ürün olarak orataya çıkan sulu soapstok asitle muamele edilerek yağ asitlerine dönüştürülerek yem ve sabun sanayinde değerlendirilmektedir. Bu aşamada serbest yağ asitleri iyi bir şekilde uzaklaştırılmazlar ise serbest yağ asitlerinin yağın asitliğini arttırdığı bu nedenlede ağartma kademesinde yağ kaybının artmasına, ağartmada ağartma toprağının adsorban özelliklerinin azalmasına bununla beraber fazla miktarda kullanımına, deoderizasyon kademesinde yüksek sıcaklıklarda bozunma ürünleri olan kalıcı renklerin oluşmasına neden olurlar.

Nötralizasyon kademesinde; serbest yağ asitleri, fosforik asit, fosfolipid, renk pigmentleri, fenolik bileşikler ve metaller uzaklaştırılırken, sabun ve digliserit oluşmaktadır (Kara 2008).

1.3.1.3. Ağartma

Yağlardaki renk pigmentlerinin, iz metallerin, sabunların, fosfolipitlerin, gumların ve hidroperoksitlerin özel olarak seçilen ve spesifik etkileri aktifleştirlebilen kil veya karbon üzerine adsorplanması yoluyla seçici olarak uzaklaştırılması "ağartma" olarak tanımlanabilir. Yağda çözünmüş veya süspansiyon

halinde bulunan düşük konsantrasyonlu bileşikler adsorbanın katı partiküllerinin yüzeyine adsorplanırlar. Adsorbanın yüzeyine tutulan, yağın kararlılığını azaltan, oksidasyon hızını arttıran bu yağ harici maddeler yağdan süzülerek uzaklaştırılırlar. Bu nedenle çoğu işletmeci ağartma işlemini yağların rafinasyonundaki en önemli basamak olarak nitelemektedir.

Ağartma işleminde aktifleştirilmemiş kil ve aktif karbon gibi değişik materyaller kullanılır. Fakat şimdiye kadar kullanılan en yaygın madde montmorillonit mineralinden elde edilen asitle aktifleştirilmiş ağartma toprağıdır. Aktive edilmiş ağartma toprağının asidik ve katalitik özelliklerini ayırmak zordur. Buna rağmen bazı reaksiyonlar açıkça ağartma toprağının katalitik özelliğine atfedilebilir. Bunların içinde en önemlisi hydroperoksitlerin dekompozisyonudur. Peroksit değeri (PV) ağartma toprağının artan katalitik aktivitesiyle düşer. Bu reaksiyonların bir sonucu olarak birtakım yan ürünler oluşur örneğin aldehitler, ketonlar ve konjuge polienler gibi. Polyenoateler ağartma toprağının katalitik özelliğine bağlı olarak dimerlere veya polymerlere dönüşebilir. Daha başka oksidasyonun olmadığından emin olmak için ağartma vakum altında yapılmalıdır.

Ağartma toprağı dozajı; ağartma toprağının kullanım miktarı kullanılan adsorbanın cinsine, rafine edilen yağın cinsine ve bu yağ içerisinde bulunan renk pigmentleri ve safsızlıkların miktarına bağlıdır. Doğru ağartma toprağı seçimi ve doğru dozlama sonucunda safsızlıkların maksimum miktarda alınıp alınmadığı peroksit değerinin sıfır olması, klorofil değerinin 1,0 ppm`den az olması, fosfor değerinin 1,0 ppm`den az olması, sabunun hiç olmaması ve renk değerinin yağın cinsine göre istenilen değerde olması ile ölçülür.

Ağartma işlemi, yağın renk miktarına bağlı olarak yağa göre, % 1-5 oranında ağartma toprağı ilavesiyle 80-120°C sıcaklıkta ve 15-30 dakika, vakum altında karıştırılarak yapılmaktadır (Kara 2008).

Ağartma kademesinde kayıpların en aza indirilmesi ve istenmeyen yağ harici maddelerin tamamının uzaklaştırılması için; sabun miktarı 50 ppm`i geçmemeli, nötr yağ ve ağartma toprağı hızları iyi ayarlanmalı, vakumda bekleme süresi minimum 20 dakika olmalı, filitre ön kaplama homojenliği, ağartma toprağı gözenekliliği, filitre kek gözenekliliği kullanım kapasiteleri maksimum olmalı, filtrekek kalınlığı iyi ayarlanmış olmalıdır (Kara 2008).

Bu aşamada hidroperoksitler, metaller ve renk pigmentleri iyi bir şekilde uzaklaştırılmazlar ise deoderizasyon kademesinde yüksek sıcaklıklarda bozunma ürünleri olan kalıcı renklerin oluşmasına, yağın kalitesinin azalmasına neden olurlar.

Ağartma kademesinde; renkli maddeler, fosfatidler, hidroperoksitler, metaller, sabun, fosforik asitler uzaklaştırılırken, trans yağ asidi, keton ve aldehitler, konjuge dimer ve polimerler, polar maddeler, FFA oluşmaktadır (Kara 2008).

1.3.1.4. Vinterizasyon

Yağa bulanıklık veren mumların ve stearinlerin, yağların soğutulması sonucu kristallendirilmesi vinterizasyon olarak tanımlanabilir. Yağın raf kararlılığını azaltan ve bulanıklılığını arttıran bu yağ harici maddeler soğukta yağdan süzülerek uzaklaştırılırlar.

Vinterizasyon işleminde kristallenmeyi başlatmak (çekirdek oluşturmak) ve süzmeyi kolaylaştırmak için vinterize toprağı kullanılmaktadır. Vinterize toprağı dozajı; rafine edilen yağın cinsine ve bu yağ içerisinde bulunan waksların miktarına bağlıdır. Doğru dozlama sonucunda safsızlıkların maksimum miktarda alınıp alınmadığı bulanıklık ve waks değerinin minumum olması ile ölçülür.

Vinteriasyon işlemi, yağın waks miktarına bağlı olarak yağa göre, % 1-5 oranında vinterizasyon toprağı ilavesiyle 4-8°C sıcaklıkta ve 15-30 dakika karıştırılarak yapılmaktadır (Kara 2008). Vinterizasyon kademesinde kayıpların en aza indirilmesi ve istenmeyen yağ harici maddelerin tamamının uzaklaştırlıması için; nötralizasyon işleminin istenen seviyede yapılması, filitre ön kaplama homojenliği, filitre kek gözenekliliği kullanım kapasiteleri maksimum olmalı, filtre kek kalınlığı iyi ayarlanmış olmalıdır (Kara 2008).

Bu aşamada wakslar iyi bir şekilde uzaklaştırılmazlar ise deoderizasyon kademesinde yüksek sıcaklıklarda bozunma ürünlerinin oluşmasına, yağın kalitesinin azalmasına neden olurlar.

Vinterizasyon kademesinde; stearinler, wakslar ve parafin uzaklaştırılırken, katı kristalize ürünler oluşmaktadır (Kara 2008).

1.3.1.5. Deoderizasyon

Ham yağda bulunan veya rafinasyon işlemi sırasında oluşabilen kötü tat ve koku veren uçucu bileşiklerin su buharı, fraksiyonlu, vakumlu ve adi destilasyon işlemlerinin hepsini barındıran fonksiyonel destilasyon işlemine deoderizasyon denmektedir.

Deoderizasyon işlemi, serbest yağ asitlerini, oksidasyon ürünlerini, gliserolleri, herbisit ve pesticide artıklarını ve diğer ucucu bileşikleri uzaklaştırmak/azaltmak amacıyla yapılmaktadır (Başoğlu 2006).

Deoderizasyon işleminde kötü tat ve koku veren bileşiklerin buharlaşma sıcaklıkları çok farklı olduğundan yağa buharlı destilasyonun sağlanması için kuru buhar verilerek vakum altında destilasyon yapılır. Buna rağmen deoderizasyon kademesinde; yağın raf ömrünü ve kalitesini etkileyen yağda bulunması istenen bazı aktif türlerde uzaklaştırılmaktadır. Bunların içinde en önemlileri tokoferoller ve sterollerdir. Bu kayıpların bir sonucu olarak distilatlarda bu ürünler yer almaktadır.

Deoderizasyon kademesinde kayıpların en aza indirilmesi ve istenmeyen yağ harici maddelerin tamamının uzaklaştırlıması için; proses parametleri, rafine edilen yağın cinsine ve bu yağ içerisinde bulunan hidroperoksitlere, aldehitlere, ketonlara ve safsızlıkların miktarına bağlıdır. Doğru proses parametresi seçimi sonucunda safsızlıkların maksimum miktarda alınıp alınmadığı peroksit değeri, serbest yağ asidi miktarı, klorofil değeri, sabunun hiç olmaması ve renk değerinin yağın cinsine göre istenilen değerde olması ile ölçülür.

Deoderizasyon işlemi, yağın cinsine bağlı olarak yağa göre, 220-300^{o}C arasındaki sıcaklıklarda, vakum altında yapılmaktadır (Kara 2008). Bu aşamada serbest yağ asitleri, hidroperoksitler ve renk pigmentleri iyi bir şekilde uzaklaştırılmazlar ise yağın raf ömrünün azalmasına neden olurlar.

Deoderizasyon kademesinde; serbest yağ asitleri, karatenoidler, aldehit ve ketonlar, hidrokarbonlar, uzaklaştırılırken, trans yağ asitleri, konjuge dimer ve polimerler, hidrokarbonlar ve sabit renkli maddeleri oluşmaktadır (Kara 2008).

1.4. Yağ Analizleri

İnsan hayatında birçok önemli fonksiyonu bulunan yağların, insanların kullanımına sunulmadan önce, kendine has doğal özelliklerini koruması ve bazı parametre değerlerine sahip olması gerekmektedir. Bu sebeple; yağlar üretim öncesinde, üretim sırasında ve üretim sonrasında, birçok yöntem, alet ve ekipman kullanılarak çeşitli analizlere tabi tutulmaktadırlar. Şimdiye kadar standart metotlar kullanılarak gerçekleştirilen bu analizler;

- yağın durum ve kalitesini belirlemek,
- yağın işlem basamağının hangi aşamasında olduğuna karar vermek,

- yağın durumuna göre işleme son verilip verilmeyeceğine karar vermek amacıyla yapılmaktadır.

Fiziksel yağ analizleri

- erime noktası tayini
- renk tayini (iyot karşılaştırma yöntemiyle)
- özgül ağırlık tayini (piknometre veya hacim ölçülmesiyle)
- akma, damlama ve katılaşma noktası tayinleri
- yağın düşük sıcaklığa dayanıklılığı
- yağlarda kırılma indeksinin tayini (abbe veya zeiss refraktometresiyle)
- yağların ışık absorpsiyonu (UV spektrofotometresiyle)
- yağlarda viskozite tayini (ostwald, saybolt veya engler viskozimetrisiyle)

Kimyasal yağ analizleri

- serbest yağ asitleri (%FFA) tayini
- peroksit sayısı (PV) tayini
- anisidin sayısı (AV) tayini
- iyot sayısı (IV) tayini
- yağ asit kompozisyonu tayini
- sabunlaşma sayısı tayini
- yağ asit kompozisyonu
- sterol kompozisyonu
- vaks kompozisyonu
- polar ve polimerik madde analizi
- tokoferol ve tokotrienol analizi
- vitamin analizleri
- trigliserit analizi

Yukarıda yer alan kimyasal yağ analizlerinden, bu tez kapsamında yer alan serbest yağ asidi (%FFA), peroksit sayısı (PV) ve iyot sayısı (IV), yağ asit kompozisyonu, sterol kompozisyonu, vaks kompozisyonu, polar ve polimerik madde analizi, tokoferol ve tokotrienol analizi, vitamin analizleri, trigliserit analizi tayinlerinin öneminden kısaca bahsedilmiştir.

- **Serbest yağ asitleri (%FFA)**

Yağın üretimi, depolanması ve piyasaya sunulmasında en sık belirlenen kalite parametrelerinden biridir. %FFA içeriği, trigliserid moleküllü ester bağlarından serbest

bırakılan yağ asitlerinin yani hidroliz büyüklüğünün (parçalanmanın) bir ölçüsüdür. Yüksek %FFA içeriği, yağ kalitesinin düşük olduğunu gösterir.

Serbest yağ asitleri;

yağların doğal yapısında bulunabileceği gibi (yağlı tohum ve meyvelerdeki lipaz enzimi etkisiyle), yağ asitlerinin ekstraksiyonu & rafinasyonu gibi işlemler sırasında (kötü işleme nedeniyle) hidroliz sonucu, pişirme, özellikle kızartma işlemleri sırasında, yağlık tohum & meyvelerin ve rafine yağların depolanması sırasında oluşabilir.

- **Peroksit sayısı (PV)**

Yağlarda bulunan aktif oksijen miktarının ölçüsü olup, 1 kg yağda bulunan peroksit oksijeninin meq cinsinden miktarıdır. Peroksitler, gıdalardaki oksidatif bozulmanın belirtecidirler, bu sebeple yağların üretiminden önce, üretim sırasında ve üretim sonrasında sıklıkla kontrol edilmelidirler.

- **İyot sayısı (IV)**

İyot sayısı yağlarda doymamışlığın ölçüsü olup, 100 g yağın bağladığı iyodun belirlenmesidir. Yağı oluşturan yağ asitlerindeki çift ve üçlü bağlara halojenür bağlanması ve arta kalan iyot monoklorürün KI ile indirgenerek açığa çıkan iyodun sodyum tiyosülfat çözeltisi ile titre edilerek tespit edilmesi ilkesine dayanır. Yağların son ürün olarak kullanılma hazır hale geldiği aşamada yapılması önem arz etmektedir. Özellikle yağda herhangi bir tahşiş olup olmadığını göstermesi açısından iyot sayısı tayini önemli bir analizdir.

- **Yağ asit kompozisyonu tayini**

Yağı oluşturan yağ asitlerinin kromatografik metotlar ile tayini esasına dayanan bir analizdir. Analiz genel olarak yağın hidrolize edilerek metillenmesi sonucu yağ asit metil esterlerinin oluşturularak yağ asitlerinin uçucu hale getirilmesi sonucu yapılmaktadır. Özellikle yağların üretimi sırasında yüksek sıcaklık ve katalizörlü işlemler sırasında yağın yağ asit kompozisyonu çok değişmemekle birlikte uygun olmayan rafinasyon işlemlerinde trans yağ asitlerinin oluşumu sıklıkla görülmektedir. Bu nedenle yağın rafinasyonunun uygun bir şekilde yapılıp yapılmadığını göstermesi açısında yağ asit kompozisyonu analizi çok önemlidir.

- **Sterol kompozisyonu**

Yağı oluşturan minör bileşiklerden biri olan steroller, yağın hidroliz edilerek suyla uzaklaştırılması sonucu geride kalan sabunlaşmayan maddeler arasından kromatografik metotlarla ayrılması sonucu tayin edilirler Analiz genel olarak

sabunlaşmayan maddelerin türevlendirilerek uçucu hale getirlimesi sonucu yapılmaktadır. Yağın üretimi, depolanması ve ham maddenin kaynağının belirlenmesinde kullanılan kalite parametrelerinden biridir. Özellikle yağların üretimi sırasında yüksek sıcaklık ve katalizörlü işlemler sırasında yağdan bu maddelerin uzaklaştırlıp uzaklaştırılmadığı teşhisinde kullanıldığından analizi çok önemlidir.

- **Vaks kompozisyonu**

Yağı oluşturan minör bileşiklerden biri olan vakslar, yağdan kromatografik metotlar kullanılarak ayrılması sonucu tayin edilirler Analiz genel olarak vaksların herhangi bir türevlendirilme işlemine gerek kalmadan gaz kromatografisinde yapılmaktadır. Yağın üretimi, depolanması ve ham maddenin kaynağının belirlenmesinde kullanılan kalite parametrelerinden biridir.

- **Polar ve polimerik madde analizi**

Yağı oluşturan bileşikler arasında olmayan ancak yağın rafinasyonu ve kullanımı sırasında oluşan bu bileşikler kromatografik metotlar kullanılarak tayin edilirler. Analiz genel olarak herhangi bir türevlendirilme işlemine gerek kalmadan sıvı kromatografisinde yapılmaktadır. Yağın üretimi ve kullanılması sonrasında oluşan polimerik ve polar maddelerin miktarı ve cinslerinin tespiti açısından önemli bir parametredir.

- **Tokoferol ve tokotrienol analizi**

Yağı oluşturan minör bileşiklerden biri olan tokoferoller ve tokotrienoller, yağ üzerinde herhangi bir işleme uygulamadan kromatografik metotlar vasıtasıyla tayin edilirler. Yağın üretimi, depolanması ve ham maddenin kaynağının belirlenmesinde kullanılan kalite parametrelerinden biridir. Özellikle yağların üretimi sırasında yüksek sıcaklık ve katalizörlü işlemler sırasında yağdan bu maddelerin uzaklaştırlıp uzaklaştırılmadığı teşhisinde kullanıldığından analizi çok önemlidir. Yağın oksidasyona karşı direnci ve yapısında bulunan antioksidanların tespiti açısından tokoferol ve tokotrienol tespiti ayrı bir önem arz etmektedir.

- **Vitamin analizleri**

Yağda çözünen vitaminlerin tespiti genel olarak kromatografik metotlar kullanılarak yapılmaktadır. Metodun uygulanması ve doğrulanması açısından vitamin analizlerinin gerçekleştirilmesinin oldukça fazla zorlukları vardır. K ve D vitaminlerinin tespiti için yağ öncelikle hidroliz edilerek sabunlaşmayan maddelerden uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu uzaklaştırmadan sonra numune N_2 ortamda muhafaza edilmelidir.

Aksi taktirde yağda bulunan vitaminler okside olarak miktarlarında düşüşler gözlenmektedir. İnsan vücudunun ihtiyacı olan bu vitaminlerin analizi yağ analizleri açısından oldukça fazla öneme sahiptirler. Özellikle yağ rafinasyonu sırasında bu vitaminlerin ne kadar uzaklaştırıldığı tespiti, yağ kalite parametreleri arasında yer alan en önemli verilerden biridir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Nar Çekirdeği Yağı Üzerine Yapılan Çalışmalar

Nar (Punica granatum L.), Punicacea ailesine ait *(Harde ve ark., 1970)* en eski yenilebilir meyvelerden biridir. Akdeniz ülkeleri, İran, Hindistan ve ABD (California), Çin, Japonya ve Rusya gibi bir çok ülkede yaygın olarak yetiştirilir olmuştur. Iran`da hem kıyı hem de dağlık bölgelerde nar yetiştirilebildiği vurgulanmıştır *(Fadavi ve ark., 2006).* Türkiye 2004 yılında üretilen 60.000 ton ile üçüncü en büyük üreticisidir. Nar genellikle taze olarak tüketilir, ancak, gıda sektöründe meyve suyu, şarap, likör, pekmez (yoğunlaştırılmış meyve suyu) ve konserve gibi gıdaları üretmek için de kullanımı mümkün olabilmektedir *(Kıralan ve ark., 2009).*

Abbasi ve ark. (2008), İran`nın Shahreza bölgesinde yetişen malas çeşidi narların çekirdeklerinden organik çözücüler ve süperkritik CO_2 kullanarak esensasiyel yağları ektrakte etmişler ve farklı organik çözücüler ile yapılan ekstraksiyonda farklılık oluşmazken aynı çözücü ile farklı metotlar kullanılarak yapılan ekstraksiyonlarda önemli farklılıklar tespit etmişlerdir. Ayrıca farklı CO_2 süperkritik akışkan ekstraksiyon şartlarında (% 1-3) organik çözücüler ile yapılan ekstraksiyonlardan (% 12,7-18,7) daha az verimle yağ elde etmişlerdir. Aynı çalışma grubu, organik çözücüler ile elde edilen yağların yağ asit kompozisyonu analizlerinde fark göremezken (pünisik asit cinsinden % 81,0-82,9), CO_2 süperkritik akışkan ekstraksiyonu ile elde edilen yağlarda farklılıklar gözlemlemişlerdir (pünisik asit cinsinden % 69,8-79,0).

Kıralan ve ark. (2009), Türkiye`de yetişen ticari 15 önemli nar kültürlerlerinin yağ ve konjuge linolenik asit içeriği üzerine yaptıkları çalışmada, % 13,95-24,13 aralığında yağ içeriği, punisik asit asit içeriği bakımından % 70,42-76,17, gadeloik asit bakımından % 0,42-0,75 aralığında yağ asit profilini tespit etmişlerdir. Aynı çalışma grubu, yaptıkları doymamış yağ asidi analizlerinde yağ kalitesi ve sağlık açısından önemli olan punisik asitin önemli miktarda olduğunu göstermişlerdir.

Vroegrijk ve ark. (2011), pünisik asit bakımından zengin olan nar çekirdeği yağının farelerde diyete bağlı obezite ve insülin direnci önlenmesi üzerine yaptıkları çalışmada, % 1 nar çekirdeği yağı (PSO) ile yüksek yağlı diyet ya da yüksek yağlı diyet ile farelerin obezite ve insülin direncini uyarmak için 12 hafta boyunca beslenmişler ve 12 hafta sonunda vücut ağırlığı ve kompozisyonu, enerji tüketimi ve insülin duyarlılığı değerlendirmişlerdir. Nar çakirdeği yağı ile beslenmiş farelerde daha düşük vücut ağırlığı ve enerji harcamasını etkilemediğini, vücut yağ kitlesinin düştüğünü, karaciğer

insülin duyarlılığını etkilemediğini, ancak açıkça periferik insülin duyarlılığını geliştirdiğini göstermişlerdir. Aynı çalışma grubu, nar çekirdeği yağının farelerin yüksek yağlı diyete bağlı obezite ve insülin direncini düzelttiğini ve gıda alımı ve enerji harcaması üzerine etkili olmadığı tespit etmişlerdir.

Dhar ve ark. (1999), konjuge octadecatrienoic yağ asidlerinin farelerde in vitro enzimatik olmayan lipit peroksidasyonu ve kan lipitlerine diyet etkisi üzerine yaptıkları çalışmada, fareleri 4 hafta boyunca alfa-eleostearik asit yönünden zengin karela tohumu (Momordica charantia) ile besleyerek konjuge octadecatrienoic yağ asidinin antioksidan aktivitesi, plazmadaki kolesterol, yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL), lipid peroksidasyonu, eryhrocyte membran ve karaciğer lipid düzeyi üzerine etkisini incelenmişlertir. Yapılan çalışmalarda konjuge yağ asidi ile beslenen 3 farklı grup (% 0,2-5-10) ve konjuge yağ asidiyle beslenmeyen kontrol grubundan oluşan farklı çalışma grupları oluşturulmuş ve bu gruplarda plazmadaki toplam kolesterol, HDL-kolesterol ve non-HDL-kolesterol konsantrasyonlarını benzer bulunmuştur. Ancak lipit peroksidasyonunun, % 2 ve 10 konjuge yağ asidi ile beslenen farelerin % 0,5 konjuge yağ asidi ile beslenen farelerden daha düşük olduğu gözlenmiştir. Lipoprotein oksidasyonu duyarlılık testinde ayçiçek yağı besin grubu ve % 0.5 konjuge yağ asidi ile beslenen farelerin 2, ve% 10 konjuge yağ asidi ile beslenen farelerin besin grupları karşılaştırıldığında % 2 ve 10`a göre daha az duyarlılık gösterdiği gözlenmiştir. Enzimatik olmayan karaciğer dokusu lipit peroksidasyonu % 0.5 9c,11t,13t-18:3 ile yetiştirilen farelerin grubunda anlamlı olarak daha düşükken 2 ve 10 % 9c,11t,13t-18:3 ile beslenen grup kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli bir fark görülmemiştir.

Arao ve ark. (2004), hiperlipidemik obez OLETF farelerde lipit metabolizması üzerine konjuge yağ asidi (pünisik asit) yönünden zengin nar çekirdeği yağının diyet etkisi konulu araştırmalarında, 2 haftalık beslenme periyodunda OLETF farelerin progenitörleri olan LETO `lar ile karşılaştırıldığında obezite ve hiperlipidemya saptamışlardır. Aynı çalışma grubu, % 9 aspir ve % 1 nar çekirdeği yağı ile beslenmiş OLETF fareler % 10 aspir yağı ile beslenmiş OLETF fareler ile karşılaştırıldığında karın beyaz yağ dokusu ağırlıkları ve serum lipit düzeylerinin etkilenmediğini görmüşlerdir. Ancak, nar çekirdeği yağı ile beslenmiş OLETF sıçanlarda biriken hepatik triaçilgliserol belirgin bir şekilde azalmıştır. Yağ asidi sentezi ve yağ asidi β-oksidasyonu ile ilgili hepatik enzimlerin aktiviteleri değişmemiş, ancak nar çekirdeği yağ ile beslenen farelerdeki MUFA seviyeleri önemli ölçüde azalmıştır.

Yamasaki ve ark. (2006), farelerde bağışıklık fonksiyonu ve lipid metabolizması üzerine nar çekirdeği yağı diyetinin etkisi ile ilgili çalışmalarında, fareleri % 0-0,12-1,2 nar çekirdeği yağı içeren besinlerle 3 ay besleyerek bağışıklık fonksiyonu ve lipid metabolizması üzerine punisik asidin etkilerini değerlendirmişlerdir. % 0.12 veya % 1.2 nar çekirdeği ile beslenen farelerin dalaklarında immünglobulin G ve M daha fazla miktarlarda üretildiği ancak forbol 12-miristat-13 asetat ve kalsiyum iyonofor A23187 ile ya da olmadan uyarılmasına bakılmaksızın immünoglobulin A nın üretilmediği görülmüştür. Nar çekirdeği yağının dalak içinde B hücreleri veya CD4-pozitif ve CD8-pozitif T-hücrelerinin yüzdelerine etki etmediği, interlökin-4, interferon ve tümör nekroz faktörü- üretimi tüm besin grupları arasında benzer olduğu görülmüştür. Serum lipid parametreleri analizleri nar çekirdeği ile beslenen gruplarda serum trigliserit ve fosfolipid düzeylerinde önemli artışlar olduğu ama toplam kolesterolde artışın olmadığı gösterdi. Serum, karaciğer, epididim ve perirenal yağ Pünisik asit düzeyleri diyetteki nar çekirdeği yağı oranı artışı ile yükseldiğini görmüşlerdir. Pünisik asit splenositlerde saptanmazken, % 0.12 veya % 1.2 PSO içeren gıda ile beslenen farelerin serum, karaciğer ve adipoz dokularda 9c, 11 t-konjuge linoleik asit tespit edilebilmiştir.

Syed ve ark. (2007), kanserden kimyasal korunmada nar türevi ürünler isimli çalışmalarında, gelişmiş metastaz kanserler için tedavi seçenekleri yetersiz kalması nedeniyle, kanserin önlenmesi için etkili yaklaşımların geliştirilmesi, kanser yükünü azaltmak için önemli bir hedef haline geldiğini, toksik beslenme özelliği olmayan maddeler ve botanik ürünlerin kullanımı, ilaçla koruma yerine geçtiğini söylemişlerdir. Ayrıca aynı grup, yüzyıllardır potansiyel kemopreventif ve antikanser ajan olarak kabul edilen narın hem in vivo hem de in vitro hayvan modellerinde kanseri önleyici özelliği olduğunun altını çizmişlerdir.

Suzukia ve ark. (2001), fare tümör ve insan monositik lösemi hücreleri üzerinde konjuge trienoic yağ asitlerinin sitotoksik etkisi ile ilgili çalışmalarında, nar, tung, ve katalpadan elde edilen yağ asitlerinin nar ve tung için 5 μM ve katalpa için 10 μM aşan dozlarda insan monositik lösemi hücrelerine sitotoksik etkisinin olduğu, ancak pota kadife çiçeği yağı yağ asitlerinin 163 μM kadar değişen konsantrasyonlarda hiçbir etkisinin olmadığını gözlemlemişler. Nar, tung, ve katalpadan gelen 9,11,13-CLnA izomerlerinin sitotoksik etkilerinin olduğu sanılıyordu. Aynı çalışma grubu tarafından, c9,t11,c13- CLnA, c9,t11,t13- CLnA, ve t9,t11,c13- CLnA izomerlerinin sitotoksidelerinin t8,t10,c12- CLnA izomerinkinden daha güçlü olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle, nar, tung ve katalpadan elde edilen yağ asitlerinin pota kadife çiçeği

yağından daha çok sitotoksitelerinin olması 9,11,13-CLnA ve 8,10,12-CLnA nın farklı aktivitelerinin olacağı türetilebilir. c9,t11,c13-CLnA, c9,t11,t13- CLnA, ve t9,t11,c13-CLnA nın sitotoksik etkilerinde küçük farklılıklar olduğu için 9,11,13- CLnA nin izomerlerinin cis/trans konfigurasyonlarının da sitotoksik etkileri üzerinde çok az etkisi olduğu ileri sürülmektedir. Dört yağ asidinin sitotoksisite mekanizması lipid peroksidasyonu içerebilir, çünkü yağ asitlerinin toksisitesi sulu fazda peroksidasyona yatkınlık testleri ile uyumludur. Bu, bütillendirilmiş hidroksitolüen (BHT) ilavesiyle, yağ asitlerinin sitotoksisitelerinin azalması ile desteklenmiştir

Igarash ve Miyazawa (2000), kültür insan tümör hücreleri (DLD-1, kolorektal; HepG2, hepatoma; A549, akciğer, MCF-7 meme; ve MKN-7, mide) üzerine konjuge trienoic yağ asitlerinin yeni kabul sitotoksik etkileri ile ilgili çalışmalarında, Bütün tümör hücreleri, konjuge yağ asitlerinin 5-100 μM ile 24 saat süreyle inkübe edilmiş ve hücre canlılığı doğrulamak için MTT boya azalması ölçülmüştür. Konjuge linolenik asit ve tung yağı yağ asitleri, DLD-1, HepG2, A549, MCF-7 ve MKN-7 hücreleri üzerindeki en yoğun sitotoksik etkileri sergilerken konjuge linoleik asit (CLA) tümör hücreleri için sitotoksik etki göstermemiştir. Aynı çalışma grubu elde edilen sonuçlar doğrultusunda konjuge trienoic yağ asitlerinin (CLnA) konjuge dienoik yağ asitlerinden (CLA) insan tümör hücrelerine daha sitotoksik olduğunu göstermişlerdir.

Lansky ve ark. (2005), nar ürünlerinin insan prostat kanseri üzerine yapmış oldukları çalışmada, narın yağlı bölmeleri ve anti kanser özellik gösterdiği bilinen ellagic asit (E), kaffeik asit ve (C), luteolin (L) ve punisik asidin (P) Matrigel^{TM} yapay membranlar kullanarak insan PC-3 prostat kanseri hücrelerine in vitro istila potansiyel inhibitörlerini test etmişler ve bütün bileşikler önemli ölçüde işgali önlediğini belirtmişlerdir.

Kohno ve ark. (2004), nar çekirdeği yağının sıçanlarda karsinogenez kimyasal yolla kolon baskılama özelliği üzerine yapmış oldukları çalışmada, AOM indüklenen kolon kanserlerinin gelişiminde nar çakirdeği yağının etkisi araştırılmış ve konjuge linoleik asit (CLA) ile karşılaştırılmıştır. Kolon tümörlerinin teşvik için, 6 haftalık erkek F344 ratlarda 2 hafta boyunca haftada bir kez AOM deri altı enjeksiyon (20 mg / kg vücut ağırlığı) verilmiş ve bir hafta AOM tedavi öncesi de % 0.01,% 0,1 veya% 1 nar çekirdeği yağı veya 32 hafta için% 1 CLA içeren diyet yapılmıştr. AOM maruzuyeti 32 haftada %81 ve 1,88± 1.54 çokluk bir insidans ile kolon adenokarsinomunu üretmiştir. Diyet PGO verilmesi insidansı (AOM + 0.01% PGO, 44%, $P < 0.05$;AOM + 0.1% PGO, 38%, $P < 0.01$; AOM + 1% PGO, 56%) ve çokluğu AOM + 0.01% PGO, 0.56 ±

0.73, $P < 0.01$; AOM + 0.1% PGO, 0.50 ± 0.73, $P < 0.005$; AOM + 1% PGO, 0.88 ± 0.96, $P < 0.05$) kolon adenokarsinomasını önemli ölçüde ihbe etmesine rağmen açık bir doz-yanıt ilişkisi bu doz seviyelerinde gözlenmedi. Aynı çalışma grubu, PGO tarafından kolon tümörlerinin inhibisyonunun kolonik mukoza ve karaciğer lipid fraksiyonunda CLA`nın (c9, t11-18) artan içeriği ile ilişkili olduğunu söylemiştir. Bu sonuçlar, nar çekirdeği yağının AOM-indüklenen kolon kanserini bastırabileceğini düşündürmüştür.

2.2. Kromatografi ve Diğer Yöntemlerle Yapılan Yağ Analizleri

Konjuge linolenik asit (CLnA) üç konjuge çift bağlı octadecatrienoic asitlerin bir grup adıdır. CLN izomerleri arasında küçük pozisyonel ve geometrik farklılıklar ayrım yapmayı ve tanımlamayı zorlaştırmaktadır (*Cao ve ark. 2007)*. Bu yağ asitleri hayvansal yağlarda yoktur ancak bazı çekirdek yağlarında mevcuttur *(Özgül-Yücel 2005, Hopkins ve ark., 1968, Wetherilt ve Pala, 1994)*. Örneğin nar çekirdeğinde % 83 pünisik asit (9c,11t,13c.-18:3) ve katalpa tohumunda (Catalpa bignonoides) % 42.3 katalpic asit (9t,11t,13c-18:3) bulunur (*Yücel 2005, Hopkins ve ark., 1968)*. Son yıllarda reçel alkollü ve alkolsüz içecekler için kullanılmasına rağmen nar esas olarak taze tüketilir. Yağlı tohumların taze tüketimini ve olası endüstriyel kullanım için nar taneleri için yeni uygulamalar aranmalıdır (*Hernandez ve ark. 2000).*

Fadavi ve ark. (2006), İran`nın iki farklı bölgesinde yetişen 25 farklı nar türünün çekirdeklerinde bulunan yağ miktarı ile bu yağları oluşturan yağ asitlerinin içeriğini gaz kromatografisi kullanarak niceliksel ve niteliksel olarak ile tespit etmişlerdir. Yapılan çalışmalar sonunda İran`da yetişen 25 nar çekirdeğinde, kuru madde olarak 66,3-193g kg^{-1} yağ içeriğinin olduğu ve bu miktarın tıbbi kullanımlar ve özel tüketim dışında ekonomik, endüstriyel kullanım için yeterli kabul edilebileceğini vurgulamışlardır. Baskın yağ asidi olarak linolenik asidin (31.8-86.6%) olduğu ve bu yağ asidini linoleik asit (0,7-24,4%), oleik asit (0,4-17,4%), stearik asit (2,8-16,7%) ve palmitik asit (0,3-9,9%) asidin takip ettiğini, bazı çeşitlerde az bir oranda doymuş miristik asit (% 0,1-4,7) ve behenik asidin de (% 0,0-3,9) olduğunu bildirmişler.

Hernandez ve ark. (2000), homojen koşullar altında yetiştirilen üç ticari nar çeşitinin toplam yağ içeriği yağ asidi kompozisyonu belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada, bütün yağlarda sadece beş yağ asiti tespit etmişler ve yağ asidi kompozisyonu bilgilerinin oldukça benzer olduğunu vurgulamışlardır. Yaklaşık % 90 ile en yüksek düzeyde çoklu doymamış yağ asitlerinin olduğu ve bunun % 60-80

arasında pünisik asit olarak adlandırılan 9,11,13 pozisyonundaki çift bağlı C18:3 yağ asidinin olduğu tespit edilmiştir.

Cao ve ark. (2007), üç konjuge linolenik asit izomerinin (α -eleostearik asit, β-eleostearik asit and punisik asit) GC-MS ve NMR ile yeniden karekterizasyonu ile ilgili yaptıkları çalışmalarında, her bir C=C çift bağın konumunu bulmak için, yağ asitleri DMOX ile türevlendirmiş ve GC-MS`de konjuge yağ asitlerinin karakteristik parçalanması göz önünde bulundurarak tanımlama yapmışlardır. m /z 196 (C8), m/z 208 (C9), m /z 222 (C10), m/z 234 (C11), m/z 248 (C12), m /z 260 (C13) daki iyon çiftleri punisik asidin 9, 11, 13 pozisyonunda konjuge üçlü bağlarının olduğu görülmüştür. Bu MS spektrumlarının aynısı punisik asitte olduğu gibi α -eleostearik asit ve β- eleostearik asitinde 9, 11, 13 pozisyonunda konjuge üçlü bağlarının olduğu görülmüştür

Chen ve ark. (2007), metilasyon sırasında konjuge linolenik asitin izomerizasyonu ile ilgili yapmış oldukları çalışmada, konjuge linolenik asidin (CLnA) gaz sıvı kromo-matografi (GLC) veya yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile analiz edileceklerinde metil esterleri haline dönüştürülmesi gerektiğini vurgulamışlar ve farklı koşullar altında metilasyonun CLnA`nın izomerizasyona uğrayacağını bulmuşlardır. Yapılan çalışmada asit katalizörlü veya baz katalizli metilasyon koşullarından kaynaklı izomerizasyonu en aza indirmek için metilasyon koşullarının optimizasyonu yapılmıştır. Metilleme asit katalizli ortamda yapıldığında izomerizasyonun sıcaklık ve zamana bağlı olduğunu açıkça göstermiştir. BF_3/metanol ile yapılan metillemenin H_2SO_4/metanol ile yapılan metillemeden daha büyük izomerizasyona neden olduğu, ayrıca serbest CLnA`ların metillenmesinde izomerizasyonu önlemek için 10 dakika süreyle $40^oC$ de az bir $H_2SO_4$/metanol reaktifinin kullanımının uygun olduğu bulunmuştur. Bunun aksine triaçilgliserol formundaki CLnA`ların 10 dakika süreyle 40^oC de baz katalizli metillemede NaOMe/metanol reraktifinin kullanımının izomerizasyonu en aza indirebileceği de aynı çalışma grubu tarafından vurgulanmıştır.

Sassano ve ark. (2009), nar çekirdeğinin metillemesi ile ilgili yaptıkları bir çalışmada; nar çekirdeği yağını 70°C hem asidik hem de bazik ortamda metillemişler ve nar çekirdeği yağı asidik BF_3 ile metillendiği zaman pünisik asidin 71.8% olan miktarının 64.9% a düşerek diğer cis/trans CLnA izomerlerinin artarak değiştiğini gözlemişlerdir. Toplam CLnA içeriğinin sabit kalarak, eleostearik asit ve Katalpik asit izomerleri içinde Pünisik asidin izomerleşmesi, asidik katalizlemeden dolayı cis bağlarının trans bağlarına dönüşerek ctc bağ yapısının, ctt, ttc ve ttt izomerleri bir

karışımına dönüştüğünü göstermektedir. Ancak bu değişim bazik katalizlemede gözlenmemiştir. Tekrarlanabilirliklere bakıldığında doğru analizin ve tekrarlanabilirliğin baz katalizli metillemede gözlenmiştir. Bu sonuçlardan BF_3 gibi asit katalizli metilleme işleminin izomerizasyona neden olduğu, nar çekirdeği yağı gibi yağların analizi için baz katalizli metillemenin uygun olduğu sonucuna varılmıştır. Bir trans esterifikasyon işlemi içeren sodyum metoksit reaktifi, yüksek kalite veya rafine nar çekirdeği yağı gibi trigliserid yapısında baskın konjuge yağ asidi içeren yağ numuneleri için uygun olduğu görülmüştür.

E vitamini, doğal tokoferol ve tokotrienoller için kolektif bir terimdir. α-tokoferol, genellikle katı ve sıvı yağlar içinde, γ-tokoferolden daha iyi bir aktivite gösterir, ancak daha yüksek konsantrasyonlarda γ-tokoferolün daha etkin bir antioksidan olduğu bulunmuştur. Sıvı ve katı yağlardaki tokoferollerin optimum antioksidan konsantrasyonu üzerine yapılan çalışmaların sonuçları, α-tokoferol için optimal seviye, diğer tokoferollerden genellikle daha düşük olduğunu göstermiştir. Sıvı ve katı yağlardaki tokotrienollerin antioksidan aktiviteleri ile ilgili çok az karşılaştırmalı çalışma vardır. Genellikle belirli sıvı ve katı yağ sistemlerinde γ-tokotrienol α-tokotrienolden daha yüksek antioksidan etkiye sahip olduğu ve tokotrienoller tokoferoller ile karşılaştırıldığında daha iyi antioksidanlar olduğu söylenebileceği ifade edilmiştir. Gıda sistemlerindeki çeşitli tokoferollerin antioksidan aktivitesi üzerine yapılan çalışmalar çeşitlidir ve deneyler genellikle farklı gıdalar üzerinde yoğunlaştığından dolayı doğru değerlendirilemeyebilirler ve antioksidan aktivitelerinin tespiti için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Gıda sistemine bağlı olarak bazı durumlarda tokoferoller, bütil hidroksi toluen (BHT) veya bütil hidroksi anisol (BHA) gibi sentetik antioksidanlardan daha iyidirler. Bununla birlikte, bazı gıda sistemlerinde sentetik antioksidanlar, gıdaların raf ömrünü ve stabilitesini arttırdığından tokoferollerden daha etkilidirler (Seppanen ve ark., 2010).

Schwartz ve ark. (2008), bitkisel ve endüstriyel yağların tokoferol, tokotrienol ve sterol içerikleri ile ilgili çalışmalarında, Finladiya marketinde üretilen 14 bitkisel, 9 endüstriyel yağda bulunan tokoferol, tokotrienol ve sterolleri NP-HPLC ve GC-FID kullanarak tespit etmişlerdir. α-tokoferolün en iyi kaynaklarının buğday tohumu (192 mg/100 g) ve ayçiçeği yağı (59 mg/100 g) olduğunu, γ-tokoferol açısından ise camelina (72 mg/100 g), keten tohumu (52 mg/100 g) ve organik kolza yağları olduğu (51 mg/100 g) tespit edilmiştir. Toplam tokol içeriği 4.2 mg/100 g (hindistan cevizi yağı) ve 268 mg/100 g (buğday tohumu yağı) arasında bulunmuştur. Aynı çalışma grubu, bitkisel

sterol içeriğini kızartma yağında 69 mg/100 g, buğday tohumu yağında 4240 mg/100 g arasında değiştiğini bulmuşlardır. 10 kolza yağının alt numunelerinin ayrı ayrı analizlerindeki toplam tokol ve sterol içeriklerinin varyasyonları incelendiğinde, rafine kolza yağı için% 9.7 tokol ve% 9.9 sterol ve soğuk preslenmiş kolza yağı için sırasıyla tokoller için % 6.3, steroller için % 4.2 bulunmuştur.

Kamal-Eldin ve ark. (2000), Doğal E vitaminin sekiz farklı vitamin yapıcıdan (α -, β-, γ- ve δ-tokoferol ve α -, β-, γ- ve δ-tokotrienol) oluştuğunu ve bu sekiz vitamin yapıcının farklı antioksidan ve biyolojik aktivitelere sahip olduğu gibi, herbirinin ayrılarak kantitatif verilerinin oluşturulması gerektiğini söylemişlerdir. Tokoferollerin HPLC ayırımları hem normal hem de ters faz kolonlarda gerçekleştirilir. Ters-faz kolonların, normal faz kolonlardan daha iyi stabilite ve uzun dayanıklılık özellikleri olduğu bilinmesine rağmen çoğu ters faz kolonlar, tokoferol ve tokotrienollerin β- ve γ-izomerlerini ayırmaları mümkün olmadığı bilinmektedir (*Kamal-Eldin ve ark.. 2000, Andrikopoulos ve ark.. 1991, Kramer ve ark.. 1997)*. Bu nedenle aynı çalışma grubu, vitamin E bileşiklerinin karışımını hazırlayarak (yulaf ekstraktları, palm yağı ve tokoferol standartlarını içeren) normal faz-HPLC ayrımlarını, altı silika, üç amino ve bir diol kolonu kullanarak ayırma özelliklerini incelemişdir. Elde edilen sonuçlardan ayırma faktörü (α), kapasite faktörü (k), teorik plaka sayısı (N), ayırma gücünü (R) hesaplamışlar ve en iyi ayırmanın; üç silika kolon ve iki amino kolon için, mobil faz olarak 4 veya 5 % dioksan içeren hekzan ile ve diol kolonda % 4 tert.-butil metil eter içeren hekzanda olduğu tespit edilmiştir.

Herslöf ve ark. (1979), ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) kolonu üzerinde iki farklı çözücü sistemi kullanarak trigliserit ayırmalarını incelemişler ve metilen grupları yardımıyla model bileşiklerin tamamen ayrılmasını başarmışlardır. Aynı grup tarafından, palmitik ve oleik asit içeren trigliseritlerin farklı tiplerinin kısmi ya da tam ayırılması gözlenmiş ve doğal yağlar (hurma çekirdeği yağı, hindistan cevizi yağı) üzerinde de teyit edilmiştir.

Plattner ve ark. (1977), ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografi kullanarak trigliseritlerin ayrılması üzerine yapmış oldukları çalışmada, asetonitril aseton çözücü karışımı kullarak C-18 μ-Bondapak kolunu üzerinde, zincir uzunluğu ve doymamışlık derecesine göre trigliseritlerin hızlı ayrılmasını incelemişler. Aynı grup; doymamış trigliseritler için karbon sayısı ve çıkış zamanı arasında doğrusal bir ilişki olduğunu söylemiştir. HPLC verileri ile gaz sıvı kromatografisi (GLC) tarafından

belirlenen, yağ asidi kompozisyonunun korelasyonu, trigliserit bileşimi hakkında çok fazla ek fikir sahibi olmamızı sağladığı vurgulanmıştır.

Fitosteroller, bitkisel yağlarda, tahıl tohumlarında, meyve ve sebze gibi bitkilerde türüne göre değişen konsantrasyonlarda bulunan minör bileşenlerdir *(Roche ve ark., 2010, Mouloungui ve ark., 2006).* Akışkanlığı ve geçirgenliği düzenleme gibi temel membran bileşeni olmanın yanısıra, fitosteroller membrana bağlı enzim aktiviteleri ve sinyal iletimi olaylarını da düzenlerler *(Roche ve ark., 2010, Hartmann.,1998)* . Bitki hormon öncüleri olarak fitosteroller, hücre bölünmesi, polarite ve morfonogenezi gibi bitki büyümesi ve gelişimsel süreçlerinde çok önemli rol oynarlar *(Roche ve ark., 2010, Lindsey ve ark.,2003)*. Fitosteroller sadece sitoplazması içinde meydana gelen izopronoid biyosentetik ürünlerdir ve 25 den fazla enzim-kataliz reaksiyonundan oluşurlar *(Roche ve ark., 2010, Benveniste., 2002)*.

Roche ve ark. (2010), tohum oluşumu sırasında ayçiçeği tohumundaki (Helianthus annuus L.) sterol konsantrasyonu ve dağılımı konulu çalışmalarında, kolesterolü düşürücü özelliğe sahip sterollerin, içeriğine sıcaklığın etkisi, embriyo ve gövdedeki birikimi ve dağılımını incelemişlerdir. Fitosterollerin % 72`si embriyoda, % 28`si gövdede bulunmuştur. Fitosterollerin konsantrasyonu sterol kategorisine ve tohum bölümüne göre değişmektedir.

Tsape ve ark. (2010), Akdenizde yaygın olarak yetişen langoustine, istakoz ve karidesin kas ve cephalothorakslarındaki yağ asidi ve sterol profillerinin karşılaştırmalı analizi konulu çalışmalarında, kolesterol major sterolken (kasta 70.90–98.58%, sefalotoraksın da 97.10–98.31%), β-sitosterol de (0.29–7.30% ve 0.23–0.75%) ikincil major sterol olarak bulunmuştur. Ayrıca brassikasterol, stigmasterol, D7-stigmasterol, kampesterol ve kampestanol düşük konsantrasyonlarda bulunmuştur.

Caligiani e ark. (2010), Nar (Punicagranatum L.) çekirdeği yağının sabunlaşmayan fraksiyonunda bulunan potansiyel besinsel maddelerin karakterizasyonu ile ilgili çalışmalarında, nar çekirdeği yağında bulunan tokoferol, alifatik alkol (Policosanol dahil), skualen, fitosteroller ve triterpenlerin kalitatif ve kantitatif tayinlerini GC-MS ile incelemişlerdir. Sabunlaşmayan madde içeriği yüksek verimde (%3.1-4.2) elde edilmiştir ve skualenin (maksimum 800 mg/kg`a kadar) ve policosanolün (118-185 mg/kg) tutarlı düzeyleri fark edilmiştir. Aynı çalışma grubu tarafından, β-sitosterol (8069 mg/kg`a kadar) ve cycloartenolün (5916 - 7766 mg/kg) fitosterol ve triterpen fraksiyonlarında baskın olduğu ve β - ve δ-tokoferoller vitamin E formları olarak en çok miktarda bulunmuştur. Örnekler arasında bazı küçük

değişiklikler fark edilmiştir. Elde edilen sonuçlardan nar çekirdeği yağının kolesterol metabolizması modülasyonunda yer alan besinsel değerli maddeler için ilginç bir gıda kaynağını oluşturabileceği düşünülmektedir.

Ayçiçeği yağı gibi bitkisel yağların kalitesi ve kararlılığı vakslar gibi minör bileşenlerin varlığı tarafından etkilenmektedir. vakslar 36-50 karbon atomuna sahip yağ alkolleri ile yağ asitlerinin esterleridirler. 36-50 karbon atomuna sahip vakslar yağ alkolleri ile yağ asitlerinin esterleridirler. Vakslar soğutuldukları zaman kristalize olma eyliminde olduklarından yağ işleme ve pazarlamaya engel olan bulanaklığa nedenle olurlar. Vakslar rafinasyon sırasında vinterizasyon yada devaksing prosesinde uzaklaştırılırlar *(Carelli ve ark., 2002)*.

Carelli ve ark., (2002), Ayçiçeği yağının vaks kompozisyonu üzerine yaptıkları çalışmada, tüm çekirdek, gövde çekirdeği ve tohum kabuklarından çözücü ekstraksiyonu ile elde edilen ayçiçek yağı analizini gaz kromatografisi ile yapmış ve ticari ham ve rafine yağlar ile karşılaştırmasını yapmışlardır. Ham ayçiçek yağı vakslarının ana bileşenleri, C40-C42 fraksiyonundaki yüksek bir konsantrasyon ile, 36 ve 48 arasında karbon atomu numaralarına sahip esterler olduğu tespit edilmiştir. Özellikle daha yüksek molekül ağırlığına sahip fraksiyonlardan ekstrakte edilen yağlar presleme sonucu elde edilen yağlardan daha yüksek konsantrasyonlarda vaksların olduğunu ve vaks çeriği sulu degumming tarafından önemli ölçüde etkilenmediği görüldü. Ayçiçeği yağı vaks içeriğine gövde bölgesinin katkısı %40 dan daha fazladır. Hekzan yıkama veya kısmi gövde uzaklaştırması, yağ vaks içeriğinin kayda değer ölçüde düşürülebileceği vurgulanmıştır.

Kanya ve ark. (2007), yağ rafinasyondan alınan ayçiçek yağı vaksları çözücü ekstraksiyonu ve soğutulmuş aseton ile çöktürme yöntemleri kullanılarak saflaştırmış ve yağ alkolleri ve yağ asitlerinin esterlerini ince tabaka kromatografisi (TLC) ile ayırmışlardır. Yağ esterleri ve serbest yağ alkolleri gaz kromatografisinde (GC) ayrılarak tepit edilmiş ve GC-MS ile de teyit edilmiştir. Yağ alkollerinin bir ucu ve yağ asitlerinin bir ucunun ester bağı ile oluşturduğu uzun zincirli yağ esterlerinin (C38-C54) C42 nin öncülüğünde C40 ve C44`ün baskın olduğu görülmüştür.

Yağda eriyen vitaminler görme (Vitamin A), kalsiyum emilimi (D vitamini), hücre içinde membranların antioksidan koruma (E vitamini), kan pıhtılaşması ve kemik metabolizmasına katılan proteinlerin bir dizi sentezinde (Vitamin K) *(Damon ve ark., 2005)* insan vücudunun çeşitli işlevlerinde önemli rollere sahiptirler *(Heudi. Ve ark., 2004)*.

Mata-Granados ve ark. (2009), serumda yağda çözünen vitaminler ve vitamin D metabolitlerinin belirlenmesi için tam otomatik metot geliştirme ile ilgili yapmış oldukları çalışmada, serum numuneleri ön işleme tabi tutulduktan sonra katı faz ekstraksiyon (SPA) sisteminde temizleme-önderiştirme yapmışlar ve sonra ters-faz kolonda 1 mL/dk akış hızında 15% metanol–asetonitril hareketli fazında ayırma işlemi yapmışlardır. Elde edilen sonuçlara göre dedeksiyon limiti; 0.0015 ve 0.26 μg/ml, tekrarlanabilirlik; %0.83 ve 3.6, laboratuar tekrarlanabilirliği %1.8 ila 4.62 aralıklarında bulunmuştur. Serumdaki hedef analitlerin düşük ve yüksek konsantrasyonları için geri kazanımları % 97–100.2 ve %95–99 olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlardan çalışma grubu, on-line bağlantılı SPE-HPLC sistemi klinik ve araştırma laboratuvarlarında yüksek verimlilikli analizler için yararlı, kullanıcıdan bağımsız, güvenilir ve sağlam bir metot olduğunu vurgulanmıştır

Qian ve Sheng. (1998), hayvan yemlerindeki vitamin A, D , E ve pro-vitamin D_2 nin tek basmaklı ekstraksiyonu ve HPLC ile aynı anda analiziyle ilgili yaptıkları çalışmada, geleneksel olarak yağda çözünen vitaminlerin alkali sabunlaştırmanın yaygın olduğunu vurgulamışlar ve bu vitaminlerin tek adımda ekstraksiyonunu yaparak HPLC`de eş zamanlı tayini için analitik yöntem geliştirmeyi amaçlamışlardır. Numune parçacık boyutu, ekstraksiyon çözücüleri, numune çözücüsünün oranı, ekstraksiyon yaklaşımı ve zamanı, N_2 koruması, Sep-Pak kartuşlar ile ön saflaştırma ve dedeksiyon dalga boyunu içeren çeşitli analitik koşullar test edilmiştir. Geliştirilen yöntemin doğruluğu AOAC yöntemi ile karşılaştırılarak kanıtlanmıştır. Geliştirilen yöntemin tekrarlanabilirliği tekrarlanan geri kazanım deneyleri ile kanıtlanmış ve beslenme numunelerindeki dört vitaminin dedeksiyon limiti 10 ng/g olarak tespit edilmiştir.

Caldwell ve ark. (2011), kullanılmış kızartma yağlarındaki toplam polar bileşiklerin hızlı analizi için yüksek performans sıvı kromatografi-boyut eleme kromatografisi konulu çalışmalarında, kullanılmış kızartma yağlarındaki toplam polar maddeler HPLC-SEC ile analiz edilerek AOCS resmi metodu Cd20-91 ile karşılaştırmışlar ve HPLC-SEC ile yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçların AOCS metodu ile yapılan çalışmalardan % 0,71 daha fazla çıktığı görülmüştür. Eğer OX-TAG için ayrı bir analiz gerçekleştirilemezse, bu yöntemin uygulanabilirliği çalışmanın tipine göre sınırlar koyar. % toplam polar madde tayini için HPLC metodunda standart metoda göre % 75 daha az çözücü kullanılır. HPLC-SEC metodu AOCS metoduna çok benzerdir. Bu yüzden polimerize triaçilgliserollerin ayrılmasına ve miktarını

belirlenmesi olanağı sağladığı gibi 1 saatte polimerik TAG ve polar maddelerin analizini gerçekleştirilmiş olmaktadır.

Dobarganes ve ark. (2000), katı ve sıvı yağlardaki silika mini kolon kullanılarak adsorpsiyon kromatografisi ile polar maddelerin ve bu polar maddelerdeki polimerize ve okside triaçilgliserollerin ve diaçilgliserollerin HPLC-SEC yardımıyla tayini için iki standart metodun karşılaştırmasınında yapıldığı bir çalışma yapmışlardır. Aynı çalışma grubu geliştirdikleri metotu önceki metotlar ile karşılaştırıldığında ilk prosedürün, zaman tasarrufu, çözücü ve reaktif kullanımı yönünden daha hassas ikinci prosedürün ise hidroliz, oksidasyon ve termal polimerizasyon ile ilişkili katı ve sıvı yağlar içinde bileşiklerin başlıca gruplar üzerinde ayrıntılı bilgi veren, çok kısa olduğunu vurgulamışlardır. Ayrıca her iki metodun kullanılmış kızartma yağlarının yanı sıra sızma ve rafine yağların analizi içinde kullanımının mümkün olduğu söylenmiştir.

Owen ve ark. (2000), zeytinyağından izole edilen fenolik bileşiklerin antioksidan/antikanser potansiyeli üzerine yapmış oldukları çalışma da, son çalışmalarda sızma zeytinyağında basit fenoller (hidroksitirosol tyrosol), aldehidik secoiridoids, avonoids ve lignanlar (pinoresinol, pinoresinol) dahil olmak üzere fenolik antioksidanlar bakımından zengin olduğunu söylemişlerdir. Bu fenolik maddelerin Salisilik asit, 2-deoksi-guanosin gibi maddeleri korumada reaktif oksijen türlerinin güçlü inhibitörleridir. Şu anda reaktif oksijen türlerinin meme ve kolorektumun kanser gibi yağ ile ilgili neoplazmaların etiyolojisine dair önemli kanıtlar vardır. Reaktif oksijen türleri tarafından başlatılan ve yayılan lipit peroksidasyonuna karşı duyarlı olan omega-6 doymamış yağ asitlerinin yüksek alımı yüksek pro-mutajenik exocyclic DNA hasar ürününün (örneğin, trans-4-hidroksi-2-nonenal gibi α, β-doymamış aldehit) oluşumuna yol açar. Önceki çalışmalar, ülseratif kolit ve Crohn hastalığı gibi enflamatuar predispozan gelen kanser hastaları ve bu suering kolon mukozası normal doku ile karşılaştırıldığında reaktif oksijen türlerinin kayda değer ölçüde daha yüksek miktarlarda üretildiği görülmüştür. Aynı çalışma grubu tarafından, dışkı matrisi tarafından oluşturulan reaktif oksijen türlerinin kantitatif analizi için hassas yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) metotları geliştirilmiştir. Veriler dışkı matriks bol miktarda reaktif oksijen türlerinin oluşumunu destekler olduğunu göstermiştir. Henüz, kolorektal ortamı etkileyebilecek diyetin gerçek bileşenleri için bu kapasite bağlantısını kanıtlayacak bilgilerde eksiklik vardır. Bununla birlikte, yeni geliştirilen yöntem kullandığımızda zeytinyağında bulunan antioksidan fenolik bileşiklerin dışkı matriks tarafından serbest radikal oluşumunu engelleyen güçlü inhibitörler olduğunu

gösterebiliriz. Bu reaktif oksijen türleri ve diyet antioksidan arasındaki karşılıklı ilişkinin çalışmada kolorektal karsinogenezi ve gelecekteki olası mekanizmaları kemopreventif stratejileri ortaya çıkması için büyük umutların olduğunu göstermiştir.

Abbasi ve ark. (2008), nar çekirdeği yağının fenolik madde içeriği üzerinde çeşitli ekstraksiyon koşullarının etkisi ile ilgili yaptıkları çalışmada, nar çekirdeklerinin nar suyu üretiminin bir yan ürünü oldugunu ve tohumlarda belirli ilaç ve nutrasötik bileşenlerin büyük miktarda bulunması nedeniyle bu bileşenleri elde etmek için uygun bir ekstraksiyon metodunun gıda endüstrisi tarafından talep edildiğini belirtmişlerdir. Aynı çalışma grubu, İran`ın Shahreza bölgesinde yetiştirilen Malas çeşidi nar çekirdeği yağının toplam fenolik madde içeriği üzerine farklı ekstraksiyon yöntemlerinin etkisini incelemek amacıyla normal karıştırma, Soxhlet, mikrodalga titreşim ve ultrasonik titreşim ve CO_2 süperkritik sıvı ekstraksiyonu (SFE) yöntemini dahil olmak üzere dört farklı ekstraksiyon yöntemi uygulamışlardır. Farklı organik çözücülerle yapılan ekstraksiyon işlemi sonucunda elde edilen yağlarda bulunan fenolik madde içeriğinde önemli bir farklılık görülmezken SFE ile yapılan ekstraksiyonlarda geniş bir farklılıklar (7,8-72,1 mg/g) gözlenmiştir. SFE ile yapılan ekstraksiyonlarda bulunan toplam fenolik madde içeriği organik çözücüler ile yapılan ekstraksiyonlarla elde edilenlerden daha fazla bulunmuştur.

Mahesar ve ark. (2011), ATR-FTIR spektroskopisi ile kümes hayvanı yemlerindeki lipidlerin yağ asidi oranlarının değerlendirilmesi konulu çalışmalarında, kısmi en küçük kareler regrasyonu kullanarak kümes hayvanı yemi yağlarındaki çoklu doymamış yağ asitlerinin n-6, n-3 ve n-6/n-3 oranının tayini için basit, hızlı ve tekrarlanabilir ATR-FTIR metodu geliştirmişlerdir. GC tarafından elde edilen n-6, n-3 ve n-6/n-3 oranı verileri FTIR kalibrasyonu için standart değerler olarak kullanılmıştır. n-6, n-3 ve n-6/n-3 oranı için en iyi regrasyon değerleri 0,999, 0,994 ve 0,998 ile 1475-650 cm^{-1} spektral bölgesinin birinci türevleri kullanılarak elde edilmiştir. kümes hayvanları yemi lipidlerinde bulunan PUFA ların n-6, n-3 ve n-6/n-3 oranının hızlı ve doğru tayini için FTIR kullanılabileceği görülmüştür.

Christy (2009), 9t12t in termal ısınmayla konjuge linoleik asidin oluşumunun gaz kromatografi ve infrared spektroskopisi vasıtasıyla kanıtlanması konulu çalışmasında, 9t12t yağ asidi içeren yağ numunesinden 50 µL alınmış ve azot ortamı altında 250^{o}C ısıl işleme tabi tutulmuş ve düzenli aralıklarla bu numuneler ATR-FTIR da analize tabi tutulmuştur. Bu işlemler sırasında aynı munuler GC`de de analiz edilmiştir. Analiz sonuçlarından 9t12t yağ asitlerinin termal işlem ile izomerizasyona

uğrayarak 9c12c yağ asitlerinin termal işlem izomerizasyonuna benzer sonuçlar verdiği gözlenmiştir. FTIR sonuçlarının ısıl işlem sırasında CLA asit oluşumu teyit ettiği de vurgulanmıştır.

Souza ve rak. (2004), son zamanlarda, thermoanalytic yöntemler sık sık katı ve sıvı yağların karakterize edilmesinde kullanıldığını ifade ederek antioksidan ilave ederek ve etmeden ayçiçeği yağının termoanalitik ve kinetik parametrelerini termogravimetri/türev termogravimetri ve diferansiyel taramalı kalorimetre kullanılarak değerlendirmişlerdir. Ayçiçek yağlarının termogravimetrik profilleri, aşağı yukarı 200^{o}C ye kadar stabilitede benzer krarkteristik özelliklere sahiptirler. Bu yağların termik dekompozisyonu, sırasıyla, çoklu doymamış, tekli doymamış ve doymuş yağ asitlerinin ayrışma ile ilgili üç aşamadan oluştuğu gözlenmiştir. DSC eğrileri trigliseridin polimerizasyon ve dekompozisyonunu karakterize eden iki olay göstermiştir. DSC ile elde edilen ayçiçeği yağı ısı kapasiteleri, iyi bir korelasyon göstermiş ve yağ asitlerinin bileşimine bağımlı olduğu gözlenmiştir.

Santos ve ark. (2002), ticari yemeklik yağların termogravimetriyle termal parçalanması üzerine termal stabilite ve kinetik incelemesiyle ilgili yaptıkları çalışmada, ticari olarak satılan yağların izotermel olmayan TG/DTG analizlerini gerçekleştirmişler ve termal kararlılığın doğal ve yapay antioksidanlar varlığından etkilenen yağ asitlerinin kompozisyonuna bağlı olduğunu söylemişlerdir. Elde edilen eğrilere göre termal kararlılığın mısır > ayçiçeği > pirinç > soya + zeytin > ayçiçeği+zeytin > kanola > zeytin sırasında olduğu vurgulanmıştır.

2.3.Çalışmanın Amacı

Sunulan bu tez çalışmasında; yüksek konjuge linolenik asit içeriğiyle (~%80) yağlı çekirdek tohumları arasında oldukça önemli bir yere sahip olan, fakat şimdiye kadar yemeklik yağ olarak üretimi yapılmayan ve yağ olarak özellikleri incelenmeyen nar çekirdeği yağının yağ özelliklerini incelemek, bu tür özel yağların analizlerinde kullanılabilecek nitelikte özel metotlar geliştirmek ve nar çekirdeği yağının rafinasyonu sırasında yağda meydana gelen fiziksel ve kimyasal değişikliklerin (yağ asit kompozisyonu, sterol, vaks, tokoferol-tokotrienol, yağda çözünen vitamin ve polar madde miktarı vb.) tespit edilerek ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Kullanılan Kimyasallar ve Kolonlar

Analizlerde kullanılan kimyasal maddeler ve çözücüler; kullanım özelliklerine göre kromatografik veya analitik saflıkta olup, Merck, Fluka, Sigma-Aldrich, Supelco ve LabScan firmalarından temin edilmiştir (**Çizelge 3. 1**). Kromatografik ayırmalarda kullanılan kolonlar ve özellikleri ise **Çizelge 3. 2**`de yer almaktadır.

Çizelge 3. 1 Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler

Fosfor, FFA, POX, IVve Renk Tayinleri	
Etanol	Aseton Civa II Asetat
Fenolftalein	WijsÇözeltisi
NaOH	HCl
HAc	ZnO
Kloroform	H_2SO_4
KI	$Na_2MoO_42H_2O$
Nişasta	$N_2H_6SO_4$
$Na_2S_2O_3$	KH_2PO_4
Yağ Asit Kompozisyonu Tayini	**Sterol Kompozisyonu Tayini**
Hekzan	KOH
KOH	Etanol
NaOH	Dietil Eter
BF_3/Metanolde (%20 lik)	BSTFA (N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide)
Etanol	Susuz Piridin
Metanol	Na_2SO_4
Na_2SO_4	Ultra Saf Su
Ultra Saf Su	
Vaks Analizi	**Polimerik ve Polar Madde Tayini**
Silika Jel (70–230 Mesh)	Silika jel (70–230 mesh)
Hekzan	Petrol Eteri
Sudan I	Dietil eter
Etil Eter	Tetrahidrofuran
Heptan	Na_2SO_4
Na_2SO_4	**Spektrofotometrik Taramalar**
Ultra Saf Su	İzooktan
Vitamin ve Tokoferol – Tokotrienol Tayini	**Trigliserit Analizi**
Hekzan	Aseton
İzopropil Alkol	Asetonitril
Antioksidan Kapasitesi Tayinleri	
Metanol	DPPH
Ultra Saf Su	H_2SO_4
Folin-Ciocalteu	Na_2HPO_4
Na_2CO_3	Amonyum molibdat

Çizelge 3. 2 Kromatografik Ayırmalarda Kullanılan Kolonlar

Yağ Asit Kompozisyonu Tayini (GC-FID ; GC-MS)	**Sterol Kompozisyonu Tayini (GC-FID ; GC-MS)**
HP-88 (100 m, 0.25 mm, 0.25 µm) (88%-Cyanopropyl)-methylarylpolysiloxane	HP-5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm) (5%-Phenyl)-methylpolysiloxane
Vaks Tayini (GC-FID)	**Vitamin ve Tokoferol –Tokotrienol Tayini (HPLC)**
RTX -5 (15 m x 0.18 mm x 0.20 µm) (5%-Phenyl)-methylpolysiloxane	LICHROSPHER 5µm Si 100 250x4.0mm
Polimerik ve Polar Madde Tayini (HPLC)	**Trigliserit Analizi (HPLC)**
Guard HPSEC kolonu (PL-Gel 100 A°) (5 cm x 7,6 mm i.d., 5 µm) HPSEC kolonu (PL-Gel 100 A°) (30 cm x 7,6 mm i.d., 5 µm) HPSEC kolonu (PL-Gel 500 A°) (30 cm x 7,6 mm i.d., 5 µm)	ACE 5 C18 kolon (250 x 4 mm,5 µm)

Yapılan kromatografik ve spektrofotometrik analizlerde kullanılan standartlar Sigma-Aldirich firmasından temin edilmiştir (**Çizelge 3. 3**).

Çizelge 3. 3 Deneylerde Kullanılan Standartlar

Yağ Asit Kompozisyonu Analizi (Yağ Asit Metil Esterleri)	
cis-13,16-Docosadienoic acid methyl ester	Methyl pentadecanoate
cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid methyl ester	Methyl *cis*-10-pentadecenoate
cis-11,14-Eicosadienoic acid methyl ester	Methyl stearate
cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid methyl ester	Methyl tricosanoate
cis-8,11,14-Eicosatrienoic acid methyl ester	Methyl tetracosanoate
cis-11,14,17-Eicosatrienoic acid methyl ester	Methyl tridecanoate
cis-11-Eicosenoic acid methyl ester	Methyl undecanoate
Methyl *cis*-10-heptadecenoate	Methyl *cis*-15-tetracosenoate
Methyl hexanoate	Methyl heneicosanoate
Methyl γ-linolenate	Methyl heptadecanoate
Methyl arachidate	Methyl linoleate
Methyl arachidonate	Methyl linolelaidate
Methyl behenate	Methyl linolenate
Methyl butyrate	Methyl myristate
Methyl decanoate	Methyl myristoleate
Methyl dodecanoate	Methyl oleate
Methyl elaidate	Methyl octanoate
Methyl erucate	Methyl palmitate
Methyl palmitoleate	
Sterol Kompozisyonu Analizi	**Vaks Analizi**
α-kolestanol Di-hidrokolesterol	Lauryl Arachidate
Tokoferol – Tokotrienol Analizi	**Vitamin Analizi**
α-Tokoferol ve Tokotrienol	Vitamin A
β-Tokoferol ve Tokotrienol	Vitamin D
γ-Tokoferol ve Tokotrienol	Vitamin E
δ-Tokoferol ve Tokotrienol	Vitamin K
Antioksidan Kapasitesi Tayini	
Gallik asit	

3.2. Kullanılan Cihazlar

Nar çekirdeği yağı üzerinde gerçekleştirilen yağ asit kompozisyonu, vaks ve sterol tayinleri; GC-FID cihazında, polimerik ve polar madde, tokoferol-tokotrienol, vitamin tayinleri ve trigliserit analizleri; HPLC cihazında, klorofil, β-karoten ve birincil&ikincil oksidasyon ürenleri tayinleri; UV-Vis. spektrofotometrede, fonksiyonel grup analizleri; FTIR cihazında, termogravimetrik analizler; TGA-DSC cihazında ve sterol türlerinin tespiti; GC-MS cihazında gerçekleştirilmiştir. Deneysel çalışmalarda kullanılan cihazlar, marka ve modelleriyle birlikte **Çizelge 3. 4**`de verilmiştir.

Çizelge 3. 4 Deneylerde Kullanılan Cihazlar

Cihaz	**Marka**
HPLC (High Performance Liquid Chromatography) HPLC-UV Vis, Diode Array, Floresans, Kırma İndeksi Dedektör Sistemi	Agilent 1200 Series
GC- FID	Agilent 7890 Series
GC-MS	7890N-5975C
UV-Vis Spektrofotometre	Perkin Elmer LAMBDA 25
FTIR	Perkin Elmer Spectrum100
TGA-DSC	TA Instruments TGA Q5000IR

3.3. Kullanılan Yağlar

Yüksek konjuge linolenik asit (CLnA) içeriğiyle diğer meyve ve çekirdek yağlarından farklı bir özelliğe sahip olan nar çekirdeği yağı temel alınarak gerçekleştirilen bu tez çalışmasında; nar çekirdeği yağının rafinasyon proses kademelerden alınan yağ numuneleri kullanılmıştır. Yağ numuneleri; Helvacızade Gıda İlaç Kimya San. ve Tic. A.Ş., Yemeklik Bitkisel Yağ Rafinasyon Tesisinden temin edilmiştir. Nar çekirdeği yağı için yürütülen rafinasyon prosesinde yer alan kademeler ve şartları **Çizelge 3. 5**`de özetlenmiştir. Ayrıca vaks tayininde; yağ içinde bulunan vaksların tespiti için rafine ayçiçeği ve sızma zeytinyağı standart yağlar olarak kullanılmışlardır.

Çizelge 3. 5. Nar çekirdeği Yağı Rafinasyon Parametreleri

Kademe	Sıcaklık (°C)	Reaktif	Sure
Degumming	75-80	Yağa göre % 0,1 oranında % 60`lık H_3PO_4 çözeltisi	30 min
Nötralizasyon	75-80	Yağa göre %1 oranında %10`luk NaOH çözeltisi	30 min
Ağartma	90	Yağa göre %1 oranında ağartma toprağı ve süzmeyi kolaylaştırıcı madde karışımı (90:10)	15 min
Vinterizasyon	3-5	Yağa göre % 0,1 çekirdek oluşturucu madde	5-6 h
Ikinci Ağartma	90	Yağa göre %5 oranında ağartma toprağı ve süzmeyi kolaylaştırıcı madde karışımı (1:1)	15 min

3.4. Yağ Numuneleri Üzerinde Gerçekleştirilen Analizler

Rafinasyon proses kademelerinden alınan nar çekirdeği yağ numuneleri üzerinde gerçekleştirilen fiziksel ve kimyasal analizler; *standart metotlar*, *literatür çalışmalarında yer alan metotlar* ve *tarafımızdan oluşturulan yeni metotlar* kullanılarak yürütülmüştür. Analizlerin/tayinlerin gerçekleştirilmesi sırasında kullanılan metotlar, yürütülen her bir tayin için ayrıntılı olarak aşağıda yer almaktadır.

3.4.1. Fosfor tayini

Yağ numunelerinin fosfor içeriği, standart AOCS Ca-12-55 metodu kullanılarak, mg fosfor cinsinden belirlenmiştir (AOCS. 1998).

Prosedür: 3,0-3,2 g yağ numunesi bir krozeye tartılmış ve 0.5 gr çinko oksit ilave edilmiş, koyulaşıp yoğunlaşana kadar ısıtıcıda ısıtılıp kademeli olarak sıcaklık arttırılarak kütle kömürleşinceye kadar ısıtma işlemi gerçekleştirilmiştir. Kömürleşen nunume 2 saat 550-600 derecede bekletilmiş ve sonra oda sıcaklığına soğutulmuştur. Soğutulan numune üzerine 5 er mL saf su ve derişik HCl ilave edilerek bir behere alınmış ve 5 dakika kaynatılmıştır. Kaynatılan numune 5 mL saf su ilavesi ile 100 mL lik balon joje içine süzülerek filtre kâğıdı 4 defa 5 mL sıcak saf su ile yıkanmıştır. Oda sıcaklığına kadar soğutulan numune üzerine nötralleşme için %50 lik KOH damlatılmıştır (soluk bir bulanıklık elde edilinceye kadar). Nötralleştirilen numune üzerine, çinko oksit çökeleğinin tekrar çözüldüğü ana kadar derişik HCl damlatılmış ve saf su ile seyreltme işlemi yapılmıştır. Bu çözeltiden 10 mL alınarak 50 mL`lik şişeye konmuş ve üzerine 8 mL hidrazin sülfat ve 2 mL sodyum molibtat zikredilen sıra ile eklenmiştir. Ağzı kapatılan numune 3-4 dakika ters düz ederek karıştırılmış ve 10 dakika kaynayan sıcak su banyosunda bekletilmiştir. Kaynatılan numune, oda

sıcaklığına kadar soğutulmuş ve hacim 100 mL`ya tamamlanarak iyice karıştırılmış ve 650 nm`de absorbansı ölçülmüştür. Aynı işlemler boş numune (blank) için de gerçekleştirilmiştir.

Standart kalibrasyon grafiği için 1 mL`sinde 1 mg fosfor içeren potasyun dihidrojen fosfat çözeltisinden 0-1-2-4-6-8-10 mL alınarak 100 mL lik balon jojelere aktarılmış ve üzerlerine 8 mL hidrazin sülfat ve 2 mL sodyum molibtat zikredilen sıra ile eklenmiştir. Ağzı kapatılan standartlar 3-4 dakika ters düz ederek karıştırılmış ve 10 dakika kaynayan sıcak su banyosunda bekletilmiştir. Kaynatılan standartlar, oda sıcaklığına kadar soğutulmuş ve hacim 100 mL`ya tamamlanarak iyice karıştırılmış ve 650 nm`de absorbansları ölçülmüştür. Elde edilen standart kalibrasyon grafiği yardımıyla numunelerdeki fosfor miktarları ve % leri hesap edilmiştir.

$$\%\mathbf{P} = \frac{\mathbf{10} \times (\mathbf{A} - \mathbf{B})}{\mathbf{W} \times \mathbf{V}}$$

A: Numunedeki fosfor miktarı (mg)

B: Boş numunedeki (Blank) fosfor miktarı (mg)

V: 100 mL`ye seyreltilmiş numuneden alınan sıvının hacmi (10 mL)

W: Numune kütlesi (3-3.2 g)

3.4.2. Serbest yağ asidi (%FFA) tayini

Yağ numunelerinin serbest yağ asidi (%FFA) içeriği, standart AOCS Ca-5a-40 metodu kullanılarak, % oleik asit cinsinden belirlenmiştir (AOCS. 1998).

Prosedür: 10 g numune 0,01 g hassasiyetle tartılmış ve 15 mL etilalkolde çözülerek kuvvetlice çalkalanmıştır. Numune üzerine 2-3 damla fenolftalein indikatörü damlatılarak çözelti 0.01 N NaOH çözeltisi ile pembe renk oluşuncaya kadar titre edilmiştir. Harcanan NaOH sarfiyatı okunurak aşağıdaki formülden yağda bulunan serbest yağ asitlerinin yüzde değerleri hesaplanmıştır.

$$\mathbf{\%FFA} = \frac{\mathbf{VxNxM}}{\mathbf{Gx10}} \qquad \text{(oleik asit cinsinden)}$$

V: Titrasyonda harcanan NaOH miktarı

N: Titrasyonda harcanan NaOH normalitesi (0.01 N)

M:Yağ asitleri Molekül kütlesi (282 g)

G:Numune kütlesi (10 g)

3.4.3. Peroksit sayısı (PV) tayini

Yağ numunelerinin peroksit sayısı (PV); standart AOCS Cd-8b-90 metodu kullanılarak belirlenmiştir (AOCS. 1998). PV yağlarda bulunan aktif oksijen miktarının ölçüsü olup 1 kg yağda bulunan peroksit oksijeninin miliekivalent gram olarak miktarıdır.

Prosedür: 10 g numune 0,001 g duyarlıkla tartılmış ve 10 mL kloroform ve 15 mL asetik asit ilave edilerek kuvvetlice çalkalanmıştır. Ardından, 0,5 mL KI ilave edilmiş ve çözelti karanlıkta 3 dakika beklemeye bırakılmıştır (çözeltinin rengi kahveye dönmüştür). Bekletme işlemi tamamlandıktan sonra, 3 damla % 1 lik nişasta çözeltisi damlatılmış (çözeltinin rengi laciverte dönmüştür) ve 0,002 N ayarlı $Na_2S_2O_3$ çözeltisi ile renk berraklaşıncaya kadar titre edilmiştir. Harcanan $Na_2S_2O_3$ sarfiyatı okunarak, aşağıdaki formülden gerekli hesaplama yapılmıştır.

$$\mathbf{PV} = \frac{\mathbf{N \times V \times 1000}}{\mathbf{G}} \ \mathbf{meg\ O2/kg\ yağ}$$

V: titrasyonda harcanan $Na_2S_2O_3$ miktarı (mL)

N: titrasyonda kullanılan $Na_2S_2O_3$ normalitesi

G: numune kütlesi

3.4.4. Sabun miktarı tayini

Yağ numunelerinin sabun miktarı tayininde standart volf metodu kullanılmış, yağ numunelerindeki çözünmüş sabun miktarı, sodyum oleat olarak veya % NaOH cinsinden hesaplanmıştır.

Prosedür: 5 g numune 0,01 g hassasiyetle tartılmış ve üzerine 25 mL indikatör sabun çözeltisi (nötürleştirilmiş aseton) ilave edilmiştir. Kuvvetlice çalkalanmış ve renk durumu kontrol edilmiştir. Renkte yeşillenme varsa 0,01 N asetonlu HCl ile titre edilmiştir. Renk sarıya dönünceye kadar titrasyon yapılmış ve harcanan HCl sarfiyatı okunmuştur. Aşağıdaki formülden yağda bulunan sabun değeri hesaplanmıştır.

%Na Sabunu cinsinden=V×0.06 (% Sodyum oleat olarak)

ppm Na Sabunu =V×60

V: 0,01 N Asetonlu HCl sarfiyatı.

3.4.5. Renk tayini

Yağ numunelerinin renk değerleri (kırmızı, sarı, mavi), lovibond tintometresi kullanılarak, standart AOCS Cc-13e-92 metoduna göre tespit edilmiştir (AOCS. 1998).

Prosedür: 5 ¼ inch 'lik küvete numune dikkatlice alınarak (küvetin %75 i doldurulur.) küvet tintometredeki kabine yerleştirilerek kapağı kapatılmıştır. Daha sonra Kırmızı, Sarı, Mavi renklere duyarlı filtreler yardımıyla renk değerleri okunmuştur.

3.4.6. Bulanıklık tayini

Yağ numunelerinin bulanıklık değerleri, türbidimetre cihazı kullanılarak nephelometric turbidity unit (NTU) birimi cinsinden belirlenmiştir.

Prosedür: Temiz bir türbidimetre hücresinin ölçü çizgisine kadar yağ numunesi konulmuş, hücrenin yüzeyi temizlenerek yuvasına yerleştirilmiştir. Cihaz göstergesindeki değerler okunarak, yağ numunesideki bulanıklık tespit edilmiştir.

3.4.7. İyot sayısı (IV) tayini

Yağ numunelerinin iyot sayısı (IV), standart TS-894 metodu kullanılarak belirlenmiştir (TS-894,1970). IV, 100 kısım yağın bağlayabileceği iyod miktarını gösterir ve yağın doymamışlığı hakkında bilgi verir.

Prosedür: Numuneden 0,2 g tartılarak 15 mL CCI_4 de çözülmüş, üzerine 10 mL % 5 lik civa II asetat ve 25 mL wijs çözeltisi ilave edilmiştir. Çözeltinin ağzı kapatılarak karanlıkta 3 dakika beklenmiş ve üzerine 1.990 g KI ilave edilmiştir. Daha sonra, çözelti üzerine 100 mL saf su ilave edilmiş 0,1 N $Na_2S_2O_3$ ile renk açık sarı renk oluncaya kadar titre edilmiştir. 1-2 damla nişasta çözeltisi ilave edilerek 0,1 N $Na_2S_2O_3$ ile renk beyaz oluncaya kadar titre edilmiştir. Harcanan $Na_2S_2O_3$ sarfiyatı okunmuştur (V1). Aynı işlem şahit numune içinde yapılarak harcanan $Na_2S_2O_3$ okunmuş ve kaydedilmiştir (V2). Aşağıdaki formülden yağda bulunan iyot sayısı değeri hesaplanmıştır.

$$\textbf{İyot Sayısı (IV)} = \frac{(\mathbf{V_2 - V_1}) \times \mathbf{12,69} \times \mathbf{N}}{\mathbf{G}}$$

V_2: Şahit için harcanan $Na_2S_2O_3$miktarı

V_1: Numune için harcanan $Na_2S_2O_3$ miktarı

N: $Na_2S_2O_3$ çözeltisinin normalitesi (0,1 N)

G: Numune kütlesi (0,2 g)

3.4.8. Yağ asit kompozisyonu analizleri

3.4.8.1. Yağ asit metil esterlerinin elde edilmesi

Gaz kromatografi (GC) tekniği ile yağ asit kompozisyonu analizinde, trigliserit yapısında bulunan ve uçucu özellik taşımayan yağ numuneleri, uçuculuklarını artırmak ve polariteyi düşürmek amacıyla analiz öncesinde türevlendirilerek ester formuna dönüştürülmektedir. Bu sebeple; numuneler üzerinde uygulanan esterleştirme metotları, özellikle konjuge yapıda bulanan yağ asitlerinin yapılarında değişiklik oluşturması sebebiyle oldukça önem taşımaktadır. Yağların ester formuna dönüştürülmesi işlemi, asidik ve/veya bazik ortamda olmak üzere iki şekilde gerçekleştirilebilir. Sunulan bu tez çalışmasında kullanılan nar çekirdeği yağının, oldukça fazla pozisyonel & geometrik konjuge linolenik asit izomeri ihtiva etmesi sebebiyle; analiz öncesinde ön işlem olarak uygulanan esterleştirme basamağı, hem asidik hem de bazik ortam şartlarında gerçekleştirilmiş ve yağ asitleri metil esterlerine (FAME) dönüştürülmüştür. Her iki metottan elde edilen sonuçlar karşılatırılarak, hangi esterleşme metodunun daha uygun olduğu tespit edilmeye çalışılmıştır (Chen, 2007).

Bazik ortamda yürütülen esterleştirme prosedürü:

1 g yağ numunesi 50 mL`lik balona alınarak, üzerine 1 mL 2 N metanollü KOH ilave edilmiş ve geri soğutucu altında 10 dk kaynatılmıştır. Geri soğutucu altında yürütülen esterleştime işlemleri 20-40$^{o}$C`de ayrı ayrı gerçekleştirilmiş, böylece sıcaklığın esterleştirme işlemi üzerine olan etkisi incelenmeye çalışılmıştır. Kaynatılan numune üzerine 7 mL n-hekzan çözeltisi ilave edilmiş ve numune santrifüjde 10 dakika 2500 devirde santrifüjlenerek esterleşen kısmın ayrılması sağlanmıştır. Esterleşen kısım ayrılarak başka bir tüpe alınmış ve içeriğinde bulunan nemin uzaklaştırılması amacıyla 1g Na_2SO_4 ilave edilerek çalkalanmıştır. Çalkalanan numune santrifüjde 1 dakika 2500 devirde santrifüjlenmiş ve yağ esteri içeren sıvı kısım viale alınarak GC-FID cihazına enjeksiyonu yapılmıştır.

Asidik ortamda yürütülen esterleştirme prosedürü:

BF_3 tekniğine göre gerçekleştirilen bu prosedürde, 1 g yağ numunesi 50 mL`lik balona alınarak, üzerine 4 mL 0,5 N metanollü NaOH ilave edilmiş ve geri soğutucu altında 10 dk kaynatılarak sabunlaştırılmıştır. Geri soğutucu altında yürütülen esterleştime işlemleri 20-40-90$^{o}$C`de ayrı ayrı gerçekleştirilmiş, böylece sıcaklığın esterleştirme işlemi üzerine olan etkisi incelenmeye çalışılmıştır. Sabunlaşan kısım

üstüne %20 lik metanollü BF_3 çözeltisnden 5 mL ilave edilirek 2 dk kaynatılmıştır. Esterleşen numune üzerine 3 mL n-hekzan çözeltisi ilave ediliş ve 1 dk daha kaynatılmıştır. Kaynatılan numune oda sıcaklığına kadar soğutulmuş ve ayırma hunisine alınarak organik faz ile sulu faz biribirinden ayrılmıştır. Yağ esteri içeren organik faz kısmı ayrılarak başka bir tüpe alınmış ve içeriğinde bulunan nemin uzaklaştırılması amacıyla üzerine 1 g Na_2SO_4 ilave edilerek çalkalanmıştır. Çalkalanan numune santrifüjde 1 dakika 2500 devirde santrifüjlenmiş ve yağ esteri içeren sıvı kısım viale alınarak GC-FID cihazına enjeksiyonu yapılmıştır.

3.4.8.2. Kromatografik şartların belirlenmesi

Metil esterlerine dönüştürülen nar çekirdeği yağı numunelerinin yağ asit kompozisyonu analizleri, ham nar çekirdeği yağı ile Agilent 7890 Gaz Kromatografi cihazı kullanılarak, HP-88 kolonu üzerinde 1 µL numune enjeksiyonu yapılarak gerçekleştirilmiştir. Kromatografik ayrımlarda, konjuge linolenik asit izomerlerinden pünisik ve Katalpik asit ayrımı özellikle dikkate alınmıştır. Analizler standart metotlar kullanılarak gerçekleştirildiğinde; bahsedilen konjuge linolenik asit izomerleri birbirinden etkin bir şekilde ayrılmamaktadır. Bu sebeple; yağ asit kompozisyonu analizlerinde standart metotların yerine, literatürde yer alan 12 adet metot ve tarafımızdan değiştirilen (modifiye edilen) 20 adet metot olmak üzere 32 adet metot üzerinde kromatografik ayrımlar için en uygun metot tespit edilmeye çalışılmıştır. Yağ asit kompozisyonu analizlerinde kullanılan metotlara ait parametre değerleri **Çizelge 3. 6**`de verilmiştir.

Çizelge 3. 6 Yağ Asit Kompozisyonu Metot Parametreleri

	Metot	Enjektör (°C)	Dedektör (°C)	Akış Hızı (mL/min)	KOLON FIRINI		
					°C/min	°C	min
1.	**Metot1 (Özgül. 2005)**	250	280	0.8		150	5
					10	240	20
2.	**Metot2 (Hernandez. 2000)**	250	250	1.6		140	2
					4	200	40
3.	**Metot3 (Hernandez. 2000)**	250	250	1.6		180	0
					2	240	30
4.	**Metot4 (Hernandez. 2000)**	250	250	1.6		180	5
					2	220	30
5.	**Metot5 (Cao. 2007)**	250	300	0.5		180	0
					2	230	25
6.	**Metot6 (Cao. 2006)**	250	300	154.4*		170	0
					2	240	20
7.	**Metot7 (Hornung 2002)**	240	250	0.315		150	1
					15	200	0
					2	240	30
8.	**Metot8 (Hornung 2002)**	250	300	154.4*		170	0
					2	240	30
9.	**Metot9 (Matthaus 2003)**	250	250	1.0		155	0
					1.5	240	10
10.	**Metot10 (Matthaus 2003)**	250	250	1.0		170	5
					2	240	20
11.	**Metot11 (Fadavi. 2006)**	200	240	0.6		170	4
					3	180	0
					1	240	1
12.	**Metot12 (Kara. 2007)**	250	20	1.0		50	2
					1	240	5
13.	**Metot2-R1**	250	280	1.6		140	2
					3	200	40
14.	**Meto2-R2**	250	280	1.2		140	2
					3	240	10
15.	**Meto2-R3**	250	280	1.2		140	2
					2	240	10
16.	**Meto2-R4**	250	280	1.0		140	2
					2	240	10
17.	**Meto2-R5**	250	280	1.0	4	140	2
						180	5
					1	240	10
18.	**Meto2-R6**	250	280	1.0		140	2
					2	160	5
					1	240	10
19.	**Meto2-R7**	250	280	0.8		140	2

					2	160	5
					1	240	10
						100	2
0.	**Meto2-R8**	250	280	1.0	1	160	5
					0.7	230	10
						100	10
1.	**Meto2-R9**	250	280	1.0	1	140	5
					0.6	230	10
						100	10
2.	**Met2-R10**	250	280	0.8	1	140	5
					0.6	240	10
						180	15
3.	**Met2-R11**	250	280	1.3	5	240	20
						180	15
4.	**Met2-R12**	250	280	1.3	3	240	20
						160	10
5.	**Met2-R13**	250	280	1.3	3	240	20
						150	1
6.	**Meto7-R1**	240	250	0.3	5	200	0
					2	240	30
						155	0
7.	**Meto9-R1**	250	250	1.0	1	240	10
						100	0
8.	**Meto9-R2**	250	250	1.0	1	240	0
						100	0
9.	**Meto9-R3**	250	250	0.8	1	240	0
						155	0
0.	**Meto9-R4**	250	250	0.8	1	240	10
						120	0
1.	**Meto9-R5**	250	250	0.8	1	240	10
						170	5
2.	**Met10-R1**	250	250	1.0	1	240	20

* Sabit basınçta akış (psı)

3.4.9. Sterol analizleri

GC tekniği ile sterol analizi; sabunlaşabilir özellikteki trigiliseritlerin sabunlaştırılarak ortamdan uzaklaştırılması ve sililleme işlemleri Uluslararası Zeytinyağı Konseyinin (COI) Doc. No. 10 resmi metoduna göre yapılmıştır (COI/ T.20/ Doc. no.10/ Rev. 1. 2001).

Prosedür: Sterol analizinde iç standart olarak kullanılan α-kolestanol`den 500 µL alınarak 50 mL`lik balona konulmuş ve çözücüsü uzaklaştırılmıştır. Çözücüsü uzaklaştırılan iç standart üzerine 5 g yağ numunesi ve 50 mL 1 N etanollü KOH ilave

edilmiş, geri soğutucu altında 90°C`de 1saat kaynatılarak sabunlaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Sabunlaşan kısım 100 mL su ve 100 mL dietil eterle ekstrakte edilerek, ayrılan organik faz 50 mL su ile 3 kez yıkanmıştır. Yıkama işlemi sonunda sulu fazdan ayrılan organik fazın çözücüsü uzaklaştırılmıştır. Çözücüsü uzaklaştırılan numune 1 mL kloroformda tekrar çözülmüş ve çözülen kısımdan 200 µL alınarak çözücüsü uzaklaştırılmıştır. Üzerine 250 µL susuz piridin ve 250 µL BSTFA sililleme reaktifi ilave edilmiştir. Karışım ultrasonik banyoda, oda sıcaklığında 5 dk, daha sonra da 60°C`de 20 dk ısıtılarak, sililleme işlemine tabi tutulmuşur. Sililllenen numune viale alınarak GC-FID cihazına enjeksiyonu yapılmıştır.

3.4.9.1. Kromatografik şartların belirlenmesi

Sililllenen nar çekirdeği yağı numunelerinin sterol analizleri, ham nar çekirdeği yağı ile Agilent 7890N-5975C GC-MS ve 7890 GC-FID cihazları kullanılarak, HP-5MS kolonu üzerinde gerçekleştirilmiştir. Kromatografik çalışmalarda, birbirlerinden ayrılmayan β-sitosterol ve Δ5-avenasterol bileşiklerine ait pikler dikkate alınmıştır. Sterol analizlerinde 1 adet standart metot, literatürde yer alan 11 adet metot ve tarafımızdan değiştirilen (modifiye edilen) 3 adet metot olmak üzere 15 adet metot kullanılarak kromatografik ayrımlar için en uygun metot tespit edilmeye çalışılmıştır. Sterol piklerinin yerlerini ve türlerini tespit etmek amacıyla öncelikle GC-MS`de yürütülmüş, elde edilen sonuçlar doğrultusunda da doğru miktar analizleri için, hassasiyeti daha yüksek olan GC-FID kullanılarak çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Sterol analizlerinde kullanılan metotlara ait parametre değerleri **Çizelge 3. 7**`de verilmiştir.

Çizelge 3. 7 Sterol Kompozisyonu Metot Parametreleri

	Metot	İnjektör (°C)	FID (°C)	Akış Hızı	Kolon Fırını			MS Şartları		
					°C/min	°C	min	source temp.	eV	amu
1	**Metot 1 (Tsape. 2010)**	250		0.5 mL/dk		50	1			10-700
					10	300	20			
2	**Metot 2 (Damirchia. 2005)**	260	310	30 mL/dk		60	1			10-700
					40	310	60			
3	**Metot 3 (Cheikh. 2008)**	280	280	1 mL/dk		55	0	230	70	30-650
					20	280	40			
4	**Metot 4 (Chiou. 2009)**	250	290	0.6 mL/dk		100	0			10-700
					20	300	45			
5	**Metot 5 (Parcerisa 1998)**	290	350	75 kPa		210	0	350		10-700
					6	250	11			
					3	310	12			
6	**Metot 6 (Cherif. 2009)**	305	350	1 mL/dk		200	0	230	70	10-700
					3	300	2			
7	**Metot 7 (Ju. 2003)**	250		1 mL/dk		40	0			10-700
					5	310	30			
8	**Metot 8 (Parcerisa 1998)**	290	350	103.4 kPa		230	0			10-700
					2	264	5			
					2	294	0			
9	**Metot 9 (COI D.no.10.2001)**	280	290	30 cm/s		300	60			10-700
10	**Metot 10 (Dussert 2008)**	300	300	33 cm/s		285	60			10-700
11	**Metot 11 (Xu 2011)**	250		1 mL/dk		150	4	230	70	10-700
					4	240	2			
					12	310	30			
12	**Metot 12**	250	250	1 mL/dk		50	0		70	10-700
					15	120	0			
					4	300	20			
13	**Metot 13**	250		0.5 mL/dk		200	0			10-700
					5	300	20			
14	**Metot 14**	250		0.5 mL/dk		100	0			10-700
					5	300	20			
15	**Metot 15 (Caligiani 2010)**	280		1 mL/dk		80	2			40-550
					15	280	20			

3.4.10. Vaks analizleri

GC tekniği ile vaks analizi; vaksların kolon kromatografisi tekniği ile yağdan ayrılması ön işlemini içermektedir. Nar çekirdeği yağı vaks analizlerinde yürütülen kolon kromatografisi ön işlemi, Uluslararası Zeytinyağı Konseyinin (COI) Doc. No. 18 resmi metoduna göre yapılmıştır (COI/ T.20/ Doc. no.18/ Rev. 2. 2003).

Prosedür: Kolon kromatografisi ile vaksların ayrılması işleminde; 15 g silika jel, hekzan içinde bulamaç haline getirilerek, ıslak doldurma tekniğine göre cam kolona doldurulmuş ve sabit faz, kolondan 30 mL hekzan geçirelerek temizlenmiştir. Daha sonra, 500 mg yağ numunesi tartılarak, üzerine vaks analizinde iç standart olarak kullanılan lauryl arachidate`den 500 µL ve indikatör olarak kullanılan etanolde hazırlanmış %1`lik Sudan-I çözeltisinden 100 µL eklenerek, 2 mL hekzanda çözülmüştür. Hazırlanan numune çözeltisi kolona aktarılarak, hekzan/etil eter (99:1) hareketli fazı ile, 10 s`de ~10-15 damla elüe edilecek şekilde, oda sıcaklığında yürütme işlemi gerçekleştirilmiştir. Elusyon işlemi, kırmızı renkli Sudan-I indikatörü kolon sonunda görülünceye kadar devam edilmiş ve bu ana kadar elüe edilen kısım bir beher yardımıyla toplanmıştır. Elüsyon sonunda toplanan vaks çözeltisi, çözücüsü uzaklaştırıldıktan sonra, 2 mL n-heptan ilavesiyle çözülmüş ve çözülen numune viale alınarak GC-FID cihazına enjeksiyonu gerçekleştirilmiştir.

Kolon kromatografisi ön işlemi ile ham nar çekirdeği yağından ayrılan vaksların analizi; Agilent 7890 GC-FID cihazı kullanılarak, RTX-5 kolonu üzerinde 1 µL numune enjeksiyonu yapılarak gerçekleştirilmiştir. Vaks analizlerinde kullanılan metot parametre değerleri **Çizelge 3. 8**`de verilmiştir.

Çizelge 3. 8 Vaks Kompozisyonu Metot Parametreleri

İnjektör			**He Akış Hızı**	**Kolon Fırını**			**FID**	**Kuru Hava**	**H_2**	**Makeup (He)**
°C/min	**°C**	**min**	**(mL/min)**	**°C/min**	**°C**	**min**	**(°C)**	**(mL/min)**	**(mL/min)**	**(mL/min)**
	80	0			80	0				
40	320	0	2.4	28	200	1	350	300	30	30
				2.8	340	25				

3.4.11. Polar ve polimerik madde tayinleri

Yağ numunelerindeki polimerik madde analizleri, THF`de çözülen yağ numunesinin direk HPSEC tekniği ile tayin edilmesini, polar ve apolar madde analizleri ise; standart IUPAC (Dobarganes, 2000) mini kolon metodu uygulanarak elde edilen fraksiyonların, HPSEC tekniği ile tayin edilmesini içermektedir.

3.4.11.1. Polar ve apolar madde tayini (ön ayırmalı prosedür)

Polar ve apolar türlerin fraksiyonlar halinde ayrılması için yürütülen kolon kromatogafisi çalışmalarında; 5 g silika jel, petrol eteri-dietil eter (90:10 v/v) içinde bulamaç haline getirilerek, ıslak doldurma tekniğine göre cam kolona doldurulmuş ve sabit faz, kolondan 5 mL petrol eteri-dietil eter (90:10 v/v) karışımı geçirilerek temizlenmiştir. Daha sonra, 1 g yağ numunesi, 8 mL petrol eteri-dietil eter (90;10 v/v) karışımında çözülmüş ve kolona beslenmiştir. Oda sıcaklığında gerçekleştirilen ayırmalarda; kolondan ilk olarak apolar fraksiyon elüe edilmeye çalışılmış, bu amaçla 60 mL petrol eteri-dietil eter (90:10 v/v) karışımı, 1,5 mL/dk akış hızı ile kolondan geçirilmiştir. Elüsyon işlemine, kolonda 1 mm çözücü kalana kadar devam edilmiş ve elüsyon sonunda toplanan çözeltinin çözücüsü uzaklaştırılarak apolar fraksiyon kısmı elde edilmiştir. Polar fraksiyon kısmının elüsyonu ise; 50 mL dietil eterin, 1,5 mL/dk akış hızı ile kolondan geçirilmesiyle sağlanmıştır. Elüsyon işlemine, kolonda 1 mm çözücü kalana kadar devam edilmiş ve elüsyon sonunda toplanan çözeltinin çözücüsü uzaklaştırılarak polar fraksiyon kısmı elde edilmiştir. Elde edilen polar ve apolar fraksiyonlar, üzerlerine 10 mL THF ilave edilerek çözülmüş ve çözülen numunenin HPLC cihazına enjeksiyonu gerçekleştirilmiştir (Dobarganes, 2000). Polimerik madde analizlerinde olduğu gibi polar ve apolar madde analizleri de, her bir rafinasyon kademesinden alınan yağ numuneleri için yürütülmüş ve analizlerde kullanılan metot parametre değerleri **Çizelge 3. 9**`da verilmiştir.

3.4.11.2. Toplam polimerik madde tayini (direk enjeksiyonlu prosedür)

0,5 g yağ numunesi 10 mL tetrahidrofuran (THF) içinde çözülmüş ve çözülen numune viale alınarak HPLC cihazına enjeksiyonu gerçekleştirilmiştir. Polimerik madde analizleri, her bir rafinasyon kademesinden alınan yağ numuneleri için yürütülmüş ve analizlerde kullanılan metot parametre değerleri **Çizelge 3. 9**`da verilmiştir.

Çizelge 3. 9 Polar ve Polimerik Madde Analizi Metot Parametreleri (Dobarganes, 2000)

Enjeksiyon Miktarı (µL)	Hareketli Faz	Akış Hızı (mL/min)	Kolon Fırını Sıcaklığı (°C)	Dedektör
20	Tetrahidrofuran	1,0	30	Refraktif İndeks (35 °C)

3.4.12. Vitamin ve Tokoferol – Tokotrienol analizi

Nar çekirdeği yağında bulunan A, D, K vitaminlerinin ve α, β, γ ve δ tokoferol ve tokotrienol (tokol) miktarlarının tespiti amacıyla gerçekleştirilen analizler, 10 mL hekzanda çözülen 1 g yağ numunesinin HPLC tekniği ile tayin edilmesini içermektedir.

3.4.12.1. Uygun dedektör ve dalga boylarının tespiti

Nar çekirdeği yağında çözünen A, D, K vitaminlerinin ve α, β, γ ve δ tokoferol ve tokotrienol miktarının tespiti amacıyla yürütülen tayinlerde; her bir vitamin için öncelikle uygun dedektör ve dalga boyu belirleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Çalışmalar diode array (DAD) ve floresans dedektörler kullanılarak, 10 ppm'lik vitamin standartları ile yapılmıştır. Vitamin standartları, diode array ve floresans dedektörlere doğrudan enjekte edilerek spektrum taramasından geçirilmiş ve her bir vitamin tayini için uygun absorbans, uyarma ve emisyon değerleri tespit edilmiştir.

3.4.12.2. Kromatografik şartların belirlenmesi

Vitamin ve tokoferol-tokotrienol analizleri; hekzanda çözülen ham nar çekirdeği yağı kullanılarak, Agilent 1200 HPLC cihazında, silika kolon üzerinde gerçekleştirilmiştir. Kromatografik ayrımlarda, birbirlerine oldukça yakın çıkan β- ve γ-tokoferol ayrımları özellikle dikkate alınmıştır. Analizlerde tarafımızdan geliştirilen 9 farklı metot kullanılmış, vitamin ve tokoferol-tokotrienol türlerinin kromatografik ayrımları için en uygun metot tespit edilmeye çalışılmıştır. Kromatografik tayinlerde standart olarak; ticari A, D, K vitaminleri α, β, γ ve δ tokoferol ve tokotrienol (tokol) standartları kullanılmıştır. Sabit sıcaklıkta (30^{o}C), floresans ve DAD dedektörler kullanılarak gerçekleştirlen vitamin ve tokol tayin metotlarına ait parametre değerleri **Çizelge 3. 10**`da verilmiştir.

Çizelge 3. 10 Vitamin ve Tokol Tayini Metot Parametreleri

	Hekzan (%)	İzo Propil Alkol (%)	Akış hızı (mL/min)
Metot 1	98	2	1
Metot 2	99	1	1
Metot 3	99.3	0.7	1
Metot 4	99.4	0.6	1
Metot 5	99.4	0.6	0.75
Metot 6	99.4	0.6	0.5
Metot 7	98	2	0.3
Metot 8	99.5	0.5	1
Metot 9	99.6	0.4	1

3.4.13. Trigliserit analizi

Nar çekirdeği yağında bulunan trigliserit türlerinin tespiti amacıyla gerçekleştirilen analizler, 10 mL asetonda çözülen 1 g yağ numunesinin HPLC tekniği ile, C18 (250 mm x 4.0 mm x 5µm) kolon üzeride tespit edilmesini içermektedir.

3.4.13.1. Kromatografik şartların belirlenmesi

Trigliserit analizleri; asetonda çözülen rafine nar çekirdeği yağı kullanılarak, Agilent 1200 HPLC cihazında, C18 kolon üzerinde gerçekleştirilmiştir. Kromatografik ayrımlarda, birbirlerine oldukça yakın çıkan 1 ve 2 trigliserit ayrımları özellikle dikkate alınmıştır. Analizlerde standart AOCS Ce 5b-89 metodu (AOCS. 1998) ve bu metodun modifiye edilmiş hali olan 7 farklı metot olmak üzere toplamda 8 metot kullanılmış, trigliserit türlerinin kromatografik ayrımları için en uygun metot tespit edilmeye çalışılmıştır. Sabit sıcaklıkta (30^{o}C) ve DAD (215 nm) dedektör kullanılarak gerçekleştirlen trigliserit metotlarına ait parametre değerleri **Çizelge 3. 11**`de verilmiştir.

Çizelge 3. 11 Trigliserit Analizi Metot Parametrleri

	Aseton (%)	Asetonitril (%)	Akış hızı (mL/min)
Metot 1 (AOCS. 1998)	50	50	1.5
Metot 2	60	40	1.5
Metot 3	40	60	1.5
Metot 4	25	75	1.0
Metot 5	15	85	1.5
Metot 6	15	85	1.0
Metot 7	10	90	1.5
Metot 8	0	100	1.5

3.4.14. Uv-Visible spektrofotometrik analizler

Rafinasyon prosesinin her bir basamağından alınan nar çekirdeği yağı numunelerindeki klorofil, β-karoten, birincil ve ikincil oksidasyon (bozunma) ürünlerinin miktatlarını tespit etmek amacıyla gerçekleştirilen Uv-Visible spektrofotometrik analizleri, Perkin Elmer LAMBDA 25 cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.4.14.1. Klorofil ve β-karoten tayini

Rafinasyon prosesinin her bir basamağından alınan nar çekirdeği yağı numunelerindeki klorofil ve β-karoten miktarları, çift ışın yollu UV-visible spektrofotometresi kullanılarak, Alfa Laval ALS Method 4031 E 162 ve E 163 metodlarına göre tespit edilmiştir (Alfa Laval 1995).

Prosedür: Öncelikle cihazının her iki hücresine izooktan konularak sıfır ayarı yapılmıştır. Daha sonra, yağ numuneleri herhangi bir ön işleme tabi tutulmaksızın numune küvetine doldurulmuş ve spektrum taraması yapılmıştır. Spektrum taraması sonunda okunan değerler, klorofil ve karoten miktarlarının hesaplanmasında kullanılmıştır.

$$\textbf{Klorofil (ppm)} = \frac{(b - \frac{(a+c)}{2}) \times 1000}{0.1}$$

$$\beta - \textbf{Karoten(ppm)} = \frac{d \times 1000}{0.261}$$

a: 650 nm'deki klorofil pikinin başlangıç noktasındaki absorbans

b: 650 nm'deki klorofil pikinin tepe noktasındaki absorbans

c: 650 nm'deki klorofil pikinin bitiş noktasındaki absorbans

d: 450 nm'deki Beta karoten pikinin tepe noktasındaki absorbans

3.4.14.2. Birincil ve ikincil oksidasyon ürünlerinin (Özgül Abs.) tayini

Rafinasyon prosesinin her bir basamağından alınan nar çekirdeği yağı numunelerindeki birincil ve ikincil oksidasyon (bozunma) ürünlerinin miktarlarını tespit etmek amacıyla gerçekleştirilen özgül absorbans tayinleri, çift ışın yollu UV-visible spektrofotometresi kullanılarak, Alfa Laval metoduna göre tespit edilmiştir (Alfa Laval 1995).

Prosedür: Öncelikle cihazının her iki hücresine izooktan konularak sıfır ayarı yapılmıştır. Daha sonra, 10 mL izooktanda çözülen 0.05 g yağ numunesi numune küvetine doldurulmuş ve spektrum taramasından geçirilmiştir. Spektrum taraması sonunda 232 ve 270 nm dalga boylarında okunan absorbans değerleri, birincil ve ikincil oksidasyon ürünlerinin miktarlarının hesaplanmasında kullanılmıştır (Alfa Laval 1995).

$$\mathbf{As}_{23\ 2} = \frac{\boldsymbol{A}_{23\ 2}}{\mathbf{10} \times \boldsymbol{m}}$$

$$\mathbf{As}_{27\ 0} = \frac{\boldsymbol{A}_{27\ 0}}{\mathbf{10} \times \boldsymbol{m}}$$

A_{232}: birincil oksidasyon ürünlerine karşılık gelen absorbans değeri

A_{270}: ikincil oksidasyon ürünlerine karşılık gelen absorbans değeri

m = numune kütlesi (g)

3.4.15. FTIR analizleri

Rafinasyon prosesinin her bir basamağından alınan nar çekirdeği yağı numunelerindeki FFA, PV, konjuge dien ve trienler gibi minör bileşenlerin fonksiyonel gruplarını tespit etmek amacıyla gerçekleştirilen FTIR taramaları, Spectrum 100 FT-IR-ATR cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Prosedür: Öncelikle, FT-IR cihazındaki ATR prop üzerine herhangi bir çözücü veya numune ilave edilmeksizin cihazın background ayarı (sıfırlama) yapılmıştır. Daha sonra, yağ numuneleri herhangi bir ön işleme tabi tutulmaksızın prop üzerine damlatılmış ve 650-4000 cm^{-1} arasında spektrum taramaları yapılmıştır.

3.4.16. Antioksidan akivitesi ve toplam fenolik madde tayinleri

Rafinasyon prosesinin her bir basamağından alınan nar çekirdeği yağı numunelerinin antioksidan kapasitelerini tespit etmek amacıyla gerçekleştirilen tayinler, yağ numunesinde bulunan antioksidanların ekstrakte edilmesini, daha sonra da ekstrakte edilen kısımda *toplam fenolik madde*, *serbest radikal yakalama aktivitesi (DPPH Testi)* ve *toplam antioksidan kapasitesi* tayinlerinin gerçekleştirilmesini içermektedir. Aşağıda belirtilen tayin metotları ayrı ayrı kullanılarak antioksidan aktivitesi ve toplamfenolik madde tayinleri gerçekleştirilmiştir.

Ekstraksiyon Prosedürü: 1,5 mL hekzanda çözülen 1,5 g yağ numunesi, üzerine 3 mL metanol/su (80:20) karışımı ilave edilerek ekstraksiyon işlemine tabi tutulmuş, ekstraksiyon işlemi sonunda sulu faza alınan antioksidanlar, 3500 devirde

santrifüjlenerek organik fazdan ayrılmıştır. Ekstraksiyon işlemi aynı yağ numunesi için 3 kez tekrarlanmış ve her bir işlemden elde edilen ekstraktlar birleştirilmiştir (Minioti. 2010).

Toplam fenolik madde tayini: Gallik asit cinsinden hesaplanan toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen analizlerde, 5 farklı konsantrasyonda gallik asit standardı hazırlanmış, hazırlanan standart çözeltileri yardımıyla elde edilen kalibrasyon grafiği, farklı rafinasyon kademelerinden elde edilen nar çekirdeği yağı numunelerindeki toplam fenolik madde miktarını tespit etmede kullanılmıştır. Bunun için; hazırlanan gallik asit çözeltilerinin ve ekstraksiyon işleminden elde edilen yağ ekstraktlarının her birinden 200 µL alınarak, üzerine 1 ml Folin-Ciocalteu reaktifi ile %7.5`luk $Na_2CO_3$ çözeltisinden 2 mL eklenmiş ve toplam hacim saf su ilavesiyle 7 mL`ye tamamlanmıştır. Karışım, oda sıcaklığında ve karanlıkta 2 saat bekletildikten sonra 765 nm`de absorbansları ölçülmüştür. Elde edilen absorbans değerleri, yukarıda belirtilen kalibrasyon grafiği denkleminde yerine konulmuş ve yağların toplam fenolik madde içerikleri gallik asit cinsinden (mg GAE/g) hesaplanmıştır (Slinkard ve Singleton, 1977).

Serbest radikal yakalama aktivitesi tayini (DPPH Testi): Toplam fenolik madde tayininde olduğu gibi, serbest radikal yakalama aktivitesi tayininde de gallik asit cinsinden hesaplama yapılmıştır. Bunun için; 5 farklı konsantrasyonda gallik asit standart çözeltileri hazırlanmış, hazırlanan çözeltiler yardımıyla elde edilen kalibrasyon grafiği, farklı rafinasyon kademelerinden elde edilen nar çekirdeği yağı numunelerindeki serbest radikal yakalama aktivitesini tespit etmede kullanılmıştır. Tayinlerde; hazırlanan gallik asit çözeltilerinin ve ekstraksiyon işleminden elde edilen yağ ekstraktlarının her birinden 500 µL alınarak, üzerine $6x10^{-5}$ M konsantrasyondaki DPPH çözeltisinden 3 mL eklenmiştir. Kuvvetlice karıştırılan karışım, oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dk bekletildikten sonra 517 nm`de absorbansları ölçülmüştür. Elde edilen absorbans değerleri, yukarıda belirtilen kalibrasyon grafiği denkleminde yerine konulmuş ve yağların serbest radikal yakalama aktivitesi gallik asit cinsinden (mg GAE/g) hesaplanmıştır (Molyneux, 2004).

Toplam antioksidan kapasite tayini: Farklı rafinasyon kademelerinden elde edilen nar çekirdeği yağı numuneleri için toplam antioksidan kapasitesi, toplam fenolik madde ve serbest radikal yakalama aktivitesi tayinlerinde olduğu gibi, gallik asit cinsinden hesaplanmıştır. Tayinlerde, yine 5 farklı konsantrasyonda gallik asit standart

çözeltileri hazırlanmış, hazırlanan çözeltiler yardımıyla elde edilen kalibrasyon grafiği, farklı rafinasyon kademelerinden elde edilen nar çekirdeği yağı numunelerindeki toplam antioksidan kapasitelerini tespit etmede kullanılmıştır. Hazırlanan gallik asit çözeltilerinin ve ekstraksiyon işleminden elde edilen yağ ekstraktlarının her birinden 300 µL alınarak, üzerine 25 mL 0.6 M H_2SO_4 çözeltisi, 25 mL 28 mM $Na_2HPO_4.12H_2O$ çözeltisi ve 25 mL 4 mM amonyum molibdat çözeltisi karışımından oluşan reaktiften 3 mL eklenmiştir. Karışım kuvvetlice karıştırıldıktan sonra 95°C`de 90 dk inkübe edilmiş ve asidik ortamda Mo(VI)`nın Mo(V)`e indirgenmesi neticesinde oluşan yeşil renkli fosfat/Mo(V) komplekslerinin 695 nm`de absorbansları ölçülmüştür. Elde edilen absorbans değerleri, yukarıda belirtilen kalibrasyon grafiği denkleminde yerine konulmuş ve yağların toplam antioksidan kapasitesi gallik asit cinsinden (mg GAE/g) hesaplanmıştır (Prieto ve ark., 1999).

3.4.17. Termogravimetrik analizler

Rafinasyon prosesinin her bir basamağından alınan nar çekirdeği yağı numunelerinde sıcaklık artışıyla meydana gelecek yapısal değişikliklerin tespiti amacıyla gerçekleştirilen termogravimetrik (TG) ve diferansiyel termogravimetrik (DTG) analizler, Q5000IR-TA Instruments cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Prosedür: 15 mg yağ numuneleri ile gerçekleştirilen analizler, 50 mL/dk'lık dinamik hava atmosferi altında ve 30–600 ^oC sıcaklık aralığında, 10°C/dk sıcaklık artışıyla, platin tabaklar kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

Günümüzde tüketilen yenilebilir özellikteki yağlar, uygun koşullarda saklanmış çekirdek ve meyvelerin presleme ya da daha ileri işlemlere tabii tutulması sonucu elde edilmektedir. Presleme işlemi sonucunda elde edilen ve soğuk pres yağlar olarak isimlendirilen bazı yağların direk kullanımında hiçbir sakınca olmamakla birlikte, bu yöntem son zamanların en tercih edilen yöntemleri arasında yer almaktadır. Ancak, presleme işlemine tabii tutulan çekirdeklerin meyveden ayrılması, yıkanması ve saklanmasının doğru bir şekilde yapılmadığı durumlarda ve yağ alma işlemleri esnasında kullanılan metotlardaki aşırı parametreler, yağda insan tüketimine uygun olmayan çeşitli ürünlerin oluşumuna sebep olmakta ve bu tür yağların tüketimini sınırlamaktadır.

Nar ekşisi ve nar suyu üretimi sonunda uzun süre beklemiş ve su ile yıkama işlemi istenen seviyede yapılmamış olan nar çekirdeklerinde; çekirdek yüzeylerinde bulunan şeker ve protein artıklarının bakteriler tarafından alkollere dönüşümü söz konusu olmaktadır. Bu nedenle; yemeklik olarak tüketilebilirliğinin sağlanması amacıyla ham nar çekirdeği yağı, uzun süre beklemiş ve bakteri faaliyetinden dolayı istenmeyen koku ve tatların uzaklaştırılması amacıyla şimdiye kadar ön görülen metotlardan pres yağların tercih edilen özelliklerini bozmayacak yumuşaklıkta bir rafinasyon işlemine tabi tutulmuştur. Tat ve duyusal özellikleri uygun olan yağların direk kullanımı şiddetle tavsiye edilirken; bozulmuş yağların kullanılmadan önce bazı uygun işlemlerden geçirilmiş olması insan sağlığı açısından çok önemli görülmektedir.

Tez çalışmasında kullanılan nar çekirdeği yağı, Türk Gıda Kodeksi tebliğinde belirtilen yağ özelliklerine uymasına rağmen tat ve kokudan dolayı rafinasyon işlemine tabi tutulmuştur. Nar çekirdeği yağının rafinasyonunda; degumming, nötralizasyon, ağartma, vinterizasyon ve ikinci ağartma prosesleri uygulanmıştır. Kullanılan proses parametrelerinde soğuk pres yağların genel yağ özelliklerinin korunması temel alınmıştır.

Yağ içerisinde bulunan ve yapısında yağ asitlerini ve fosfatid gruplarını bulunduran gumlar, genel olarak fosfatit uçlarından dolayı nem tutucu özelliğe sahiptirler. Gumların nem tutma özelliğine sahip olmalarından dolayı nar çekirdeği yağında bulunan konjuge linolenik asit gibi konjuge ve konjuge olmayan yağ asitlerinin oksidasyonunu hızlandırdığı bilinmektedir. Bu nedenle yapılan degumming işlemi,

fosfatidlerin, yağda bulunan şeker gibi hidrofilik yapıdaki yabancı maddelerin uzaklaştırılması ve yağ kayıplarını engellemek için uygulanmıştır (Dijkstra 2011).

Nötralizasyon işlemi; uygun olmayan sıcaklık, nem ve oksijen gibi şartlar altında depolanan ve düşük kaliteli ham maddelerden elde edilen ve ester yapısında bulunan yağların kimyasal ve enzimatik yolla (lipaz enzimi) hidrolizi sonucu oluşan, yağa kötü tat veren, asitliği arttıran ve yağ içerisinde çözünmüş halde bulunan serbest yağ asitlerinin uzaklaştırıldığı temel bir rafinasyon basamağıdır. Ancak; bu kademede serbest yağ asitlerinin yanı sıra, degumming işleminden kalmış olan fosfatidler, yine degumming işleminde kullanılmış olan fosforik asit, metaller, renkli pigmentler, çözünmeyen safsızlıklar ve bakteri faaliyeti sonucu oluşmuş olan alkollerde uzaklaştırılmaktadır (Ayyıldız 2010).

Ağartma kademesinde; uygun olmayan sıcaklık, nem ve oksijen gibi şartlar altında depolanan ve düşük kaliteli ham maddelerden elde edilen, doğal renk maddeleri yanında oksidadif tepkimeler sonunda oluşan ve yağa koyu renk veren bileşenleri ve oksidasyona karşı kararlılığını azaltan ve tadını bozan oksidasyon ürünlerini ve iz metallerini, bu basamaktan önceki işlemlerde yeterince uzaklaştırılamamış fosfolipidler, sabun kalıntıları ve ham yağın doğal olarak içerdiği renk verici pigmentler gibi maddeler uzaklaştırılır (Ayyıldız 2010).

Yavaş yavaş soğutulan, düşük sıcaklıklarda (4°C) ve çekirdek oluşturucu madde ile birlikte yavaş bir karıştırma eşliğinde gerçekleştirilen fiziksel bir işlem olan vinterizasyon; yağda çözünmüş halde bulunan vaksların (uzun zincirli yağ alkolleri) ve stearinlerin kristallendirelerek uzaklaştırıldığı bir basamaktır. Bu basamakta, önceki basamaklarda oluşan polar ve polimerik maddeler de uzaklaştırılmaktadır.

Yüksek sıcaklık & basınçta gerçekleştirilen ve rafinasyon kademesinin en son basamağını teşkil eden deoderizasyon kademesi, yağın cinsine bağlı olmakla birlikte yağlarda oluşması istenmeyen bazı reaksiyonların hızını artırdığı bilinmektedir. Böyle durumlarda; yağa kötü koku ve tad veren yağ harici maddelerin uzaklaştırıldığı deodorizasyon kademesi yerine, yağı maruz kaldığı yüksek sıcaklık ve basınçtan korumak için süzmeyi kolaylaştırıcı madde ve ağartma toprağının kullanıldığı 2. ağartma kademesi devreye sokulmaktadır. Bu nedenle süzmeyi kolaylaştırıcı madde ve ağartma toprağı 1:1 oranda karıştırılarak kullanılmıştır.

Çizelge 4. 1 Nar çekirdeği Yağı Rafinasyon Parametreleri

Kademe	Sıcaklık (°C)	Reaktif	Sure
Degumming	75-80	Yağa göre % 0,1 oranında % 60`lık H_3PO_4 çözeltisi	30 min
Nötralizasyon	75-80	Yağa göre %1 oranında %10`luk NaOH çözeltisi	30 min
Ağartma	90	Yağa göre %1 oranında ağartma toprağı ve süzmeyi kolaylaştırıcı madde karışımı (90:10)	15 min
Vinterizasyon	3-5	Yağa göre % 0,1 çekirdek oluşturucu madde	5-6 h
Ikinci Ağartma	90	Yağa göre %5 oranında ağartma toprağı ve süzmeyi kolaylaştırıcı madde karışımı (1:1)	15 min

Nar çekirdeği yağında bulunan istenmeyen koku ve tadı iyileştirmek amacıyla gerçekleştirilen rafinasyon işleminde;

1. Serbest yağ asidi (FFA) değerini uygun noktaya getirmek,
2. Peroksit değerini (PV) düşürerek tat ve koku değerini istenen seviyeye getirmek,
3. Yağın oksidasyonunu arttıran metal ve diğer yabancı maddeleri uzaklaştırmak,
4. Berrak bir yağ elde etmek,
5. İyot sayısını sabit tutmak hedeflenmiştir.

Yüksek konjuge linolenik asit içeriğiyle (~%80) yağlı çekirdek tohumları arasında oldukça önemli bir yerde bulunan, fakat şimdiye kadar yemeklik yağ olarak özellikleri incelenmemiş olan nar çekirdeği yağının fiziksel ve kimyasal özelliklerini ve rafinasyon kademelerindeki değişimi incelemek ve bu tür özel yağların analizlerinde kullanılabilecek nitelikte metotlar geliştirmek amacıyla gerçekleştirilen bu tez çalışmasında yürütülen analizlere ait deney sonuçları ve değerlendirmeleri aşağıda detaylı bir şekilde verilmiştir.

4.1. Fosfor, Serbest Yağ Asidi, Peroksit Sayısı, Renk, Bulanıklık ve İyot Sayısı Tayinleri

Nar çekirdeği yağının rafinasyon prosesi süresince yağda meydana gelen fiziksel ve kimyasal değişimlerin incelenmesi amacıyla gerçekleştirilen tayinlere, yağ sektöründe rutin olarak yapılmakta olan fosfor, FFA, peroksit sayısı, sabun miktarı, renk, bulanıklık ve iyot sayısı tayinleri ile başlanmıştır. Gerçekleştirilen tayinlerden elde edilen sonuçlar **Çizelge 4. 2** özetlenmiştir.

Çizelge 4. 2 Rafinasyon Kademeleri Fiziksel ve Kimyasal Analiz Sonuçları

	% Fosfor	% Serbest Yağ Asidi	Peroksit Sayısı (meg O_2/kg yağ)	Renk (Lovibont)	Sabun (ppm)	Bulanıklık (NTU)	İyot Sayısı (g I_2/100g yağ)
Ham Yağ	1.00	1,50 ± 0,05	2,4 ± 0,1	8,3-70	0	3,95± 0,05	234± 1
Notr Yağ	0.05	0,06 ± 0,01	0,8± 0,1	9-70	0	2,40± 0,05	235± 1
Ağartılmış Yağ	0.05	0,08 ± 0,01	0,4± 0,1	4,8-70	0	2,00± 0,05	214± 1
Vinterize Yağ	0.04	0,08 ± 0,01	0,4± 0,1	3,8-70	0	1,48± 0,05	215± 1
Rafine Yağ (2. ağartma kademesi sonu)	0.04	0,08 ± 0,01	0,4± 0,1	2,8-70	0	1,35± 0,05	215± 1

Elde edilen sonuçlar göstermektedir ki; çok sert olmayan şartlarda gerçekleştirilen nar çekirdeği yağının rafinasyon prosesi sonunda yağda fiziksel ve kimyasal değişimler meydana gelmiştir. Rafinasyon boyunca renk değerinde belirli bir azalma gözlenirken; *% FFA, Peroksit Sayısı* ve *İyot Sayısı* değerlerinde ağartma kademesine kadar bir azalış gözlenmiş, daha sonraki kademelerde ise bu indisler sabit bir değerde kalmışlardır. Rafinasyon kademelerinin her birinde meydana gelen yağ kalite indislerindeki değişimlerin aşağıdaki sebeplerden kaynaklandığı düşünülmektedir:

- ***NaOH ile yapılan nötralizasyon kademesi sonunda;*** *% fosfor* değerinin 0.05`e, *% FFA* değerinin de 0,06`ya düştüğü gözlenmiştir. Meydana gelen bu düşüşler, fosforik asit ilavesi ile fosfatidler hidratlaştırılmış ve sodyum sabunlarına dönüştürülen serbest yağ asitleri ile birlikte suyla yıkanarak yağdan uzaklaştırılmalarından kaynaklanmıştır (Dijkstra 2011, Deffense 2011). Ayrıca işlem sırasında; fosfatidler ve serbest yağ asitleri ile birlikte, ham yağda bulunan peroksitlerin de oluşan sabunla birlikte yağdan uzaklaştığı gözlenmiştir.
- ***Ağartma kademesi sonunda;*** *kırmızı renk* değerinin 4.8`e, *Peroksit Sayısı* değerinin 0.4`e düştüğü gözlenmiştir. Meydana gelen bu düşüşün, ağartma toprağının asidik, adsorpsiyon, iyon değişimi ve kompleks oluşumu gibi mekanizmalarla etkileşebilme özelliği göstermesi sebebiyle yağda bulunan oksidasyon ve koyu renk veren ürünlerle etkileşime girmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Werner 2001).

- ***Vinterizasyon kademesi sonunda;*** *% FFA, Peroksit Sayıs,* ve *İyot Sayısı* değerlerinde belirgin bir değişimin meydana gelmediği, *bulanıklık* değerinde ise 1.48`e önemli oranda düştüğü gözlenmiştir.
- ***2. ağartma kademesi sonunda (rafine yağ);*** *% FFA, , Peroksit Sayısı,* ve *İyot Sayısı* değerlerinde belirgin bir değişimin meydana gelmediği, renk ve bulanıklık değerlerinin ise sırasıyla 2,8 ve 1,35`e kadar düştüğü gözlenmiştir. Meydana gelen değişimlerin şu sebeplerden kaynaklandığı düşünülmektedir:

Yüksek sıcaklık & basınçta gerçekleştirilen ve rafinasyon kademesinin en son basamağını teşkil eden deoderizasyon kademesi şartlarının, yağın cinsine bağlı olmakla birlikte yağlardaki bazı reaksiyonların hızını artırdığı bilinmektedir. Böyle durumlarda; yağa kötü koku ve tad veren yağ harici maddelerin uzaklaştırıldığı deodorizasyon kademesi yerine, yağı maruz kaldığı yüksek sıcaklık ve basınçtan korumak için süzmeyi kolaylaştırıcı madde ve ağartma toprağının kullanıldığı 2. ağartma kademesi devreye sokulmaktadır. Bu basamakta kullanılan süzmeyi kolaylaştırıcı madde ve ağartma toprağının, vinterize yağda bulunan renk pigmentleri ve bulanıklığa sebep olan maddeler ile etkileşime girerek bu değerlerde düşüşe sebep olduğu ve yağın kötü tadı ve kokusunu da giderdiği görülmüştür.

4.2. Yağ Asit Kompozisyonu Analizleri

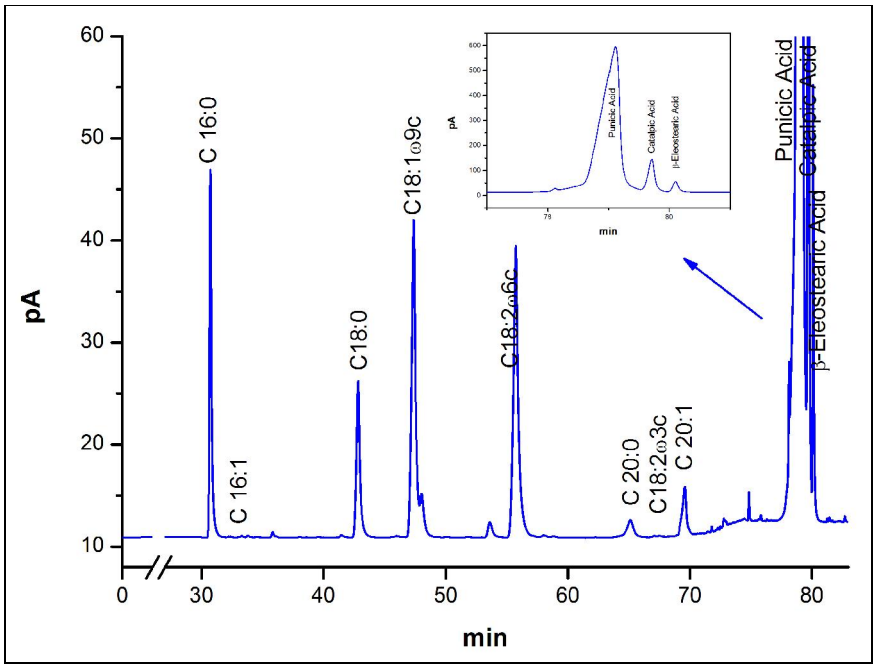
Vücutta sentezlenemeyen ve elzem yağ asitleri olarak adlandırılan çoklu doymamış yağ asitleri, insan vücudunda önemli fizyolojik fonksiyonlar göstermekte ve sağlıklı bir büyüme & gelişme için diyetle alınmak zorundadır. Çeşitli kaynaklardan alınabilen bu yağ asitlerinin (linoleik, linolenik ve araşidonik asitler) ve konjuge yağ asitlerinin, ateroskleroz, obezite, hipertansiyon, tümör gelişimini engellediği ve monositik lösemi hücreleri, karaciğer kanseri, kolon kanseri, göğüs kanseri ve mide kanserinde kanser hücrelerinin büyümesini durdurduğu belirlenmiştir (Süzen 2009, Lansky 2005, Kohno 2004, Igarash 2000). Çam ve ark., (2009) ise, kanser hücreleri üzerinde gözlenen bu etkinin, konjuge linoleik aside (CLA) kıyasla, konjuge linolenik asitte (CLnA) çok daha fazla olduğunu bildirilmişlerdir.

Çoklu doymamış konjuge yağ asitlerinin, doğal hayvansal kaynaklarda genellikle %1 den daha az bulunduğu bilinmekle birlikte, bazı çekirdek yağlarında bu miktar, toplam yağ asitlerinin %40-85'lik bir bölümünü oluşturmaktadırlar (Çam 2009). Bu yağlardan biri olan nar çekirdeği yağı diğer çekirdek yağları ile karşılaştırıldığında, ~%85 konjuge linolenik yağ asit (CLnA) içeriği ile en fazla konjuge yağ asidine sahip

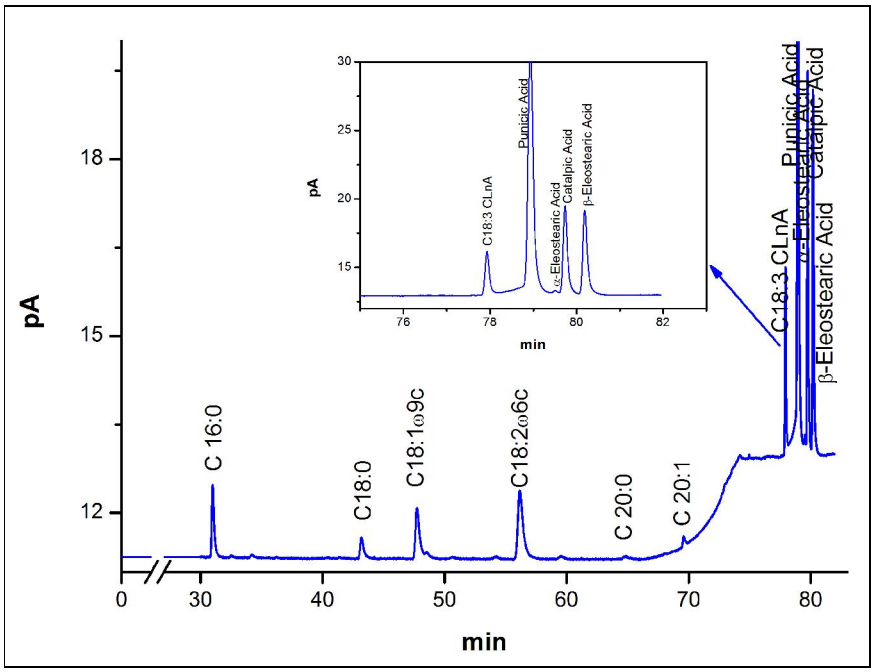
olduğu görülmektedir. Bu sebeple; yüksek konjuge linolenik yağ asidi (CLnA) içeriği ile diğer yenilebilir yağlardan ayrılan nar çekirdeği yağının yağ asit kompozisyonu, bilinen metotlardan ziyade bu tür özel yağlar için geliştirilecek uygun metotlar kullanılarak belirlenmelidir. Bu amaçla kullanılacak metodun, yağ numunesi üzerinde gerçekleştirilecek ön işlemler sırasında konjuge yağ asitlerinin izomer yapılarını değiştirmemesi, yağ asit izomerlerinin miktarını doğru ve kesin bir şekilde belirlemesi gerekmektedir. Sunulan bu tez çalışmasında; nar çekirdeği yağının yağ asit kompozisyonu analizi için, metilleme tekniklerinin etkisi incelenmiş, uygun kromatografik şartlar tespit edilerek, her bir rafinasyon kademesinden alınan yağ numunelerinin yağ asit kompozisyonundaki değişimler belirlenen koşullarda değerlendirilmiştir. Yürütülen incelemelerden elde edilen sonuçlara ilişkin bilgiler, aşağıda ayrı başlıklar altında detaylı bir şekilde sunulmuştur.

4.2.1. Yağ asit metil esterlerinin elde edilmesi

Ham nar çekirdeği yağı numuneleri kullanılarak, gaz kromatografi (GC) tekniği ile gerçekleştirilen yağ asit kompozisyonu analizlerinde, trigiliserit yapısında bulunan ve uçucu özellik taşımayan yağ numuneleri, uçuculuklarını artırmak amacıyla analiz öncesinde genellikle metil esteri formuna dönüştürülmektedir. Numuneler üzerinde uygulanan esterleştirme metotları, özellikle konjuge yapıda bulanan yağ asitlerinin tayin edilebilirliği açısından oldukça önem taşımaktadır. Konjuge yağ asitleri üzerinde yapılan bir çok çalışma; baz katalizli esterleştirme işleminin, yağ asitlerinin önemli derecede izomerizasyona neden olan asit katalizli esterleştirme işlemine kıyasla daha etkili bir yöntem olduğu göstermektedir (Chen 2007, Sassano 2009). Sunulan bu çalışmada; yağların ester formuna dönüştürülmesi işlemi, farklı sıcaklıklarda, asidik ve bazik ortamda olmak üzere iki şekilde gerçekleştirilmiştir. Ham nar çekirdeği yağının asidik ve bazik koşullarda elde edilen metil esterlerine ait kromatogramlar **Şekil 4. 1** ve **Şekil 4. 2**`de, metilleme tekniklerine ait yağ asit kompozisyon sonuçları **Çizelge 4. 3**'de ve metilleme tekniğine bağlı olarak yağda meydana gelen konjuge yağ asit miktarında meydana gelen değişim **Şekil 4. 3**'de yer almaktadır.



Şekil 4. 1 Baz Katalizleme ile Yapılan Metillemeye ait Kromatogram

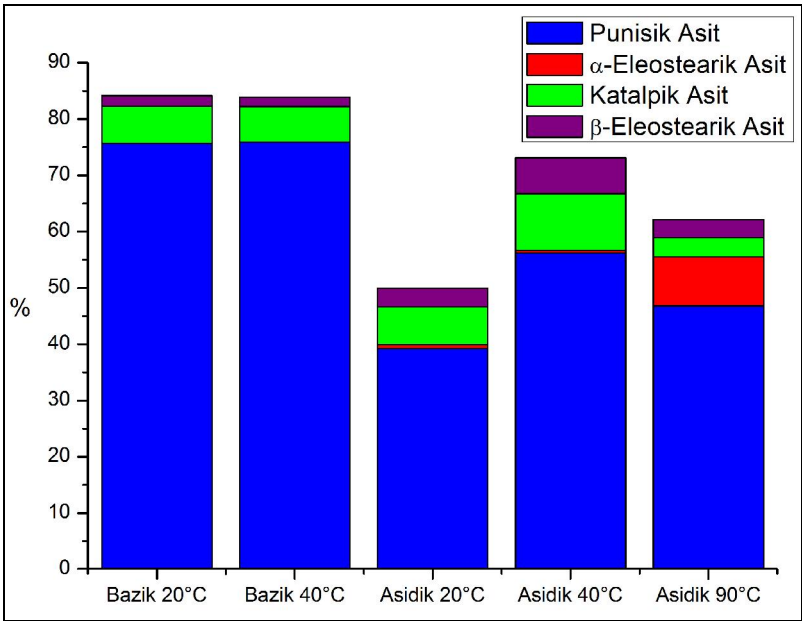


Şekil 4. 2 Asit Katalizleme ile Yapılan Metillemeye ait Kromatogram

Çizelge 4. 3 Metilleme Tekniğine Bağlı Yağ Asit Kompozisyonu Sonuçları (%)

	Asidik			Bazik	
Yağ Asitleri	**20 °C**	**40 °C**	**90 °C**	**20 °C**	**40 °C**
C16:0	8.44± 0.48	4.21± 0.13	6.54± 2.19	2.51±0.01	2.59±0.02
C16:1	0.44± 0.10	TED	0.18 ± 0.09	0.01±0.00	0.04±0.00
C18:0	2.26± 0.11	1. ± 0.03	2.24± 0.34	1.79±0.00	1.90±0.02
C18:1 ω9 (c)	7.66±0.25	5.02± 0.08	6.39± 1.29	4.11±0.00	4.31±0.02
C18:1 iso	0.96± 0.09	TED	1.15±0.14	0.56±0.00	0.54±0.10
C18:2 ω6 (t)	0.10±0.18	0.00±0.00	0.29±0.02	0.21±0.00	0.21±0.00
C18:2 ω6 (c)	16.39±0.78	8.60±0.30	12.62±4.02	4.75±0.01	4.72±0.02
C20:0	0.51±0.09	TED	0.40±0.09	0.32±0.00	0.36±0.02
C18:3 ω3	0.27±0.24	TED	0.24±0.15	TED	TED
C20:1	0.47±0.06	TED	0.59±.26	0.68±0.00	0.71±0.03
C18:3 CLnA	10.86±3.45	7.14±1.32	6.30±5.51	TED	TED
C18:3 CLnA (Pünisik)	39.24±0.49	56.18±6.52	46.83±7.65	75.72±0.14	75.94±0.66
C18:3 CLnA (α-eleostearik)	0.74±0.13	0.48±0.09	0.74±0.78	0.00±0.00	0.00±0.00
C18:3 CLnA (Katalpik)	6.70±1.95	10.03±2.32	8.63±2.83	6.61±0.10	6.30±0.39
C18:3 CLnA (β-eleostearik)	3.31±1.42	6.47±4.73	3.39±0.97	1.84±0.03	1.66±0.21
C18:3 CLnA	0.180.31	TED	3.30±2.45	TED	TED
Toplam CLnA	61,03±1.29	80.31±2.50	69.20±3.37	84,17±0.09	83,90±0.42

* TED: Tespit Edilemeyen Değer



Şekil 4. 3 Metilleme Tekniğine Bağlı Konjuge Yağ Asit Miktarında Meydana Gelen Değişim

Çizelge 4. 3`de görüldüğü gibi; BF_3 reaktifi kullanılarak asidik ortamda gerçekleştirilen esterleştirme işlemlerinde; sıcaklık değişimiyle birlikte yağ asit kompozisyonunda belirgin bir değişim meydana gelirken, bazik ortamda gerçekleştirilen esterleştirme işlemlerinde belirgin bir değişim gözlenmemiştir. Sıcaklık ve ortam şartlarına bağlı olarak, yağ asit kompozisyonlarında meydana gelen bu değişimleri, 3 tekrarlı yürütülen analiz verilerinden elde edilen standart sapma değerleri de doğrulamaktadır. Örneğin; nar çekirdeği yağındaki en önemli yağ asidi olarak nitelendirilen punisik asidin bazik ortamda esterleştirilmesinde, standart sapma değeri en fazla % 0,66`yı geçmezken, asidik ortamda esterleştirilmesinde bu değer % 6,52`e kadar yükselmiştir. Ayrıca; asidik ortamda gerçekleştirilen esterleştirme işleminde toplam CLnA miktarında herhangi bir değişim gözlenmemesine rağmen, punisik asit miktarında önemli oranda bir değişim meydana gelmiştir. Bu değişimin, punisik asitte bulunan *ctc cis* bağlarının, asidik katalizleme dolayısıyla daha kararlı *ctt*, *ttc* ve *ttt trans* izomerlerine dönüşmesi neticesinde meydana geldiği, sıcaklık artışının da bu dönüşümü katalizlediği düşünülmektedir. Yapılan bir çok çalışma da; asidik koşullar altında yapılan metilleme işleminin CLnA`nın önemli derecede izomerizasyona neden olduğunu, bu nedenle baz katalizli yöntemlerin CLnA`nın metillenmesinde daha iyi bir yöntem olduğunu doğrulamaktadır (Chen 2007, Sassano 2009). Yukarıda vurgulanan bilgiler ışığında; nar çekirdeği yağı gibi yüksek konjuge yağ asidi içeriğine sahip yağların yağ asit kompozisyonu analizinde, esterleştirme işleminin bazik ortamda yapılmasının daha uygun olduğu görülmüş ve ileriki çalışmalarda bu yöntem kullanılmıştır.

4.2.2. Kromatografik şartların belirlenmesi

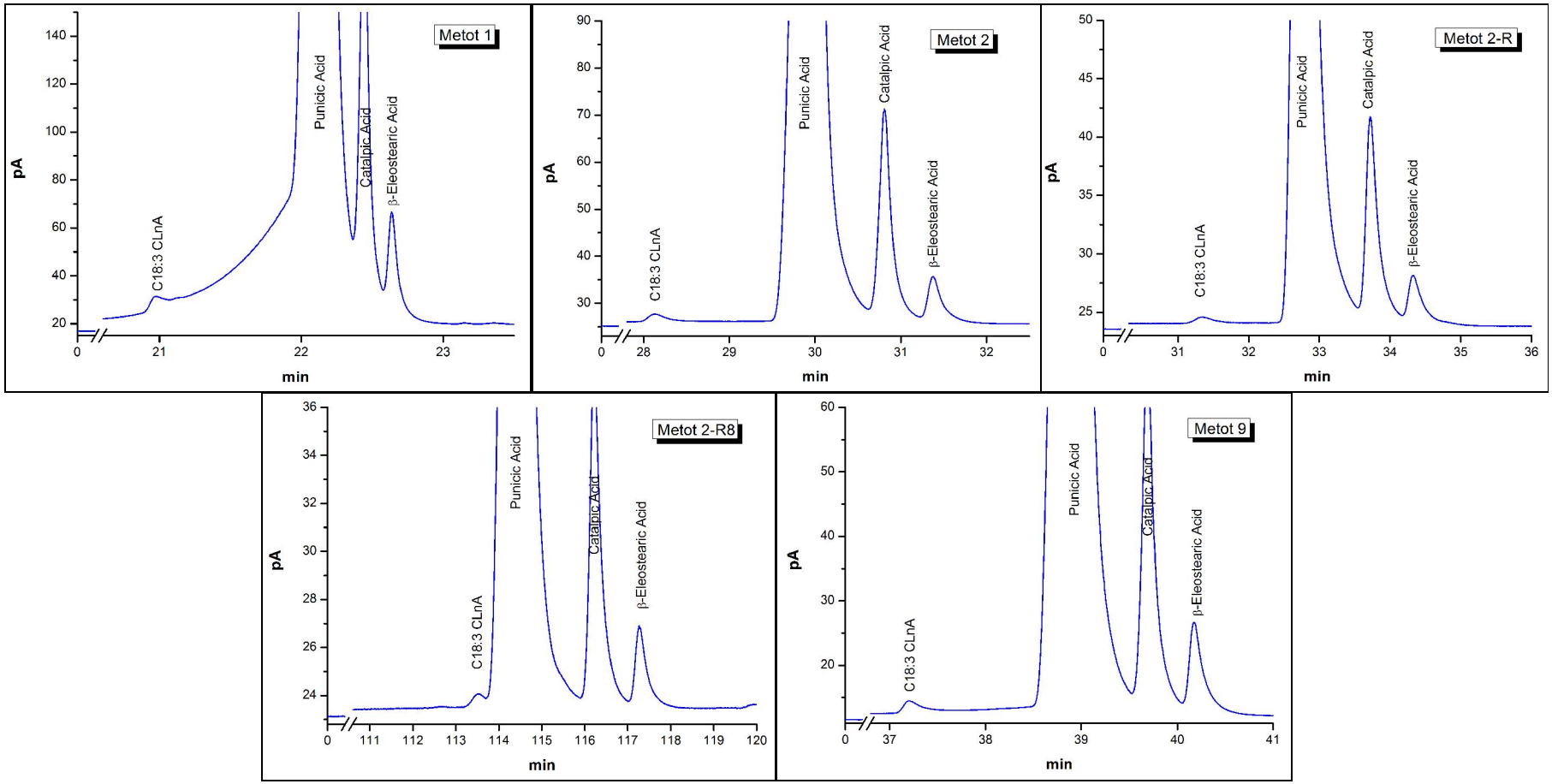
GC`de yürütülen yağ asit kompozisyonu analizlerinde; standart metotlar yerine, literatürde yer alan 12 adet metot ve tarafımızdan geliştirilen 20 adet metot olmak üzere 32 adet metot kullanılmış ve kromatografik ayrımlar için en uygun metot tespit edilmeye çalışılmıştır. Kromatografik ayrımlarda konjuge linolenik asit izomerlerinden *pünisik* ve *katalpik asit* ayrımı özellikle dikkate alınmıştır. Kullanılan metotlardan bazılarına ait kromatografik ayırma verim hesaplamalarına dair sonuçlar **Çizelge 4. 4**`de yer almaktadır.

Çizelge 4. 4 Yağ Asit Kompozisyonu Analiz Metotları Kromatografik Verim Sonuçları

Metot	Enjektör (°C)	Dedektör (°C)	Akış Hızı (mL/min)	Kolon Fırını			Süre (min)	Kromatografik Verim				
				°C/min	°C	min		k`	α	N	H	Rs
Metot1	250	280	0.8		150	5	34	1.90	1.01	4652	0.021	0.35
				10	240	20						
Metot2	250	250	1.6		140	2	57	5.05	1.03	10546	0.009	0,94
				4	200	40						
Metot3	250	250	1.6		180	0	60	0,86	1,04	2930	0.034	0.42
				2	240	30						
Metot4	250	250	1.6		180	5	55	3.65	1.03	5850	0.017	0.66
				2	220	30						
Metot5	250	300	0.5		180	0	50	1.90	1.03	2476	0.040	0.43
				2	230	25						
Metot6	250	300	154.4*		170	0	55	5.47	1.04	8273	0.012	0.96
				2	240	20						
Metot7	240	250	0.315		150	1	55	1.21	1.03	2192	0.046	0.36
				15	200	0						
				2	240	30						
Metot8	250	300	154.4*		170	0	65	1.22	1.03	2183	0.046	0.36
				2	240	30						
Metot9	250	250	1.0		155	0	67	4.92	1.02	11399	0.009	0.74
				1.5	240	10						
Metot10	250	250	1.0		170	5	60	3.71	1.02	5083	0.020	0.53
				2	240	20						
Metot11	200	240	0.6		170	4	68	3.60	1.03	9797	0.010	0.87
				3	180	0						
				1	240	1						
Metot12	250	20	1.0		50	2	197	18.81	1.01	111255	0.001	1.03
				1	240	5						
Metot2-R1	250	280	1.6		140	2	62	5.61	1.03	13979	0.007	1.05
				3	200	40						
Meto2-R8	250	280	1.0		100	2	177	15.27	1.02	44392	0.002	1.14
				1	160	5						
				0.7	230	10						
Meto2-R9	250	280	1.0		100	10	215	18.62	1.02	39837	0.003	1.02
				1	140	5						
				0.6	230	10						
Meto7-R1	240	250	0.3		150	1	60	1.54	1.03	3008	0.033	0.39
				5	200	0						
				2	240	30						
				1	240	10						
Met10-R1	250	250	1.0		170	5	95	5.13	1.03	13005	0.008	0.97
				1	240	20						

* psi

Analiz sonuçlarından elde edilen veriler kullanılarak hesaplanan k`, α, N, H ve Rs değerleri kromaografik analizlerin değerlendirilmesinde kullanılmış ve k`değerinin 2-10 arasında, Rs değeri 1,5`a en yakın ve tabaka sayısı değeri en fazla olan kromatografik ayrımda uygulanan metodun en uygun metot olduğu kabul edilmiştir. Toplam 32 analiz metoduyla yapılan analizler sonucunda *Pünisik asit* ve *Katalpik asit* türlerininin tam olarak ayrılması Metot2-R8 metoduyla gerçekleştirilmiştir. Ancak analiz süresinin uzun olması ve çalışmalarımızı sadece nar çekirdeği yağları için gerçekleştirileceğinden ve Rs, k` ve H değerleri bakımından Metot2-R8`e yakın değerlere sahip olmasından dolayı çalışmalara Metot2-R1 metoduyla devam edilmiştir. Bu sebeple; nar çekirdeği yağı gibi yüksek konjuge yağ asidi içeriğine sahip yağların yağ asit kompozisyonu analizinde, kromatografik ayırma metodu olarak Metot 2-R1 kullanımı uygun bulunmuştur. Çalışma sırasında kullanılan bazı seçilmiş metotlara ait kromatogramlar **EK-1**`de, bu metotların konjuge yağ asitlerinin bulunduğu bölgeler ise **Şekil 4. 4**`de verilmiştir.



Şekil 4. 4 Çalışmalarda Kullanılan Bazı Seçilmiş Metotlara Ait Konjuge Yağ Asidi Bölgeleri

Önerilen bir metodun kullanılabilirlik kazanabilmesi için, metodun performansını ve üstünlüğünü gösteren validasyon çalışmalarının gerçekleştirilmesi, bunun yanı sıra; yeni metodun, daha önce kullanımda olan standart metotlarla istatistiksel olarak karşılaştırılması gerekmektedir (Ayyıldız 2010). Bu sebeple; ayçiçek yağının yağ asit kompozisyonu içeriğinin tespiti için geliştirilen Metot 2-R1 metodu ile şimdiye kadar kullanılmakta olan standart AOCS Ce 1c-89 metodu istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

Ayçiçek yağının yağ asit kompozisyonu tayini için Metot 2-R1 ve standart metot karşılaştırması yapılırken, t testi dikkate alınmış ve aşağıdaki formüller yardımıyla t değeri hesaplanmıştır. t değerinin hesaplanmasından sonra ise; serbestlik derecesine göre oluşturulmuş tablolardan kritik t değeri bulunmuş ve hesaplanan değerlerle karşılaştırılarak, hipotezlerden metodun uygunluğuna karar verilmiştir.

$$t = \frac{\bar{X}_d - \mu_0}{S_d/\sqrt{N}}$$

t: t testi

$\overline{X}_d$: Farkların Ortalaması

S_d: Farkların Standart Sapması

N: Farkları Sayısı

Metot 2-R1 ve standart metot kullanılarak gerçekleştirilen ayçiçeği yağının yağ asit kompozisyonu tayininden elde edilen verilerin karşılaştırılmasında aşağıdaki null ve alternatif hipotezleri kullanılmıştır:

H_0: $\mu_0 = 0$

H_A: $\mu_0 \neq 0$

Oluşturulan hipotezlere göre; H_0, Metot 2-R1 ile standart metot verilerine ait ortalamalar arasında anlamlı olarak (%95 güven seviyesinde) bir fark olmadığını ileri sürerken, H_A, Metot 2-R1 ile standart metot verilerine ait ortalamalar arasında anlamlı bir fark olduğunu savunmaktadır.

İki metottan elde edilen deneysel verilerin (**Çizelge 4. 5**) kullanılmasıyla, hesaplanan t değeri: 0.45 olarak, kritik t değeri (tablodan) ise 2.78 olarak belirlenmiştir (p=0.05).

Yukarıdaki bilgiler doğrultusunda, %95 güven seviyesinde H0 hipotezinin reddedilemeyeceği açıkça görülmektedir. Şöyle ki;

t hesaplanan : 0.45 < t kritik : 2.78

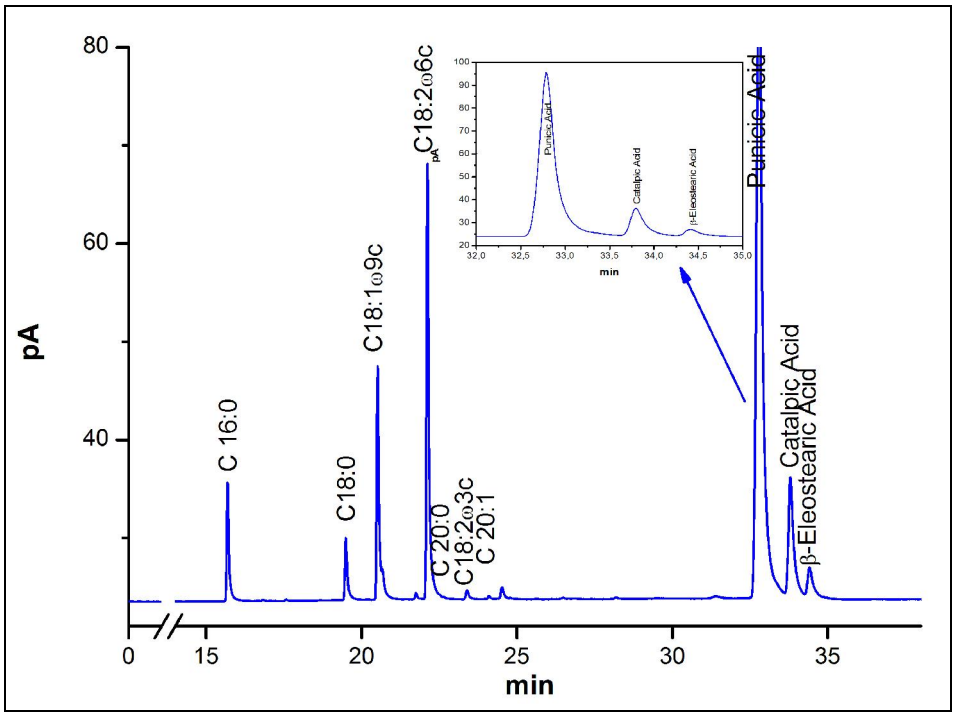
olduğundan hesaplanan t değeri, dağılım grafiğinde kabul bölgesine düşmektedir. Bu sebeple; H_0: μ_0 =0 olduğunu ileri süren H_0 hipotezi reddedilemez, yani; Metot 2-R1 ve standart metotlardan elde edilen veri gruplarının ortalaması birbirinden anlamlı olarak farklı değildir.

Çizelge 4. 5 AOCS Ce 1c-89 ve Metot 2-R1Metotları Kullanılarak Ayçiçek Yağı Numunesi için Hesaplanan Yağ Asit Kompozisyonu Değerleri

%	AOCS Ce 1c-89	Metot 2-R1	Fark	
C16:0	6.67	6.49	0.18	
C18:0	3.40	3.20	0.20	$\bar{X}_d$:0.36
C18:1 ω9 (c)	26.89	25.91	0.98	S_d: 0.36
C18:2 ω6 (c)	59.12	58.73	0.39	
C18:3 ω3 (c)	0.27	0.20	0.07	

4.2.3. Rafinasyon kademelerindeki değişim

Nar çekirdeği yağı rafinasyon prosesi süresince yağ asit kompozisyonunda meydana gelen değişimlerin belirlenmesi için yapılan analizlerde, yağ numuneleri alkali metilleme tekniği kullanılarak metil ester türevlerine dönüştürülmüş ve Metot 2-R gaz kromatografisi analiz metodu kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kromatografik ayrımlara örnek teşkil etmesi açısından, rafine nar çekirdeği yağının yağ asit kompozisyonuna ait kromatogram Şekil 4. 5**'** de verilmiş, diğer rafinasyon kademelerinden alınan yağ numunelerinin yağ asit kompozisyonu değerleri ise **Çizelge 4. 6**`da özetlenmiştir. Ayrıca, çalışmalarda kullanılan nar çekirdeği yağının yüksek konjuge yağ asit içeriğine sahip bir yağ olması sebebiyle; analiz sonuçları değerlendirilirken ***(i)*** *doymuş*, ***(ii)*** *konjuge olmayan doymamış* ve ***(iii)*** *konjuge olan doymamış* yağ asitlerinin kendi arasında bir gruplandırması da yapılmış ve bu yağ asitlerinin miktarlarında meydana gelen toplam değişimler incelenmiştir. Nar çekirdeği yağında bulunan *doymuş*, *konjuge olmayan doymamış* ve *konjuge olan doymamış* yağ asidi gruplarının rafinasyon kademelerine göre değişimi **Şekil 4. 6**`da *konjuge doymamış* yağ asitlerinin (*Pünisik, Katalpik, β-eleostearik*) rafinasyon kademelerine göre değişimi ise **Şekil 4. 7**`de yer almaktadır.

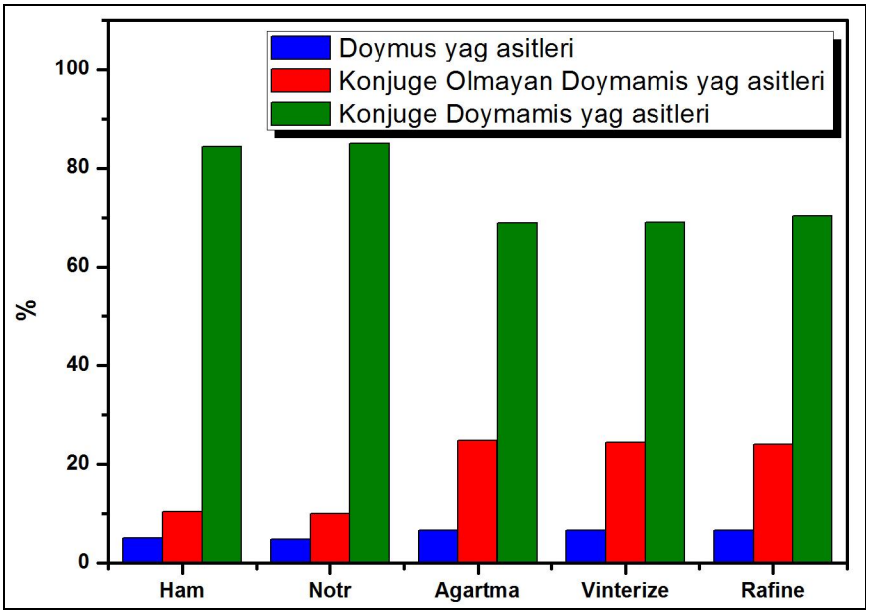


Şekil 4. 5 Nar Çekirdeği Yağına Ait Yağ Asit Kompozisyonu Kromatogramı

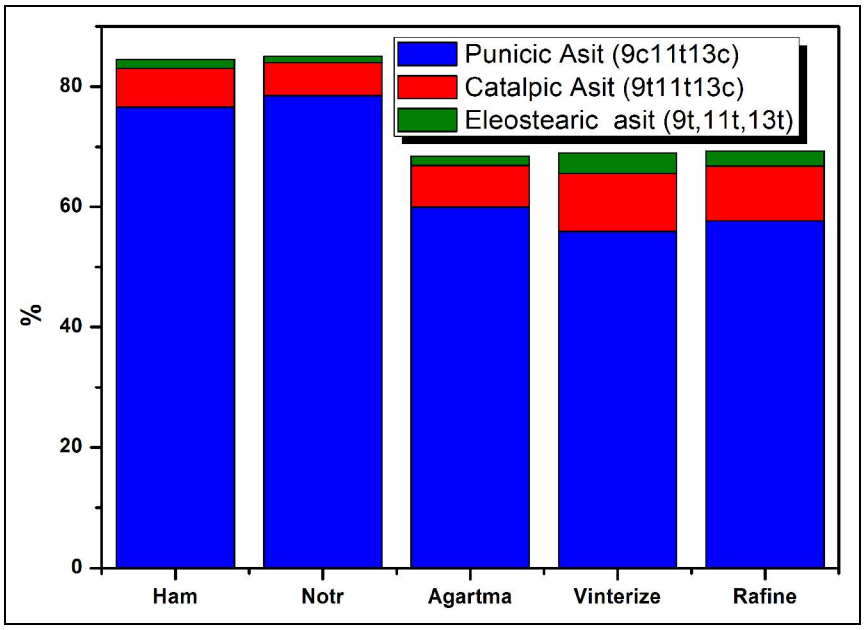
Çizelge 4. 6 Rafinasyon Kademelerine ait Yağ Asit Kompozisyonu Sonuçları (%)

Yağ Asitleri	Ham	Nötr	Ağartma	Vinterize	Rafine
C14:0	0.01±0.00	0.01±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.01
C16:0	2.49±0.01	2.41±0.00	3.64±0.01	3.64±0.05	3.70±0.04
C16:1	0.01±0.00	0.01±0.00	0.04±0.00	0.04±0.01	0.04±0.00
C17:0	0.03±0.00	0.04±0.00	0.04±0.00	0.04±0.00	0.05±0.01
C17:1	0.06±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
C18:0	1.82±0.01	1.73±0.01	2.29±0.01	2.24±0.03	2.17±0.03
C18:1ω9c	3.91±0.02	3.65±0.01	6.68±0.69	7.81±0.02	8.19±0.63
C18:1 iso	0.97±0.01	1.00±0.01	1.06±0.71	0.00±0.00	0.31±0.62
C18:2ω6t	0.19±0.00	0.19±0.00	0.17±0.01	0.18±0.00	0.19±0.01
C18:2ω6c	4.73±0.00	4.60±0.00	16.29±0.01	15.69±0.03	14.77±0.03
C20:0	0.38±0.00	0.35±0.00	0.32±0.00	0.34±0.00	0.35±0.02
C18:3ω3	TED	TED	0.05±0.03	0.07±0.01	0.09±0.01
C20:1	0.53±0.03	0.51±0.00	0.45±0.03	0.55±0.08	0.46±0.04
C20:2	0.13±0.04	0.20±0.01	0.14±0.01	0.16±0.01	0.10±0.05
C22:0	0.05±0.04	0.05±0.00	0.05±0.00	0.07±0.00	0.07±0.01
C23:0	0.20±0.00	0.20±0.00	0.17±0.01	0.14±0.09	0.19±0.02
C18:3 CLnA (Pünisik)	76.57±0.02	78.51±0.02	59.93±0.62	55.89±0.56	57.73±0.13
C18:3 CLnA (Katalpik)	6.47±0.03	5.46±0.01	6.92±0.14	9.71±0.16	9.02±0.01
C18:3 CLnA (β-eleostearik)	1.45±0.03	1.06±0.00	1.56±0.13	3.36±0.25	2.55±0.05
Toplam doymuş yağ asitleri	4.97±0.07	4.79±0.02	6.52±0.04	6.50±0.17	6.55±0.14
Toplam doymamış konjuge olmayan yağ asitleri	10.53±0.11	10.18±0.04	24.88±1.50	24.50±0.16	24.15±1.39
Toplam CLnA	84.49±0.03	85.03±0.01	68.42±0.30	68.96±0.33	69.30±0.06

* TED: Tespit Edilemeyen Değer



Şekil 4. 6 Rafinasyon Kademeleri Doymuşluk Değişim



Şekil 4. 7 Rafinasyon Kademeleri Konjuge Yağ Asit Değişimi

Nar çekirdeği yağının rafinasyon prosesi çok sert olmayan şartlarda gerçekleştirilse bile, rafine yağ elde edilene kadar ki süreçte yağ asit kompozisyonunda ve konjuge linolenik asit izomerlerinin yüzdelerinde önemli derecede değişimler meydana gelmiştir. Ayrıca; ağartma kademesine kadar sabit bir seyir izleyen doymuş ve doymamış yağ asidi değerleri de, bu kademeden sonra bir miktar artmıştır. Rafinasyon

kademelerinin her birinde yağ asit kompozisyonunda meydana gelen değişimlerin aşağıdaki sebeplerden kaynaklandığı düşünülmektedir:

- ***NaOH ile yapılan nötralizasyon kademesi sonunda;*** *pünisik asit, katalpik asit, β-eleostearik asit* ve *toplam CLnA* değerlerinin sırasıyla % 78.51, % 5.46, % 1.06 ve % 85.03`a ulaştıkları gözlenmiştir. Meydana gelen bu değişimin, nötralizasyon işleminin sıcakta, fosforik asit ve NaOH`li ortamda yapılmasından, sodyum sabunlarına dönüştürülen serbest yağ asitlerinin su ile yıkanarak yağdan uzaklaştırılmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.
- ***Ağartma kademesi sonunda;*** *% pünisik asit* değerinin 59.93`ye düştüğü, *% katalpik asit* değerinin 6.92`ye, *% β-eleostearik asit* değerinin 1.56`ya yükseldiği ve *% toplam CLnA* değerinin 68.42`ye düştüğü gözlenmiştir. Meydana gelen bu değişimin, ağartma toprağının asidik özelliği sebebiyle yağı hidrolize etmesi sonucu oluşan serbest yağ asitlerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca; kullanılan ağartma toprağının, asidik olması ve sıcaklıktan dolayı konjuge yağ asitlerinin polimerizasyona uğradığı, izomerleşmediği ve dönüşüme uğramasından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Konjuge yağ asitlerinin yüzdelerindeki azalmadan dolayı konjuge olmayan doymamış ve doymuş yağ asitlerinin yüzdelerinin arttığı da görülmüştür.
- ***Vinterizasyon kademesi sonunda;*** *% pünisik asit* (c9,t11,c13) değerinin 55.89`a düştüğü, *% katalpik asit* (t9,t11,c13) değerinin 9.71`e ve *% β-eleostearik asit* (c9,t11,t13) değerinin 3.36`ya yükseldiği, *% toplam CLnA* değerinin (68.96) ise değişmeden kaldığı gözlenmiştir. Meydana gelen bu değişimin, vinterizasyon kademesinde düşük sıcaklık uygulanmasından (4-6 ^{o}C) dolayı cis yapıda bulunan yağ asitlerinin daha kararlı bir yapı olan *trans* forma doğru izomerleşmesinden kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.
- ***2. ağartma kademesi sonunda (rafine yağ);*** *% pünisik asit* değeri 57.73`e ve *% katalpik asit* değerinin 9.02`ye yükseldiği, *% β-eleostearik asit* değerinin 2.55`e düştüğü, *% toplam CLnA* değerinin (69.30) değişmediği gözlenmiştir. Meydana gelen bu değişimin, ağartma toprağının asidik etkisi ve sıcaktan dolayı konjuge yağ asitlerinin polimerizasyona uğradığı, izomerleşmediği ve dönüşüme uğramasından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Bu bölümde ayrıca; nar çekirdeği yağının yağ asit kompozisyonu analizinden elde edilen veriler, kendisi gibi özel yağ sınıfında bulunan diğer bazı yağ türlerininki ile, literatürde yer alan bilgiler ışığında karşılaştırılmaya çalışılmıştır (**Çizelge 4. 7).** Kısıtlı düzeyde bilgi edinilebildiği literatür çalışmaları; nar çekirdeği, tung, acı kabak, kadife çiçeği, bourdaine, oregon

üzümü, mahlep ve katalpa yağı gibi yağlarda yüksek oranda konjuge yağ asitlerinin olduğunu doğrulamaktadır (Yücel 2005). Bu yağlarda bulunan konjuge yağ asitlerinden c9,t11,c13-CLnA (*Pünisik asit*), c9,t11,t13-CLnA (*α-eleostearik asit*) ve t9,t11,c13-CLnA (*Katalpik asit*) izomerlerinin, sitotoksidelerinin t8,t10,c12- CLnA (*calendic asit*) izomerinkinden çok daha fazla olduğu yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir (Suzukia ve ark. 2001). **Çizelge 4. 7**`den de görülebileceği gibi; nar çekirdeği yağı ~%85 oranındaki *toplam CLnA* içeriği ile, literatürde yer alan acı kabak (~%60), kadife çiçeği (~%29.5), katalpa (~%27.5) ve mahlep (~%27.6) yağlarından ayrılmaktadır.

Çizelge 4. 7 Nar Çekirdeği Yağının Farklı Yağlar ile Yağ Asit Kompozisyonu Karşılaştırması (%)

	Bu çalışmada	**Yücel 2005**				
Yağ Asitleri	**Nar**	**Nar**	**Acı Kabak**	**Kadife Çiceği**	**Katalpa**	**Mahlep**
16:0	2,5	2,0	1,7	10,2	5,3	4,6
16:1n7	-	-	-	0,1	0,2	0,3
18:0	1,8	1,6	21,1	3,8	2,8	1,8
18:1n9	3,9	3,7	9,2	8,0	13,7	35,4
18:2n6	4,7	3,3	5,8	43,5	41,7	28,5
18:3n3	-	0,1	0,2	1,1	2,1	0,1
20:0	0,4	3,0	0,5	0,7	1,1	0,7
20:1n9	0,5	0,1	1,2	0,2	1,6	0,3
CLnA (toplam)	84,5	86,0	60,0	29,5	27,5	27,6
CLNA (9c,11t,13t) (α-eleostearik asit)	-	-	49,9	-	4,1	21,0
CLNA (9c,11t,13c) (Pünisik asit)	76,6	57,3	-	-	-	-
CLNA (9t,11t,13c) (Katalpik asit)	6,5	7,6	2,2	-	14,9	1,3
CLNA (9t,11t,13t) (β-eleostearik asit)	1,5	21,1	7,9	-	8,5	5,2
CLNA (8t,10t,12c) (calendic asit)	-	-	-	18,3	-	-
CLNA (8t,10t,12t)				11,2		

4.3. Sterol Kompozisyonu Analizleri

Yağların sabunlaşmayan bölümlerinin önemli bir parçasını oluşturan sterollerin, kolon kanseri gelişimini engellediği, kandaki lipid seviyesini düşürdüğü, kızartma yağları için anti-polimerizasyon ajanları olarak kullanıldığı ve kozmetik üreticileri için emülsiyon oluşturucu ve çoğunlukla steroit hormon ilaçlarının üretimi için prokürsör ve ara kaynağı olarak kullanıldığı yapılan birçok çalışmada bildirilmiştir (Christie 2011, Yücel 2006, Sivrikaya 2007). Kaba bir genelleme yapılacak olunursa tipik bir bitki sterol karışımında β-sitosterol, stigmasterol, avenesterol ve campesterol yer almaktadır (Christie. 2011).Vücutta sentezlenemeyen bitki sterollerinin doğal kaynaklarda farklı miktar ve türde bulunduğu bilinmektedir. Bu kaynaklardan biri olan nar çekirdeği yağı diğer çekirdek yağları ile karşılaştırıldığında; ~10000 mg/kg sterol içeriği ile diğer yağlardan ayrılmaktadır (Caligiani 2010). Bu sebeple; nar çekirdeği yağının sterol kompozisyonu, bilinen metotlardan ziyade bu tür özel yağlar için geliştirilecek uygun metotlar kullanılarak belirlenmelidir. Bu amaçla kullanılacak metodun, yağ numunesi üzerinde gerçekleştirilecek ön işlemden gaz kromatografisinde analiz edilmesine kadarki süreçte sterol miktarını doğru ve kesin bir şekilde belirlemesi gerekmektedir. Bu nedenle, sunulan bu tez çalışmasında; nar çekirdeği yağının sterol kompozisyonu analizi için, öncelikle sterol piklerinin yerlerini, cinslerini ve miktarlarını tespit etmek amacıyla analizler GC-MS ve GC-FID`de yürütülmüş, uygun kromatografik şartlar tespit edilerek, her bir rafinasyon kademesinden alınan yağ numunelerinin sterol kompozisyonundaki değişimler belirlenen koşullarda değerlendirilmiştir. Yürütülen incelemelerden elde edilen sonuçlara ilişkin bilgiler, aşağıda ayrı başlıklar altında detaylı bir şekilde sunulmuştur.

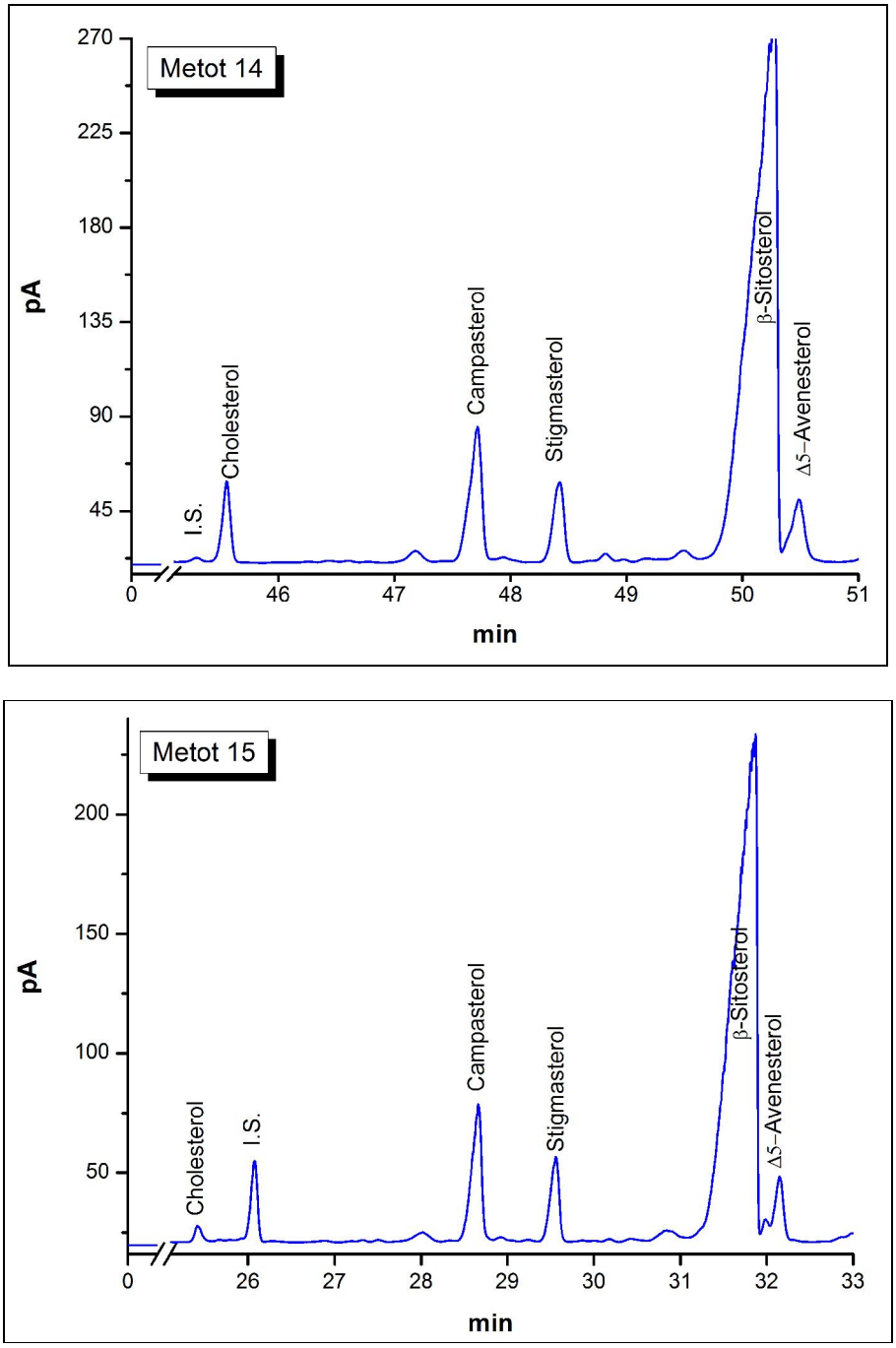
4.3.1. Kromatografik şartların belirlenmesi

GC`de yürütülen sterol kompozisyonu analizlerinde; 1 adet standart metot, literatürde yer alan 11 adet metot ve tarafımızdan değiştirilen (modifiye edilen) 3 adet metot olmak üzere 15 adet metot kullanılmış ve kromatografik ayrımlar için en uygun metot tespit edilmeye çalışılmıştır. Kromatografik ayrımlarda, birbirlerine oldukça yakın çıkan *β-sitosterol* ve *Δ5-avenasterol* ayrımı özellikle dikkate alınmıştır. Kullanılan metotlara ait kromatografik ayırma verim hesaplamalarına dair sonuçlar **Çizelge 4. 8**`da yer almaktadır.

Çizelge 4. 8 Sterol Kompozisyonu Analizi Metot Verim Sonuçları

Metot	İnjektör (°C)	FID (°C)	Akış Hızı	Kolon Fırını °C/min	°C	min	Kromatografik Verim k`	α	N	H	Rs
Metot 1 (Tsape. 2010)	250		0.5 mL/dk		50	1	1.326	0.511	61116.	0.001	0.873
				10	300	20					
				40	310	60					
Metot 3 (Cheikh. 2008)	280	280	1 mL/dk		55	0	0.637	0.522	22839	0.001	0.874
				20	280	40					
Metot 4 (Chiou. 2009)	250	290	0.6 mL/dk		100	0	2.457	0.514	21263	0.001	0.737
				20	300	45					
Metot 5 (Parcerisa 1998)	290	350	75 kPa		210	0	9.875	0.507	64658	0.001	0.867
				6	250	11					
				3	310	12					
Metot 6 (Cherif. 2009)	305	350	1 mL/dk		200	0	9.136	0.506	65812.	0.001	0.800
				3	300	2					
Metot 7 (Ju. 2003)	250		1 mL/dk		40	0	3.434	0.502	62042	0.001	0.227
				5	310	30					
				2	264	5					
				2	294	0					
Metot 9 (COI D.no.10.2001)	280	290	30 cm/s		300	60	1.452	0.555	15236	0.003	0.652
Metot 11 (Xu 2011)	250		1 mL/dk		150	4	2.646	0.506	212906	0.001	0.936
				4	240	2					
				12	310	30					
Metot 12	250	250	1 mL/dk		50	0	4.362	0.506	20290	0.001	0.400
				15	120	0					
				4	300	20					
Metot 13	250		0.5 mL/dk		200	0	1.435	0.505	20743	0.001	0.240
				5	300	20					
Metot 14	250		0.5 mL/dk		100	0	13.3111	1.005	363390	0.0001	0.805
				5	300	20					
Metot 15 (Caligiani 2010)	280		1 mL/dk		80	2	9,009	1.01	151273.9	0.0002	1.246
				15	280	20					

Elde edilen hesaplamalar sonucunda; Metot 15`in *β-sitosterol* ve *Δ5-avenasterol* türlerini ayırmada en etkili metot olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar ışığında; nar çekirdeği yağı gibi yüksek sterol içeriğine sahip yağların sterol kompozisyonu analizinde, kromatografik ayırma metodu olarak Metot 15`in daha uygun olduğu görülmüş ve ileriki çalışmalarda bu metot kullanılmıştır. Çalışmalar sırasında kullanılan bazı metotlara ait kromatogramlar **Şekil 4. 8** de verilmiştir.



Şekil 4. 8 Çalışmalarda Kullanılan Bazı Seçilmiş Metotlara Ait Sterol Kompozisyonu Kromatogramları

Önerilen bir metodun kullanılabilirlik kazanabilmesi için, metodun performansını ve üstünlüğünü gösteren validasyon çalışmalarının gerçekleştirilmesi, bunun yanı sıra; yeni metodun, daha önce kullanımda olan standart metotlarla istatistiksel olarak karşılaştırılması gerekmektedir (Ayyıldız 2010). Bu sebeple; ham nar çekirdeği yağının sterol kompozisyonu içeriğinin tespiti için geliştirilen Metot 15

metodu ile şimdiye kadar kullanılmakta olan standart COI D.no.10 metodu istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

Ham nar çekirdeği yağının sterol kompozisyonu tayini için Metot 15 ve standart metot karşılaştırması yapılırken, t testi dikkate alınmış ve aşağıdaki formüller yardımıyla t değeri hesaplanmıştır. t değerinin hesaplanmasından sonra ise; serbestlik derecesine göre oluşturulmuş tablolardan kritik t değeri bulunmuş ve hesaplanan değerlerle karşılaştırılarak, hipotezlerden metodun uygunluğuna karar verilmiştir.

$$t = \frac{\bar{X}_d - \mu_0}{S_d/\sqrt{N}}$$

t: t testi

$\overline{X}_d$: Farkların Ortalaması

S_d: Farkların Standart Sapması

N: Farkların Sayısı

Metot 15 ve standart metot kullanılarak gerçekleştirilen nar çekirdeği yağının sterol kompozisyonu tayininden elde edilen verilerin karşılaştırılmasında aşağıdaki null ve alternatif hipotezleri kullanılmıştır:

H_0: $\mu_0 = 0$

H_A: $\mu_0 \neq 0$

Oluşturulan hipotezlere göre; H_0, Metot15 ile standart metot verilerine ait ortalamalar arasında anlamlı olarak (%95 güven seviyesinde) bir fark olmadığını ileri sürerken, H_A, Metot 15 ile standart metot verilerine ait ortalamalar arasında anlamlı bir fark olduğunu savunmaktadır.

İki metottan elde edilen deneysel verilerin (**Çizelge 4. 9**) kullanılmasıyla, hesaplanan t değeri: 1.06 olarak, kritik t değeri (tablodan) ise 4.30 olarak belirlenmiştir (p=0.05).

Yukarıdaki bilgiler doğrultusunda, %95 güven seviyesinde H0 hipotezinin reddedilemeyeceği açıkça görülmektedir. Şöyle ki;

t hesaplanan : 1.06 < t kritik : 4.30

olduğundan hesaplanan t değeri, dağılım grafiğinde kabul bölgesine düşmektedir. Bu sebeple; H_0: μ_0 =0 olduğunu ileri süren H_0 hipotezi reddedilemez, yani; Metot 15 ve standart metotdan elde edilen veri gruplarının ortalaması birbirinden anlamlı olarak farklı değildir.

Çizelge 4. 9 COI D.no.10 ve Metot 15 Metotları Kullanılarak Nar Çekirdeği Yağı Numunesi için Hesaplanan Sterol Kompozisyonu Değerleri

mg/kg	COI D.no.10	Metot 15	Fark	
Kolesterol	37	36.5	0.5	$\bar{X}_d$:1.33
Kampasterol	475.3	473.6	1.7	S_d: 0.72
Stigmasterol	259.3	257.5	1.8	

4.3.2. Rafinasyon kademelerindeki değişim

Nar çekirdeği yağı rafinasyon prosesi süresince sterol kompozisyonunda meydana gelen değişimlerin belirlenmesi için yapılan deneylerde, yağ numuneleri sabunlaştırma işleminin ardından trimetilsilil türevlerine dönüştürülmüş ve Metot 15 gaz kromatografisi analiz metodu kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kromatografik ayrımlara örnek teşkil etmesi açısından, rafine nar çekirdeği yağının sterol kompozisyonuna ait kromatogram **Şekil 4. 9**' da verilmiştir. Analizlerde *α-cholestanol* iç standart olarak kullanılmış ve iç standardın bilinen miktarından faydalanılarak, nar çekirdeği numunelerindeki sterol miktarları aşağıdaki formül vasıtasıyla hesaplanmıştır.

$$\textbf{Sterol (ppm)} = \frac{\textbf{Ax} \times \textbf{ms} \times \textbf{1000}}{\textbf{As} \times \textbf{m}}$$

A_x = Sterol pikinin alanı

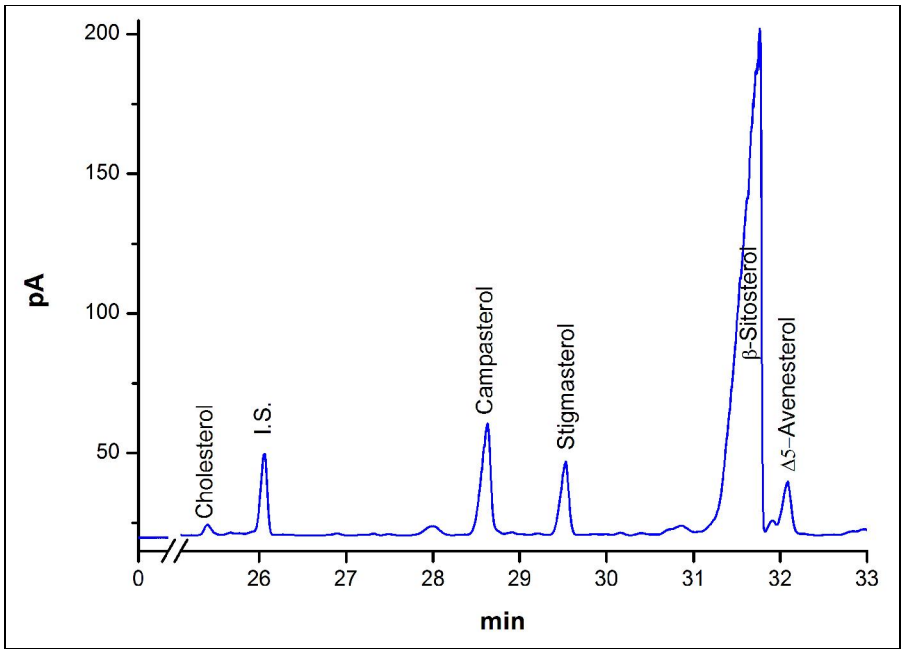
A_s= iç standart pikinin alanı

m_s= eklenen iç standartın miktarı, miligram

m= numune miktarı, gram

Rafinasyon kademelerinden alınan yağ numunelerinin sterol kompozisyonu değerleri Çizelge 4. 10`de özetlenmiştir. Ayrıca, çalışmalarda kullanılan nar çekirdeği yağının yüksek sterol içeriğine sahip bir yağ olması sebebiyle; analiz sonuçları değerlendirilirken *toplam sterol* miktarının yanı sıra, bitkisel yağlarda en fazla bulunan

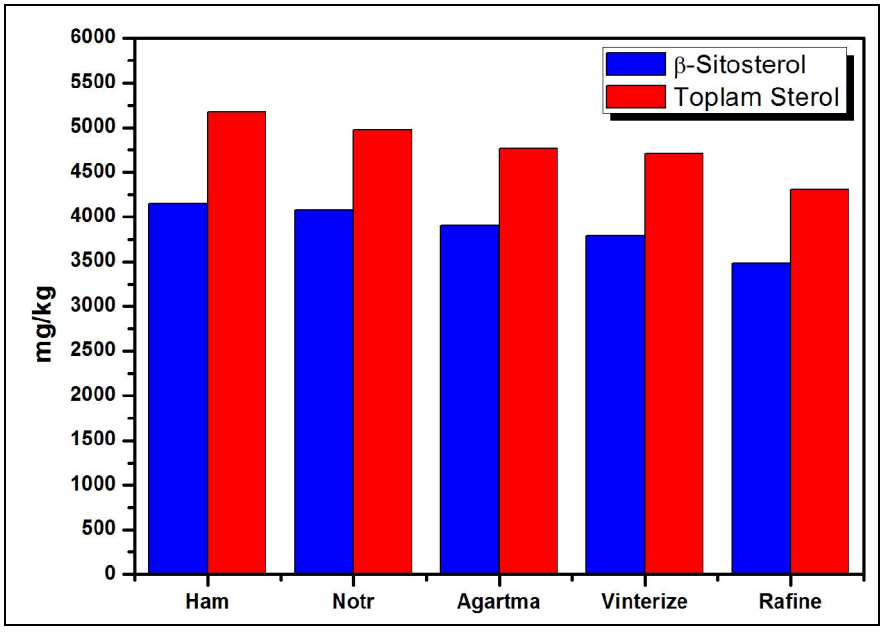
β-sitosterol içeriğinin de rafinasyon kademelerine göre değişimi incelenmiştir (Şekil 4. 10)**.**



Şekil 4. 9 Nar Çekirdeği Yağına Ait Sterol Kompozisyonu Kromatogramı

Çizelge 4. 10 Rafinasyon Kademelerine ait Sterol Kompozisyonu Sonuçları (ppm)

	Kolesterol	**Kampasterol**	**Stigmasterol**	**β- Sitosterol**	**Avenesterol**	**Toplam**
Ham	36.5±0.1	473.6±0.1	257.5±0.2	4154.2±0.1	254.4±0.3	5176.3±0.2
Notr	23.5±0.1	400.9±0.7	220.4±0.2	4083.2±0.1	249.1±0.2	4977.2±0.9
Agartma	31.9±0.1	383.1±0.2	215.3±0.1	3905.9±0.1	229.7±0.1	4765.8±0.4
Vinterize	24.6±0.3	408.1±0.2	237.6±0.2	3797.0±0.2	244.2±0.1	4711.5±0.7
Rafine	26.3±0.5	377.6±0.2	215.4±0.2	3482.2±0.1	212.0±0.0	4313.3±0.6



Şekil 4. 10 Rafinasyon Kademeleri Toplam ve β-sitosterol Değişimi

Rafinasyon boyunca *toplam sterol* ve *β-sitosterol* içeriğinde düzenli bir azalış gözlenmiştir. Rafinasyon kademelerinin her birinde sterol içeriğinde meydana gelen değişimlerin aşağıdaki sebeplerden kaynaklandığı düşünülmektedir:

- ***NaOH ile yapılan nötralizasyon kademesi sonunda;*** *β-sitositerol, kampasterol, stigmasterol* ve *toplam sterol* miktarlarının sırasıyla 4083, 401, 220, 4977 ppm`e düştüğü gözlenmiştir. Meydana gelen bu düşüşler, degumming sırasında fosforik asit ilavesi ve nötralizasyon sırasında kullanılan NaOH`in, glikozit, esterleşmiş ve serbest haldeki sterolleri hidrolize ederek sodyum sabunlarına sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile transferi sonucu yağdan uzaklaştırıldıkları düşünülmektedir. (Verleyen 2002, Verhé 2006, Van Hoed 2006).
- ***Ağartma kademesi sonunda;*** *β-sitositerol, kampasterol, stigmasterol* ve *toplam sterol* miktarlarının sırasıyla 3906, 383, 215, 4766 ppm`e düştüğü gözlenmiştir. Meydana gelen bu değişimin, ağartma toprağının asidik ve katalitik özelliği sebebiyle sterolleri hidrolize etmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. (Verleyen 2002, Verhé 2006, Van Hoed 2006).
- ***Vinterizasyon kademesi sonunda*** *β-sitositerol, kampasterol, stigmasterol* ve *toplam sterol* miktarlarının çok fazla değişmediği görülmektedir. Bu kademede sterol miktarında belirgin bir değişim olmamasının nedeni; sıcaklık, basınç ve katalitik etki

gibi parametrelerin uygulanmadığından ve kristallendirme işlemi dışında herhangi bir işlemin uygulanmamış olmasıdır.

- ***2. ağartma kademesi sonunda (rafine yağ);*** *β-sitositerol, kampasterol, stigmasterol* ve *toplam sterol* miktarlarının sırasıyla 3482, 378, 215, 4313 ppm`e düştüğü gözlenmiştir. Meydana gelen bu azalışa, toprağının asidik ve katalitik etkisi ile birlikte, fazla miktarda süzmeyi kolaylaştırıcı maddenin kullanılmasının neden olduğu düşünülmektedir (Verleyen 2002, Verhé 2006, Van Hoed 2006).

Bu bölümde ayrıca; nar çekirdeği yağının sterol kompozisyonu analizinden elde edilen veriler, diğer bazı yağ türlerininki ile, literatürde yer alan bilgiler ışığında karşılaştırılmaya çalışılmıştır (**Çizelge 4. 11).** Kısıtlı düzeyde bilgi edinebildiği literatür çalışmaları; nar çekirdeği, zeytin, mısır, soya ve ayçiçeği yağı gibi yağlarında yüksek oranda sterollerin olduğunu doğrulamaktadır (Caligiani 2010, Christie 2011). **Çizelge 4. 11**`de görüldüğü gibi, nar çekirdeği yağı ~5177 ppm *toplam sterol* içeriği ile, literatürde yer alan, zeytin (~1439 ppm), soya (~3600 ppm) ve ayçiçek (~3878 ppm) yağlarından ayrılmaktadır.

Çizelge 4. 11 Nar Çekirdeği Yağının Farklı Yağlar ile Sterol Miktarı Karşılaştırması (ppm)

	Bu Çalışmada	**Caligiani 2010**	**Habibnia 2012**	**Christie 2011**			
	Nar	**Nar**	**Nar**	**Mısır**	**Ayçiçek**	**Zeytin**	**Soya**
kolesterol	37	-	20	-	-	-	-
kampesterol	474	1073	459	2691	313	28	720
stigmasterol	258	304	165	702	313	14	720
β-sitosterol	4154	8069	4596	7722	2352	1310	1908
Δ5-avenasterol	254	640		468	156	29	108
Δ7-stigmastenol	-	-		117	588	58	108
Δ7-avenasterol	-	-		-	156	-	36
brassicasterol	-	-		-	-	-	-
Toplam	5177	10086	5239	11700	3878	1439	3600

4.4. Vaks Analizleri

Uzun zincirli yağ asitleri ile alkollerin esterleşmesi sonucu oluşan vakslar (genellikle C36-C50), bitkisel sıvı yağlarda oldukça az miktarda bulunmakla birlikte, bu bileşiklerin yağların donma noktasını düşürdükleri, kristal yapı oluşturdukları, ışık geçirgenliğini ve çözünürlüğü azalttıkları bilinmektedir (Christie. 2011, Martini 2000). Bu nedenle bu yağ harici maddelerin yağlardan uzaklaştırılması gerekmektedir. Sunulan bu tez çalışmasında; nar çekirdeği yağının vaks kompozisyonu analizi için, Uluslar arası Zeytinyağı Konseyinin (COI) Doc. No. 18 resmi metodu kullanılarak, her bir rafinasyon

kademesinden alınan nar çekirdeği yağı numunelerinin vaks kompozisyonundaki değişimler belirlenen koşullarda değerlendirilmiştir.

Analizlerde vakslara ait piklerin tespiti için ayçiçeği ve zeytinyağlarının vaks kompozisyonlarından yararlanılmıştır. Bu yağlara ait kromatogramlar **Şekil 4. 11**`de ve elde edilen kromatografik ayrımlara örnek teşkil etmesi açısından, rafine nar çekirdeği yağının vaks kompozisyonuna ait kromatogram **Şekil 4. 12**' de verilmiştir. Analizlerde *lauryl arachidate* iç standart olarak kullanılmış ve iç standardın bilinen miktarından faydalanılarak, nar çekirdeği numunelerindeki vaks miktarları aşağıdaki formül vasıtasıyla hesaplanmıştır.

$$\textbf{Vaks Esteri (ppm)} = \frac{\textbf{Ax} \times \textbf{ms} \times \textbf{1000}}{\textbf{As} \times \textbf{m}}$$

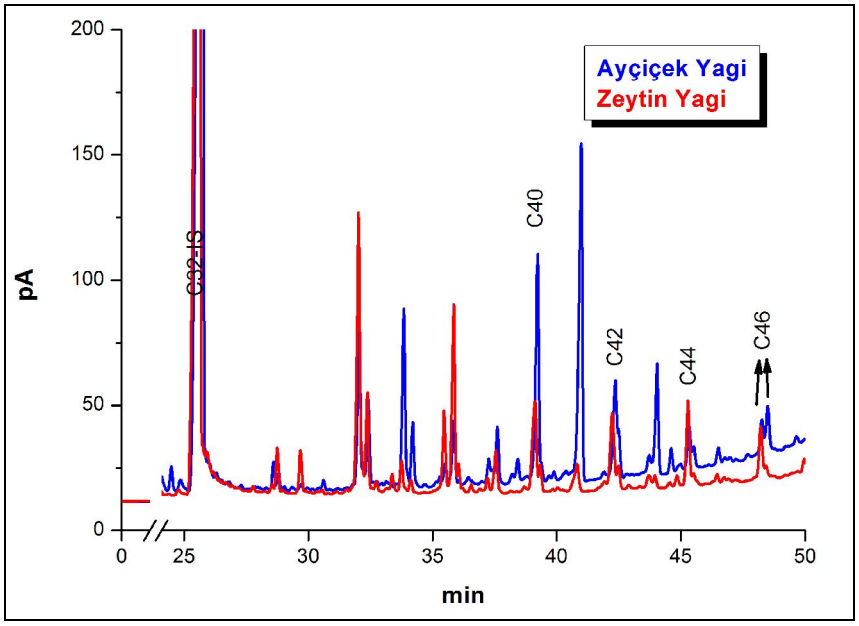
A_x = vaks pikinin alanı

A_s= iç standart pikinin alanı

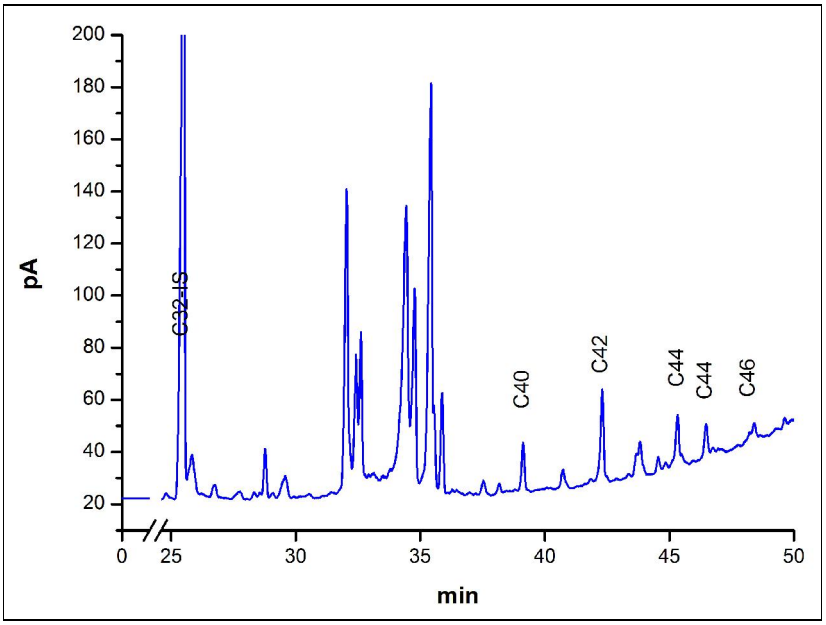
m_s= eklenen iç standartın miktarı, miligram

m= numune miktarı, gram

Rafinasyon kademelerinden alınan yağ numunelerinin vaks kompozisyonu değerleri **Çizelge 4. 12**`da, toplam vaks içeriğinin rafinasyon kademelerine göre değişimi de **Şekil 4. 13**`de yer almaktadır.



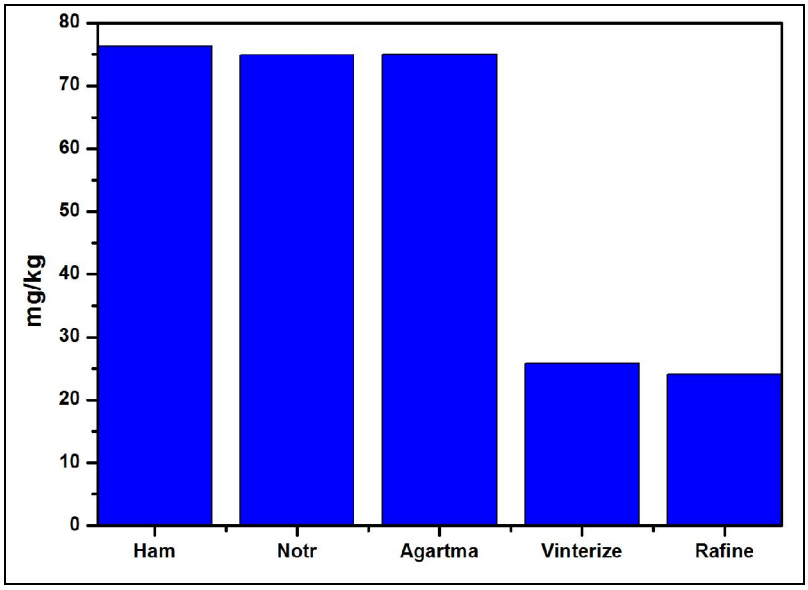
Şekil 4. 11 Ayçiçek ve Zeytinyağlarına ait Vaks Kompozisyonu Kromatogramı



Şekil 4. 12 Nar Çekirdeği Yağı Vaks Kompozisyonu Kromatogramı

Çizelge 4. 12 Rafinasyon Kademelerine ait Vaks Kompozisyonu Sonuçları (ppm)

	C_{40}	C_{42}	C_{44}	C_{46}	Toplam
Ham	14.2 ±0.2	29.5±0.7	25.2±0.6	7.5±0.5	76.4±1.7
Notr	13.8±0.3	29.6±1.6	25.4±0.6	6.1±0.1	74.9±1.8
Agartma	18.1±0.0	32.0±1.4	32.6±1.5	17.3±0.3	75.0±3.2
Vinterize	4.4±0.2	8.6±0.2	8.3±0.6	4.6±0.3	25.8±0.5
Rafine	4.2±0.2	7.8±0.4	7.9±0.4	4.2±0.3	24.1±1.17



Şekil 4. 13 Rafinasyon Kademeleri Toplam Vaks Miktarı Değişimi

Nar çekirdeği yağında bulunan vaksların; rafinasyon sırasında vinterizasyon kademesine kadar az miktarda, vinterizasyon kademesinde ise oldukça fazla miktarda uzaklaştığı gözlenmiştir. Rafinasyon kademelerinin her birinde meydana gelen vaks miktarında değişimlerin aşağıdaki sebeplerden kaynaklandığı düşünülmektedir:

- ***NaOH ile yapılan nötralizasyon kademesi sonunda;*** *toplam vaks* miktarının, 74.9 ppm`e düştüğü gözlenmiştir. Meydana gelen bu değişimin, nötralizasyon işleminin fosforik asit ve NaOH li ortamda yapılmasından, hidroliz sonucu sodyum sabunlarına dönüştürülen vaks esterlerinin su ile yıkanarak yağdan uzaklaştırılmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.
- ***Ağartma kademesi sonunda;*** *toplam vaks* miktarının değişmediği görülmektedir. Bu kademede vaks miktarında belirgin bir değişim olmamasının nedeni; bu basamağın sıcakta gerçekleştirilmesi, dolayısıyla yağda bulunan bu maddelerin ağartma toprağı ile her hangi bir etkileşimde bulunmamasıdır.
- ***Vinterizasyon kademesi sonunda;*** *toplam vaks* miktarının 25.8 ppm`e düştüğü gözlenmiştir. Meydana gelen bu değişimin, düşük sıcaklıkta (4^oC) gerçekleştirilmesinden ve vinterizasyon kademesinde kullanılan çekirdek oluşumunu hızlandırarak vaksları daha büyük kristaller halinde çökmesine yardımcı olan çekirdek oluşturucu malzemeden kaynaklandığı düşünülmektedir.
- ***2. Ağartma kademesi sonunda (rafine yağ);*** *toplam vaks* miktarının çok fazla değişmediği görülmektedir. Bu kademede vaks miktarında belirgin bir değişim olmamasının nedeni; ağartma kedemesinde açıklandığı gibi bu kademede de vaksları uzaklaştıracak proses parametresi bulunmamasıdır.

Bu bölümde ayrıca; nar çekirdeği yağının vaks kompozisyonu analizinden elde edilen veriler, diğer bazı yağ türlerininki ile karşılaştırılmaya çalışılmıştır. **Çizelge 4. 13**`den de görülebileceği gibi; nar çekirdeği yağı ~77 ppm toplam vaks içeriği ile, yüksek vaks içeriğine sahip sızma zeytinyağı (~248 ppm) ve ham ayçiçek(~248 ppm) yağlarından ayrılmaktadır.

Çizelge 4. 13 Nar Çekirdeği Yağının Farklı Yağlar ile Vaks Miktarı Karşılaştırması (ppm)

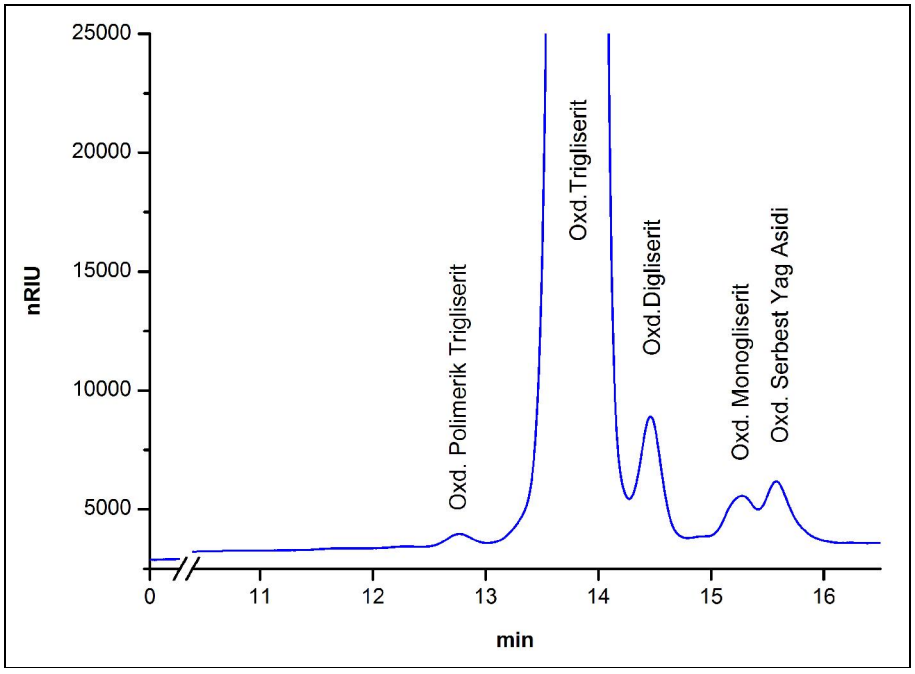
mg/kg	Nar	Rafine nar	Sızma ZeytinYağı	Ham Ayçiçek Yağı
C40	14.23	4.16	68.65	32.22
C42	29.51	7.78	62.01	132.52
C44	25.16	7.92	41.62	55.50
C46	7.48	4.22	25.42	27.45
Toplam	76.37	24.07	247.68	247.68

4.5. Polar ve Polimerik Madde Tayinleri

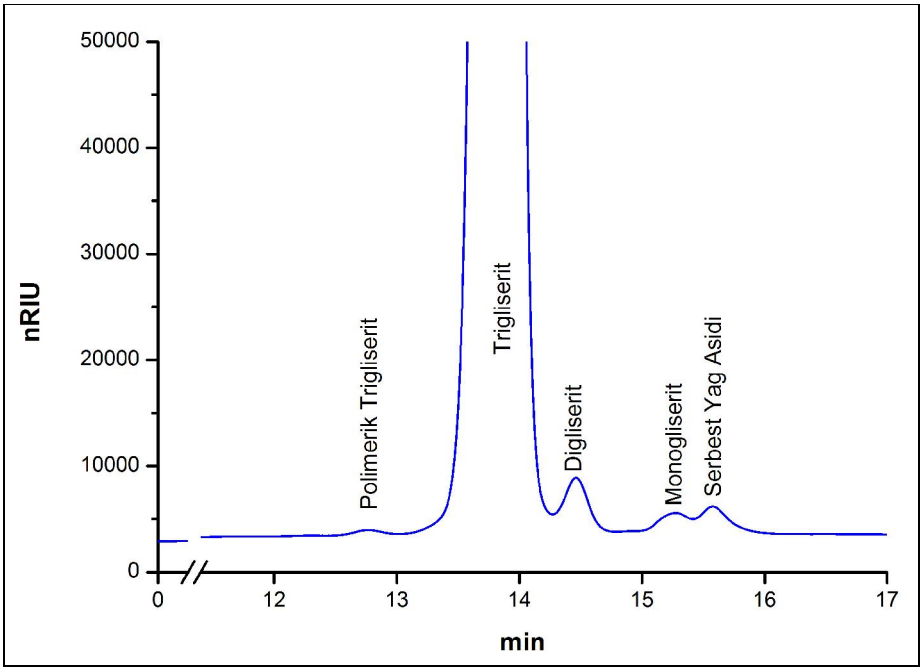
Trigliseritlerin, oksijen, sıcaklık ve rafinasyon basamaklarında kullanılan yardımcı maddelerin katalizörlüğünde oluşan, yağların tüketilebilirliğini azaltan ve bozunma ürünlerinden olan polar ve polimerik maddeler; Yüksek Performanslı Boyut Eleme Kromatografi (HPSEC) tekniği kullanılarak, yağda bulunan polimerleşmiş triaçilgliseroller (PTGs), triaçilgliseroller (TGs), diaçilgliseroller (DGs), monoaçilgliseroller (MGs) ve serbest yağ asitlerinin (FFAs) direk ya da ön işlem uygulanarak analizleri gerçekleştirilmektedir (Arslan 2009). Sunulan bu tez çalışmasında; nar çekirdeği yağında bulunan polar ve polimerik maddelerin miktarlarının rafinasyon kademelerine göre değişimleri direk enjeksiyonlu HPSEC ve ön ayırmalı gravimetrik – HPSEC metodlar kullanılarak incelenmiş ve elde edilen sonuçlara ilişkin bilgiler, aşağıda ayrı başlıklar altında detaylı bir şekilde sunulmuştur.

4.5.1. Polar ve apolar madde tayini (ön ayırmalı prosedür)

Yağdaki *polar* ve *apolar* maddelerin adsorpsiyon kromatografisi ile fraksiyonlarına ayrılmasını, daha sonra da bu fraksiyonlar içinde bulunan türlerin HPSEC tekniği ile tespit edilmesini içeren metotta; fraksiyon ayırma denemeleri silikajel sabit fazı kullanılarak gerçekleştirilmiş, petrol eteri-dietil eter karışımı ve dietil eter kullanılarak kolondan önce *apolar* daha sonra da *polar* türlerin elüe edilmesi sağlanmıştır. Elüsyon işlemleri sonunda elde edilen *polar* ve *apolar* fraksiyonlar içinde bulunan türlerin tespiti ise HPSEC kromatografi tekniği uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kromatografik ayrımlara örnek teşkil etmesi açısından, rafine nar çekirdeği yağının *polar* ve *apolar* fraksiyonlara ait kromatogramlar **Şekil 4. 14** ve **Şekil 4. 15**' de verilmiş, bu fraksiyonların kalitatif analiz sonuçları ve adsorpsiyon kromatografisinden elde edilen fraksiyonların HPSEC`de analizlerine ilişkin elde edilen sonuçlar ise **Çizelge 4. 14**'de özetlenmiştir. Toplanan fraksiyonlar içinde yer alan türlerin rafinasyon kademelerine göre değişimleri ise **Şekil 4. 16**`de ve **Şekil 4. 17**`da yer almaktadır.



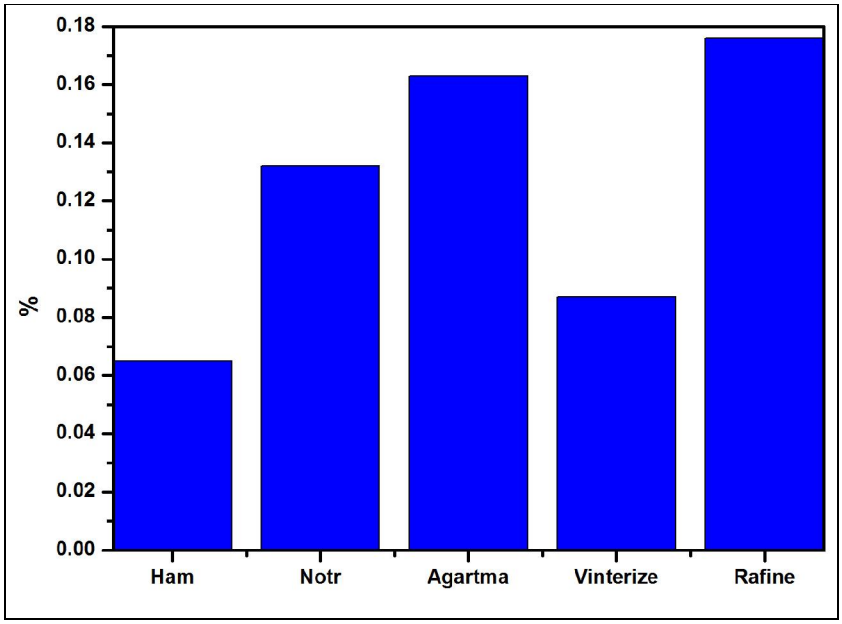
Şekil 4. 14 Polar Fraksiyon Toplam Polimerik Madde (hareketli faz; 1.0 mL/dk tetrahidrofuran, sıcaklık; 30 °C, dedektör; refraktifindeks 30 °C)



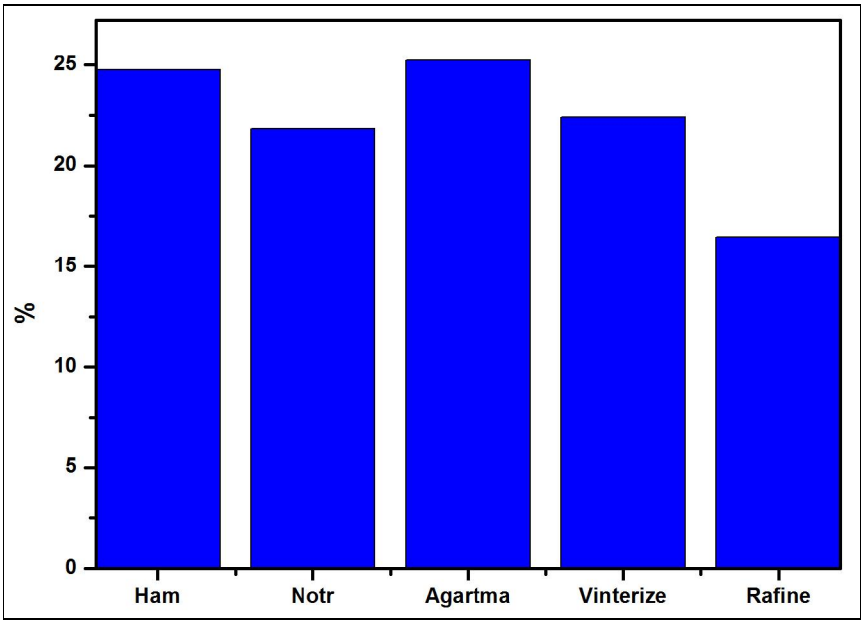
Şekil 4. 15. Apolar Fraksiyon Toplam Polimerik Madde (hareketli faz; 1.0 mL/dk tetrahidrofuran, sıcaklık; 30 °C, dedektör; refraktifindeks 30 °C)

Çizelge 4. 14 Polar ve Apolar Fraksiyonların Kantitatif Analiz ve Toplam Polimerik Madde Miktarları

	Apolar Fraksiyon						Polar Fraksiyon					
	%	PTGs	TGs	DGs	MGs	FFA	%	PTGs	ox TGs	DGs+ ox DGs	MGs+ ox MGs	FFA
Ham	83.1±0.4	0.1±0.1	98.8±0.1	0.8±0.1	0.3±0.1	0.1±0.1	16.9±0.4	24.7±0.1	58.5±0.1	9.4±0.1	0.6±0.1	6.8±0.1
Nötr	84.8±0.3	0.1±0.1	98.0±0.1	1.0±0.1	0.4±0.1	0.6±0.1	15.2±0.3	21.8±0.1	58.2±0.1	11.8±0.1	0.5±0.1	7.6±0.1
Ağartma	88.0±0.3	0.2±0.1	97.7±0.1	0.8±0.1	0.4±0.1	0.9±0.1	12.0±0.3	25.2±0.1	60.8±0.1	8.9±0.1	0.3±0.1	4.8±0.1
Vinterize	85.1±0.5	0.1±0.1	98.9±0.1	0.8±0.1	0.4±0.1	0.5±0.1	14.9±0.5	22.4±0.1	57.5±0.1	11.9±0.1	0.4±0.1	7.8±0.1
Rafine	78.9±0.2	0.2±0.1	98.4±0.1	0.8±0.1	0.3±0.1	0.2±0.1	21.1±0.2	16.5±0.1	69.3±0.1	8.0±0.1	0.5±0.1	5.8±0.1



Şekil 4. 16. Apolar Fraksiyon Polimerik Madde Miktarı



Şekil 4. 17 Polar Fraksiyon Polimerik Madde Miktarı

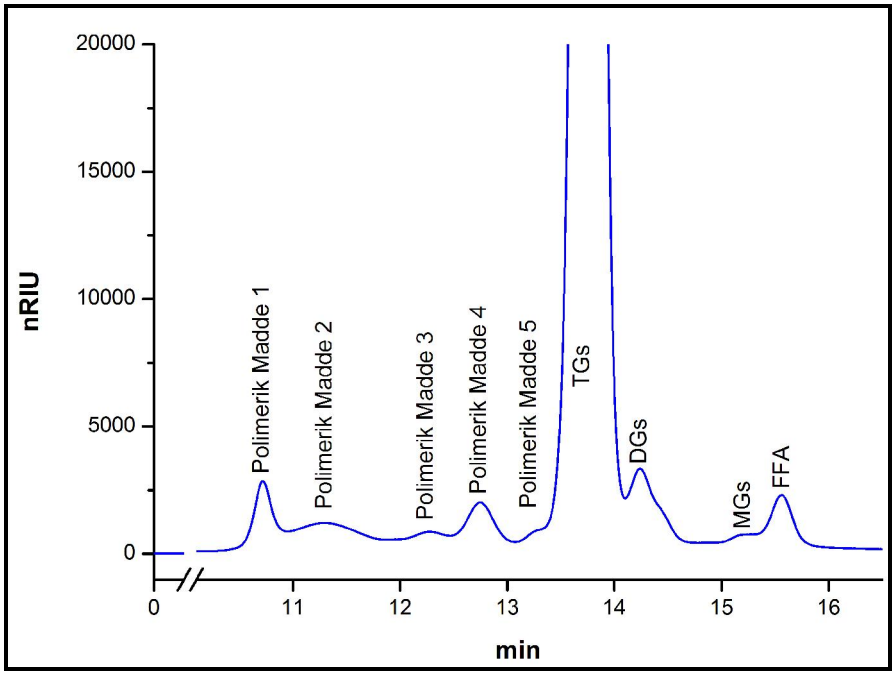
Rafinasyon boyunca polar ve apolar fraksiyon içerisindeki türlerin miktarında sürekli bir değişim gözlenmiş; toplam polimerik madde miktarı ağartma kademesinde en yüksek değere ulaşırken, daha sonraki kademelerde bu değerlerde azalma gözlenmiştir.

4.5.2. Toplam polimerik madde tayini (direk enjeksiyonlu prosedür)

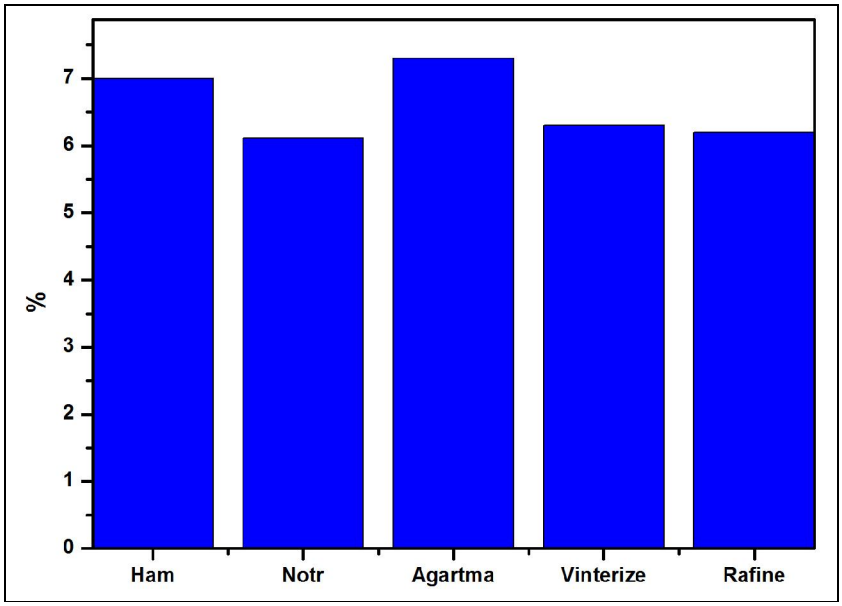
THF çözülen nar çekirdeği yağının direk olarak HPSEC cihazına enjeksiyonunu içeren metotta, sabit faz olarak birbirine seri bağlı 100 A° ve 500 A°`luk PL-Gel (30 cm x 7,6 mm i.d., 5 µm) kolonları, hareketli faz olarak ise THF kullanılmış ve yağ içerisinde bulunan polar ve polimerik maddelerin boyut eleme esasına göre kolondan çıkmaları sağlanmıştır. Söz konusu maddelerin kolondan çıkış sırası; büyük molekül ağırlığından küçük molekül ağırlığına doğru *(polimerik trigliserit > trigliserit > digliserit > monogliserit > FFA)* şeklindedir. Elde edilen kromatografik ayrımlara örnek teşkil etmesi açısından, rafine nar çekirdeği yağının toplam polimerik madde tayinine ait kromatogram Şekil 4. 18' de verilmiş, diğer rafinasyon kademelerinden alınan yağ numunelerinin toplam polimerik madde değerleri ise **Çizelge 4. 15**`de özetlenmiştir. Ayrıca, rafinasyon süresince yağın toplam polimerik madde miktarlarında meydana gelen değişim ise **Şekil 4. 19**`de yer verilmiştir.

Çizelge 4. 15 Toplam Polimerik Madde Miktarı

	Pol. Mad. 1	Pol. Mad. 2	Pol. Mad. 3	Pol. Mad. 4	Pol. Mad. 5	TGs	DGs	MGs	FFA	Σ Pol. Mad.
Ham	1.9±0.1	2.4±0.1	0.9±0.1	1.3±0.1	0.6±0.1	88.7±0.1	2.5±0.1	0.5±0.1	1.3±0.1	7.0±0.1
Nötr	0.9±0.1	2.5±0.1	0.9±0.1	1.3±0.1	0.5±0.1	89.5±0.4	2.6±0.1	0.4±0.1	1.3±0.1	6.1±0.1
Ağartma	1.2±0.1	2.8±0.1	1.1±0.1	1.6±0.1	0.7±0.1	88.0±0.1	2.8±0.1	0.4±0.1	1.5±0.1	7.3±0.1
Vinterize	1.7±0.1	2.1±0.1	0.7±0.1	1.2±0.1	0.6±0.1	88.7±0.1	2.9±0.1	0.4±0.1	1.7±0.1	6.3±0.1
Rafine	1.5±0.1	1.9±0.1	0.8±0.1	1.6±0.1	0.4±0.1	89.3±0.1	2.6±0.1	0.4±0.1	1.4±0.1	6.2±0.1



Şekil 4. 18 Toplam Polimerik Madde (Hareketli faz; 1.0 mL/dk THF, 30 °C, RID 30 °C, Kolon; PL-Gel 100 A° (30 cm x 7,6 mm x 5µm), PL-Gel 500 A° (30 cm x 7,6 mm x 5 µm))



Şekil 4. 19 Toplam Polimerik Madde Miktarı

Rafinasyon boyunca farklı polimerleşme derecelerine sahip polimerlerin oluştuğu ve polimerik madde miktarında sürekli bir değişimin olduğu gözlenmiş; toplam polimerik madde miktarı ağartma kademesinde en yüksek değere ulaşırken, daha sonraki kademelerde bu değerlerde azalma gözlenmiştir. Rafinasyon kademelerinin her birinde meydana gelen polimerik madde miktarlarındaki değişimlerin aşağıdaki sebeplerden kaynaklandığı düşünülmektedir:

- ***NaOH ile yapılan nötralizasyon kademesi sonunda;*** *toplam polimerik madde* miktarının % 6,12`ye düştüğü gözlenmiştir. Meydana gelen bu değişimin, yüksek sıcaklıkta, fosforik asit ve NaOH`li ortamda gerçekleştirilen nötralizasyon işleminin, yağdaki polimerik maddeleri parçalamasından ve bu maddelerin işlem sonunda sabunlarla birlikte yağdan uzaklaştırılmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.
- ***Ağartma kademesi sonunda;*** *toplam polimerik madde* miktarının % 7,30`e yükseldiği gözlenmiştir. Bu yükselişin, sıcaklığın yanı sıra, ağartma toprağının sahip olduğu katalitik etkiden kaynaklandığı düşünülmektedir.
- ***Vinterizasyon kademesi sonunda;*** *toplam polimerik madde* miktarının % 6,28`e düştüğü gözlenmiştir. Meydana gelen bu değişimin, düşük sıcaklıkta (4-6 ^{o}C) gerçekleştirilen vinterizasyon kademesinde, polimerik maddelerin vakslarla birlikte çöktürülerek kristallenmiş olabileceğinden kaynaklandığı düşünülmektedir.
- ***2. Ağartma kademesi sonunda (rafine yağ);*** proses parametreleri göz önünde bulundurulduğunda artması beklenen polimerik madde miktarında çok belirgin bir

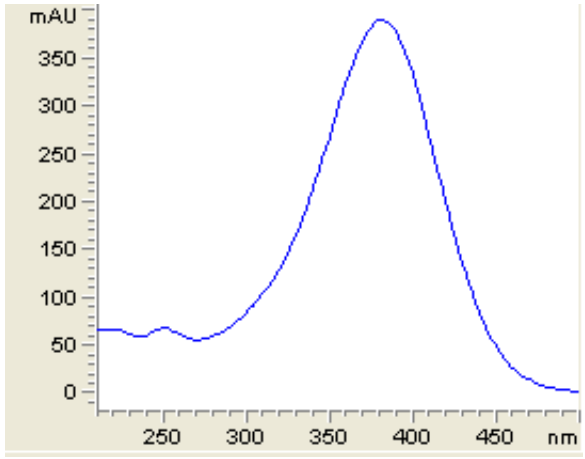
değişim olmamış, aksine *toplam polimerik madde* miktarında az da olsa bir düşüş gözlenmiştir (% 6,18). Beklenilenin tersine gelişen bu durumun, 2. Ağartma kademesinde kullanılan süzmeyi kolaylaştırıcı madde (~%50 oranında) tarafından yağdaki polimerik maddelerin adsorplanması neticesinde meydana geldiği düşünülmektedir.

4.6. Vitamin ve Tokoferol – Tokotrienol Analizi

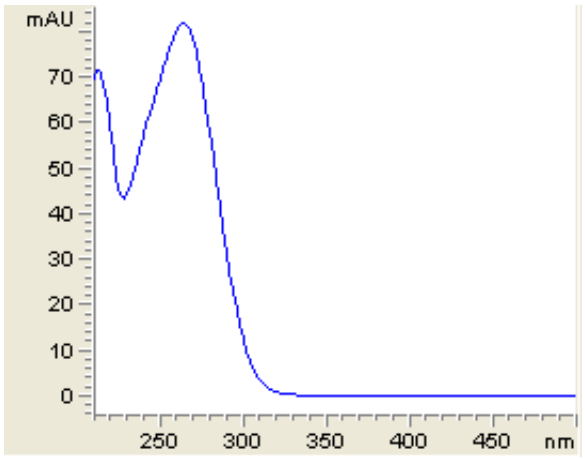
Yapılan birçok çalışma; *vitaminlerin (A,D,K) ve tokoferol-tokotrienollerin (tokollerin)* antioksidan özellik göstermeleri sebebiyle, canlılardaki hücre ve organların düzgün çalışabilmesi açısından önemli fonksiyonlara sahip olmalarının yanı sıra bu özellikleri sebebiyle yemeklik yağların raf ömürlerini arttırarak yağları oksidasyona karşı dirençli kılan önemli biyoaktif maddeler oldukları öne sürülmektedir (Çoban 2007, İreş 2009, Bilber 2010, Gökhan 2005, Bozkurt 2005, Doğan 2005, Gürbüz 2006 Uncu 2008, Chuna 2006, Kamal-Eldin 2000, Ghosh 2009). Vücutta sentezlenemediği için elzem olarak adlandırılan bu antioksidanların doğal *vitamin* ve *tokol* kaynağı olan bitkisel yağlarda farklı miktarlarda bulundukları bilinmektedir. Bitkisel yağların vitamin ve tokol içerikleri, yağda bulunan her bir vitamin türü için farklı metotların kullanılmasıyla tespit edilmektedir. Vitamin ve tokol içeriği bakımından zengin bir kaynak olduğu düşünülen nar çekirdeği yağının vitamin ve tokol içeriğinin belirlenmesinde; diğer çalışmalardakinin aksine, vitamin ve tokol türlerinin hepsi simultane (eş zamanlı) olarak belirlenmeye çalışılmıştır. Sunulan bu tez çalışmasında; nar çekirdeği yağının vitamin ve tokol analizi için, uygun dedektör ve dalga boyu ile uygun kromatografik şartlar tespit edilerek, her bir rafinasyon kademesinden alınan yağ numunelerinin vitamin ve tokol miktarındaki değişimler belirlenen koşullarda değerlendirilmiştir. Yürütülen incelemelerden elde edilen sonuçlara ilişkin bilgiler, aşağıda ayrı başlıklar altında detaylı bir şekilde sunulmuştur.

4.6.1. Uygun dedektör ve dalga boylarının tespiti

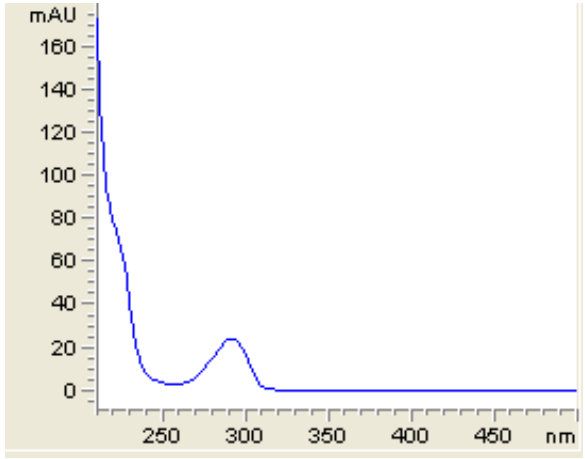
HPLC tekniği ile gerçekleştirilen vitamin ve tokol analizlerinde, vitaminlerin miktarında meydana gelen değişimlerin yüksek kesinlik ve doğrulukta tespit edilebilmesi amacıyla; diyod array (DAD) ve floresans dedektörlerde (FLD) dalga boyu tarama çalışmaları gerçekleştirilmiştir. 10 ppm derişimlerde hazırlanmış vitamin standartlarının DAD ve Florimetriden elde edilen spektrumlar **Şekil 4. 20** ve **Şekil 4. 21**`de yer almaktadır.



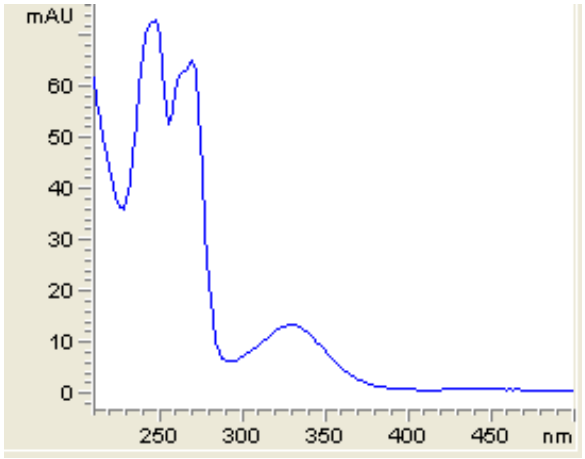
VİTAMİN A



VİTAMİN D3

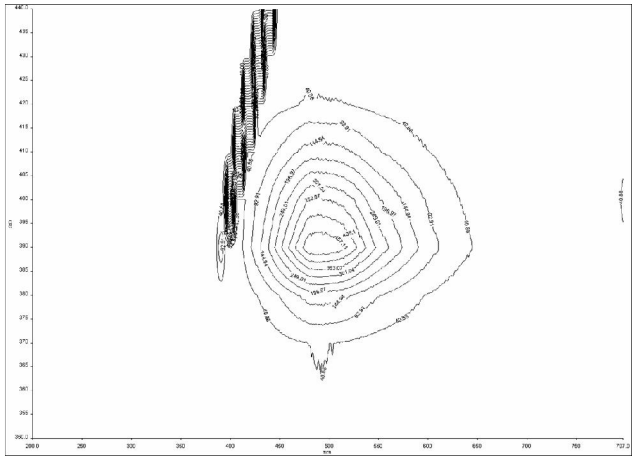


VİTAMİN E

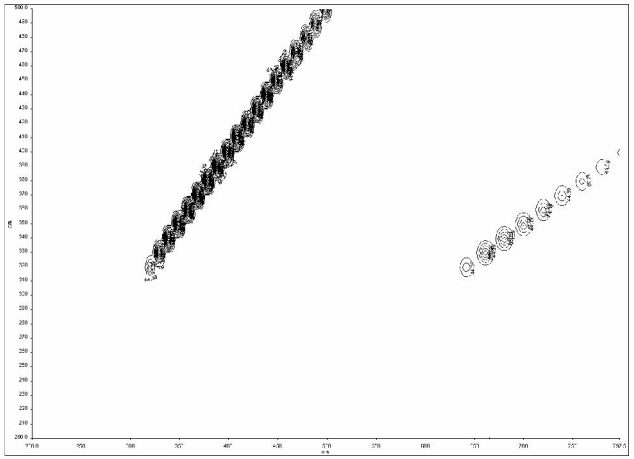


VİTAMİN K3

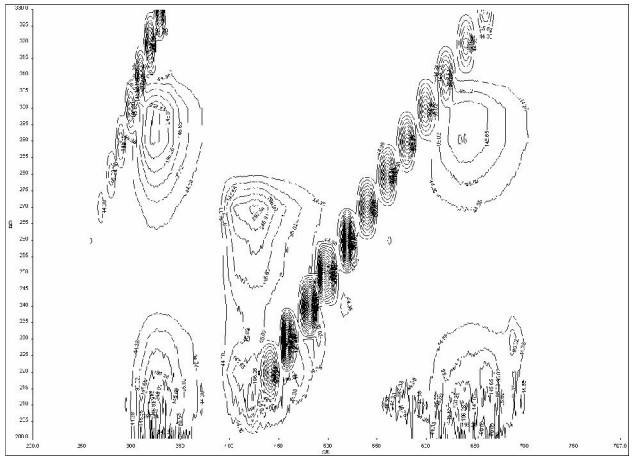
Şekil 4. 20 Vitaminlerin UV-Vis Spektrumları



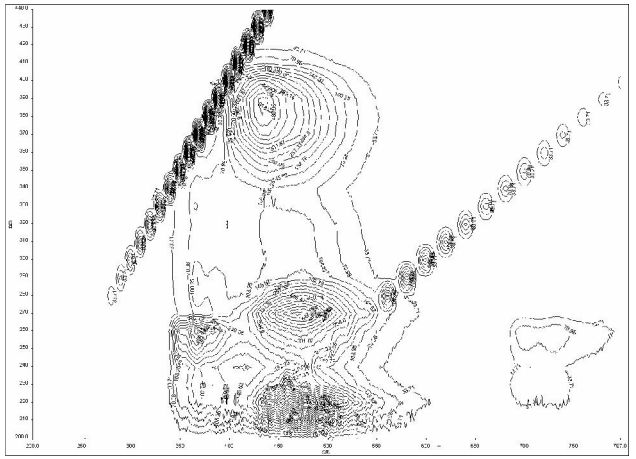
VİTAMİN A



VİTAMİN D3



VİTAMİN E



VİTAMİN K3

Şekil 4. 21 Vitaminlerin Floresans Spektrumları

DAD dedektör kullanılarak elde edilen spektrum tarama sonuçlarına göre, *vitamin A, vitamin D, vitamin E* ve *vitamin K* için en yüksek absorbans değerlerinin sırasıyla; 380 nm, 280 nm, 280 nm ve 246 nm olduğu tespit edilmiş ve bundan sonraki deneylerde belirtilen dalga boylarında çalışılmıştır.

Floresans dedektör ile gerçekleştirilen uyarma ve emisyon dalga boyu tespit çalışmaları sonucunda ise, *vitamin A, vitamin D, vitamin E* ve *vitamin K* için en yüksek uyarma ve emisyon değerlerinin sırasıyla; 328/500 nm, 228/340 nm, 295/330 nm ve 243/430 nm olduğu tespit edilmiş ve bundan sonraki deneyler bu dalga boylarında çalışılmıştır. Uygun dalga boyu tespit çlışmalarından elde edilen sonuçlar **Çizelge 4. 16**'de yer almaktadır.

Çizelge 4. 16 Vitamin ve Tokol Tayinleri için Dalga Boyu Değerleri (10 mg/L)

Vitamin,	DAD		FLD		
	λ_{max} (nm)	mAU	λ_{Ext} (nm)	λ_{Em} (nm)	Lu
Vitamin A	380	385	328	500	498
Vitamin D3	280	82	228	340	5
Vitamin E	280	25	295	330	307
Vitamin K3	246	74	270	475	20

Yapılan dedektör ve dalga boyu çalışmalarından elde edilen sonıuçlar doğrultusunda; Vitamin E ve A için absorbans şiddetlerinin luminesans değerlerinden düşük olduğundan, vitamin E ve A analizleri floresans dedektör kullanılarak, vitamin D ve K için absorbans şiddetlerinin luminesans değerlerinden yüksek olduğundan vitamin D ve K analizleri UV-Visible dedektör kullanılarak gerçekleştirilmeye çalışılmıştır.

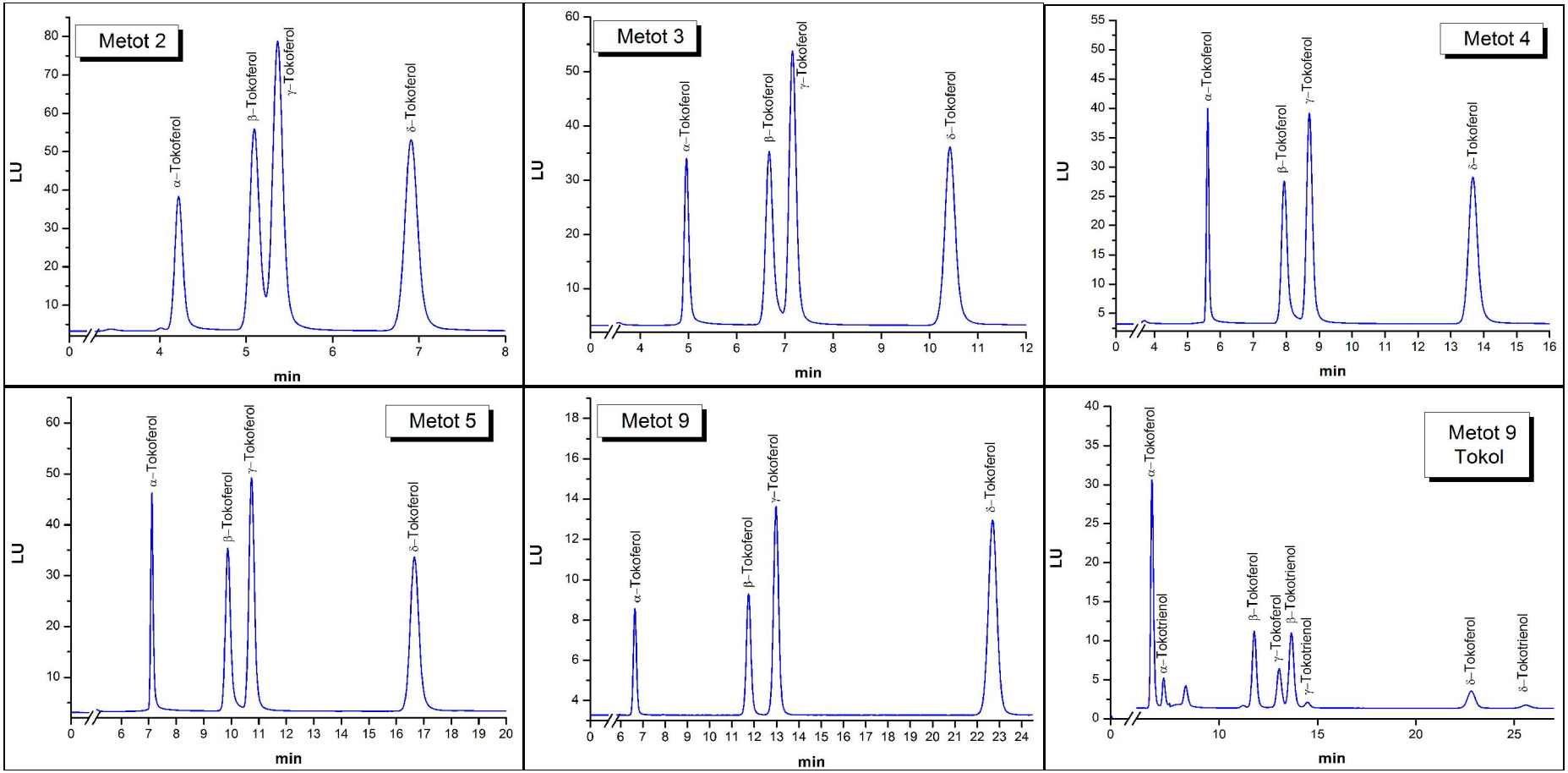
4.6.2 Kromatografik şartların belirlenmesi

HPLC`de yürütülen *vitamin* ve *tokol* analizlerinde; standart metotlar yerine, tarafımızdan geliştirilen 9 adet metot kullanılmış ve kromatografik ayrımlar için en uygun metot tespit edilmeye çalışılmıştır. Analizler standart metotlar kullanılarak gerçekleştirildiğinde; bahsedilen vitaminler ve tokoller için ayrı ayrı metotlar kullanmak gerekmektedir. Kromatografik ayırımlarda *β-* ve *γ-tokoferol* türlerinin ayrımı özellikle dikkate alınmıştır. Kullanılan metotlara ait kromatografik ayırma verim hesaplamalarına dair sonuçlar **Çizelge 4. 17**`de yer almaktadır.

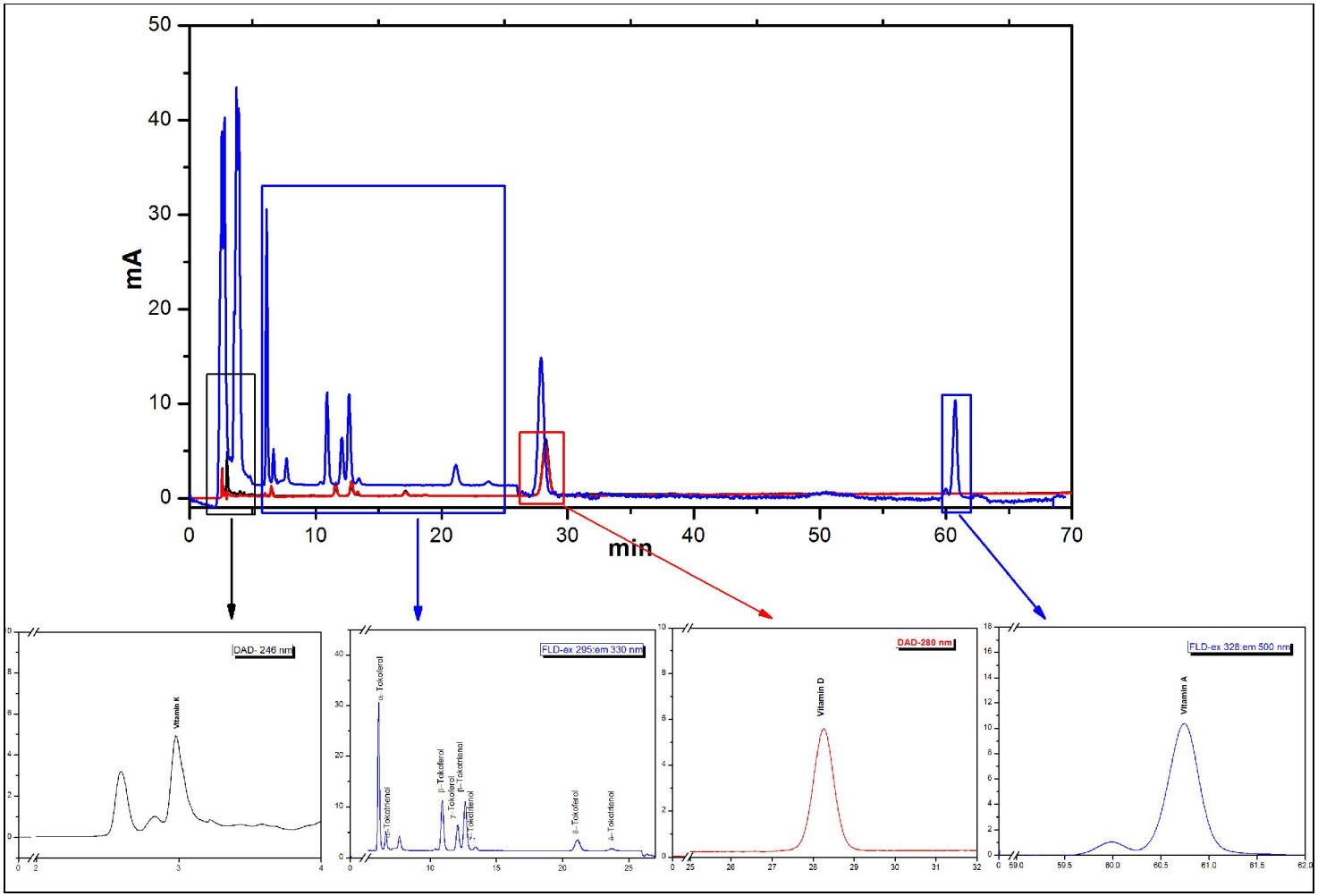
Çizelge 4. 17 Vitamin ve Tokol Analiz Metotları Kromatografik Verim Sonuçları

	Hekzan (%)	**İzo Propil Alkol (%)**	**Akış hızı (mL/min)**	**k`**	**α**	**N**	**H**	**Rs**
Metot 1	98	2	1	0.5	0.57	2600	0.00010	0.7
Metot 2	99	1	1	0.8	0.56	9098	0.00003	1.2
Metot 3	99.3	0.7	1	1.4	0.56	8496	0.00003	1.7
Metot 4	99.4	0.6	1	1.8	0.57	8808	0.00003	2.3
Metot 5	99.4	0.6	0.75	1.6	0.57	11731	0.00002	2.3
Metot 6	99.4	0.6	0.5	0.7	0.56	15224	0.00002	1.4
Metot 7	98	2	0.3	0.7	0.55	19295	0.00001	1.4
Metot 8	99.5	0.5	1	3.1	1.14	9525	0.00002	2.6
Metot 9	99.6	0.4	1	3.3	1.14	12628	0.00002	2.9

Elde edilen hesaplamalar sonucunda; Metot 9`un *β*- ve *γ-tokoferol* ve *tokotrienol* türlerini ayırmada en etkili metot olduğu görülmüştür. Bu sebeple; nar çekirdeği yağı gibi yüksek vitamin ve tokol içeriğine sahip yağların vitamin ve tokol analizinde, kromatografik ayırma metodu olarak Metot 9 kullanımının uygun olduğu sonucuna varılmıştır. Çalışma sırasında kullanılan seçilmiş bazı metotlara ait kromatogramlar **Şekil 4. 22**`de verilmiştir.



Şekil 4. 22 Vitamin ve Tokol Analizi Çalışmalarında Kullanılan Metotlara Ait Kromatogramlar



Şekil 4. 23 Vitamin-Tokol Standartına Ait Kromatogram

Önerilen bir metodun kullanılabilirlik kazanabilmesi için, metodun performansını ve üstünlüğünü gösteren validasyon çalışmalarının gerçekleştirilmesi, bunun yanı sıra; yeni metodun, daha önce kullanımda olan standart metotlarla istatistiksel olarak karşılaştırılması gerekmektedir (Ayyıldız 2010). Bu sebeple; standart karışımının tokoferol içeriğinin tespiti için geliştirilen Metot 9 metodu ile şimdiye kadar kullanılmakta olan standart AOCS Ce 8-89 metodu istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

Standart karışımının tokoferol tayini için Metot 9 ve standart metot karşılaştırması yapılırken, t testi dikkate alınmış ve aşağıdaki formüller yardımıyla t değeri hesaplanmıştır. t değerinin hesaplanmasından sonra ise; serbestlik derecesine göre oluşturulmuş tablolardan kritik t değeri bulunmuş ve hesaplanan değerlerle karşılaştırılarak, hipotezlerden metodun uygunluğuna karar verilmiştir.

$$t = \frac{\bar{X}_d - \mu_0}{S_d/\sqrt{N}}$$

t: t testi

$\bar{X}_d$: Farkların Ortalaması

S_d: Farkların Standart Sapması

N: Farkların Sayısı

Metot 9 ve standart metot kullanılarak gerçekleştirilen standart karışımının tokoferol tayininden elde edilen verilerin karşılaştırılmasında aşağıdaki null ve alternatif hipotezleri kullanılmıştır:

H_0: $\mu_0 = 0$

H_A: $\mu_0 \neq 0$

Oluşturulan hipotezlere göre; H_0, Metot15 ile standart metot verilerine ait ortalamalar arasında anlamlı olarak (%95 güven seviyesinde) bir fark olmadığını ileri sürerken, H_A, Metot 9 ile standart metot verilerine ait ortalamalar arasında anlamlı bir fark olduğunu savunmaktadır.

İki metottan elde edilen deneysel verilerin (**Çizelge 4. 18**) kullanılmasıyla, hesaplanan t değeri: 0.38 olarak, kritik t değeri (tablodan) ise 12.7 olarak belirlenmiştir (p=0.05).

Yukarıdaki bilgiler doğrultusunda, %95 güven seviyesinde H0 hipotezinin reddedilemeyeceği açıkça görülmektedir. Şöyle ki;

t hesaplanan : 0.38 < t kritik : 12.7

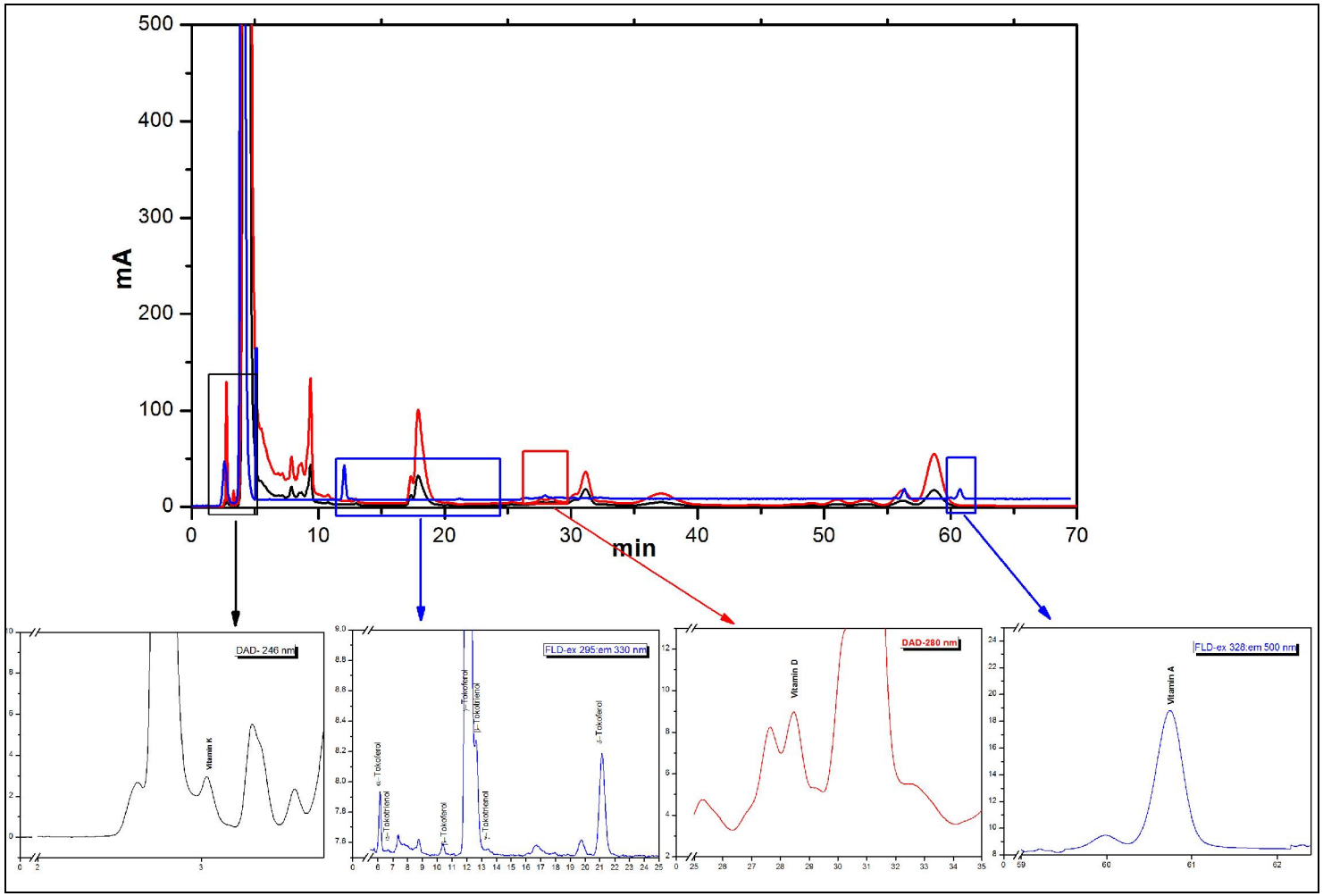
olduğundan hesaplanan t değeri, dağılım grafiğinde kabul bölgesine düşmektedir. Bu sebeple; H_0: μ_0 =0 olduğunu ileri süren H_0 hipotezi reddedilemez, yani; Metot 9 ve standart metotdan elde edilen veri gruplarının ortalaması birbirinden anlamlı olarak farklı değildir.

Çizelge 4. 18 AOCS Ce 8-89 ve Metot 9 Metotları Kullanılarak Standart KarışımNumunesi için Hesaplanan Tokoferol Değerleri

mg/kg	AOCS Ce 8-89	Metot 9	Fark	
α- tokoferol	12.3	1.9	10.4	$\bar{X}_d$:0.6 S_d: 1.13
δ- tokoferol	9.5	9.7	-0.2	

4.6.3. Rafinasyon kademelerindeki değişim

Nar çekirdeği yağı rafinasyon prosesi süresince *vitamin ve tokol* miktarında meydana gelen değişimlerin belirlenmesi için yapılan deneylerde, yağ numuneleri hiçbir ön işleme tabi tutulmamış ve yağ numuneleri Metot 9 sıvı kromatografisi analiz metodu kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kromatografik ayrımlara örnek teşkil etmesi açısından, ham nar çekirdeği yağının *vitamin ve tokol* analizlerine ait kromatogram **Şekil 4. 24**`de verilmiş, diğer rafinasyon kademelerinden alınan yağ numuneleri için tespit edilen *vitamin ve tokol* değerleri ise **Çizelge 4. 19**`da özetlenmiştir. Analiz sonuçlarının değerlendirilmesi; *vitamin ve tokol* miktarlarının rafinasyon kademelerine göre değişimi (**Şekil 4. 25)** ve % kayıplar (**Şekil 4. 26**) göz önünde bulundurularak gerçekleştirilmiştir.

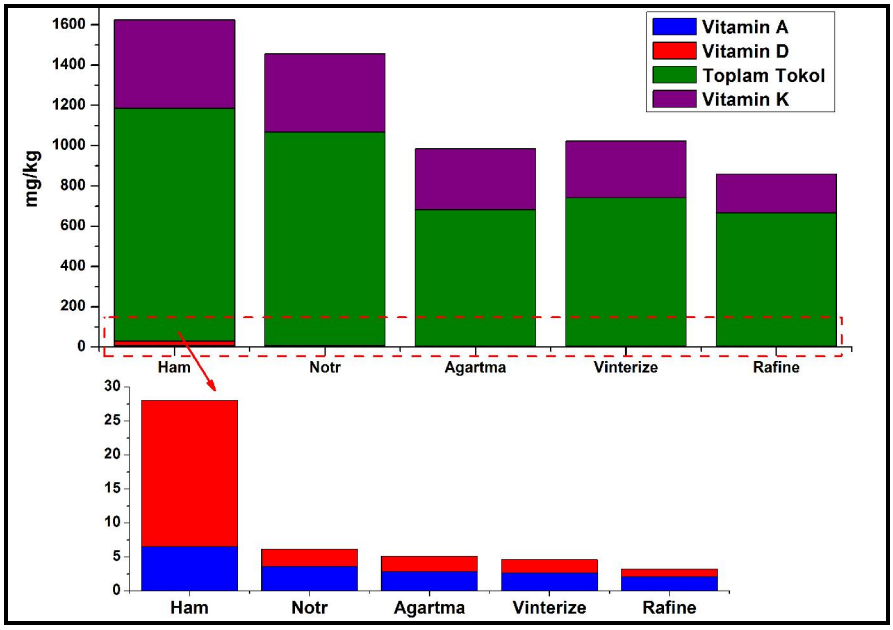


Şekil 4. 24 Nar Çekirdeği Yağı Vitamin ve Tokol Analizi

Çizelge 4. 19 Vitamin ve Tokol Sonuçları (ppm)

	Ham	Nötr	Ağartma	Vinterize	Rafine
Vitamin A	6.54±0.34	3.57±0.46	2.87±0.13	2.69±0.02	2.06±0.05
Vitamin D	21.52±0.29	2.61±0.17	2.27±0.24	1.91±0.18	1.16±0.09
Vitamin K	439.60±0.20	386.88±0.18	301.49±0.06	281.35±0.06	192.54±0.21
α-T	32.35±1.34	36.70±0.14	19.13±3.05	20.90±0.85	18.40±2.62
α-T_3	22.75±2.47	21.10±0.57	8.47±1.01	16.87±1.18	8.20±0.87
β-T	18.95±2.33	13.90±4.53	18.97±3.23	16.60±2.09	20.83±1.60
β-T_3	52.90±2.55	43.40±3.25	2.77±0.57	29.20±0.52	10.79±5.70
γ-T	935.10±6.36	858.05±6.01	613.07±11.50	595.70±8.72	544.20±15.70
γ-T_3	37.22±0.03	34.02±0.03	5.60±0.01	5.41±0.03	3.21±0.01
δ-T	57.20±0.57	54.25±0.35	9.17±0.21	51.73±0.74	57.33±1.29
Σ-T	1043.60±2.65	962.90±2.76	660.33±4.50	684.93±3.10	640.77±5.30
Σ-T_3	112.87±1.68	98.52±1.28	16.83±0.53	51.48±0.57	22.20±2.19
Σ -Tokol	1156.47±2.24	1061.42±2.13	677.17±2.80	736.41±2.02	662.97±3.97

* T: tokoferol, T_3: tokotrienol



Şekil 4. 25 Rafinasyon Kademeleri Vitamin ve Tokol Değişimi

Çizelge 4. 20 Rafinasyon Kademelerinde Vitamin ve Tokol Kaybı (%)

% Kayıp	Vitamin A	Vitamin D	Toplam Tokol	Vitamin K
Notr	45	88	8	12
Agartma	20	13	36	22
Vinterize	6	16	-9	7
Rafine	23	39	10	32

Şekil 4. 26 Rafinasyon Kademelerinde Vitamin ve Tokol Kaybı

Rafinasyon boyunca yağlardaki *vitamin ve tokol* içeriğinde sürekli bir azalış gözlenmektedir (Tasan 2005, Naz 2011). Vitamin ve tokol içeriğinde meydana gelen değişimlerin aşağıdaki sebeplerden kaynaklandığı düşünülmektedir:

- ***NaOH ile yapılan nötralizasyon kademesi sonunda;*** *vitamin A, vitamin D, toplam tokol ve vitamin K* miktarlarının sırasıyla 3.57, 2.61, 1061.42, 386.88 ppm`e düştüğü gözlenmiştir. Meydana gelen bu düşüşler, degumming sırasında fosforik asit, nötralizasyon sırasında NaOH kullanılmasından, işlemin sıcakta yapılmasından ve ortamda hava bulunmasından dolayı, vitamin ve tokollerin oksidasyona uğrayarak yağdan uzaklaştırıldığı düşünülmektedir. (Verhé 2006, Tasan 2005, Naz 2011).
- ***Ağartma kademesi sonunda;*** *vitamin A, vitamin D, toplam tokol ve vitamin K* miktarlarının sırasıyla 2.87, 2.27, 677.17, 301.49 ppm`e düştüğü gözlenmiştir. Meydana gelen bu değişimin, sıcaklıkla birlikte ağartma toprağının adsorpsiyon ve katalitik özelliği sebebiyle vitaminleri ve tokoferolleri adsorbe etmesinden ve oksidasyona uğratmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Verhé 2006, Tasan 2005, Naz 2011).
- ***Vinterizasyon kademesi sonunda*** *vitamin A, vitamin D, toplam tokol ve vitamin K* miktarlarının çok fazla değişmediği görülmektedir. Bu kademede sıcaklık, basınç ve katalitik etki gibi parametreler uygulanmadığından ve soğuk kristallendirme yapıldığından vitaminler ve tokoller uzaklaşmamıştır (Tasan 2005).
- ***2. ağartma kademesi sonunda (rafine yağ);*** *vitamin A, vitamin D, toplam tokol ve vitamin K* miktarlarının sırasıyla 2.06, 1.16, 662.97, 192.54 ppm`e düştüğü gözlenmiştir. Meydana gelen bu değişimin, sıcaklıkla birlikte ağartma toprağının

adsorpsiyon ve katalitik özelliği sebebiyle vitaminleri ve tokoferolleri adsorbe etmesinden ve oksidasyona uğratmasından ve fazla miktarda süzmeyi kolaylaştırıcı madde kullanımından kaynaklandığı düşünülmektedir (Verhé 2006, Tasan 2005, Naz 2011).

Bu bölümde ayrıca; nar çekirdeği yağının *vitamin ve tokol* analizinden elde edilen veriler, diğer bazı yağ türlerininki ile literatürde yer alan bilgiler ışığında karşılaştırılmaya çalışılmıştır (**Çizelge 4. 21**ve **Çizelge 4. 22).** Kısıtlı düzeyde bilgi edinebildiği literatür çalışmaları, palm, pirinç kepeği, ruşeym, soya ve zeytinyağı gibi yağlarda yüksek oranda *tokol* olduğu, çörek otu, kişniş tohumu ve nijer tohumu yağlarında ise yüksek oranda *vitamin K* olduğu göstermektedir. (Ghosh 2009, Ramadan 2002). **Çizelge 4. 21**`de görüldüğü gibi, nar çekirdeği yağı *tokol* içeriği ile (~1128 ppm) ruşeym, pirinç kepeği ve palm yağlarından farklılık göstermektedir.

Çizelge 4. 21 Nar Çekirdeği Yağının Farklı Yağlar ile Tokoferol Ve Tokotrienol Miktarı Karşılaştırması (ppm)

	Mevcut Çalışmada	Ghosh 2009				
ppm(mg/kg)	**Nar**	**Palm Yağı**	**Pirinç Kepeği**	**Ruşeym**	**Soya**	**Zeytin**
α-T	32	152	324	1179	101	51
α-T_3	22	205	236	24	-	-
β-T	19	-	18	398	-	-
β-T_3	53	-	-	165	-	-
γ-T	935	-	53	493	593	-
γ-T_3	37	439	349	-	-	-
δ-T	57	-	-	118	264	-
δ- T_3	-	94	-	-	-	-
Σ-T	1044	152	324	1179	101	51
Σ-T_3	112	738	585	189	0	0
Σ -Tokol	1156	890	909	1368	101	51

Çizelge 4. 22 Nar Çekirdeği Yağının Farklı Yağlar ile Vitamin Miktarı Karşılaştırması (ppm)

	Mevcut Çalışmada	Ramadan 2002		
	Nar	**Çörek otu yağı**	**Kişniş tohumu yağı**	**Nijer tohumu yağı**
Vitamin A	7	-	-	-
Vitamin D	22	-	-	-
Vitamin E (α-Tokoferol)	32	284	86	861
Vitamin K	440	1162	428	2632

4.7. Trigliserit Analizi

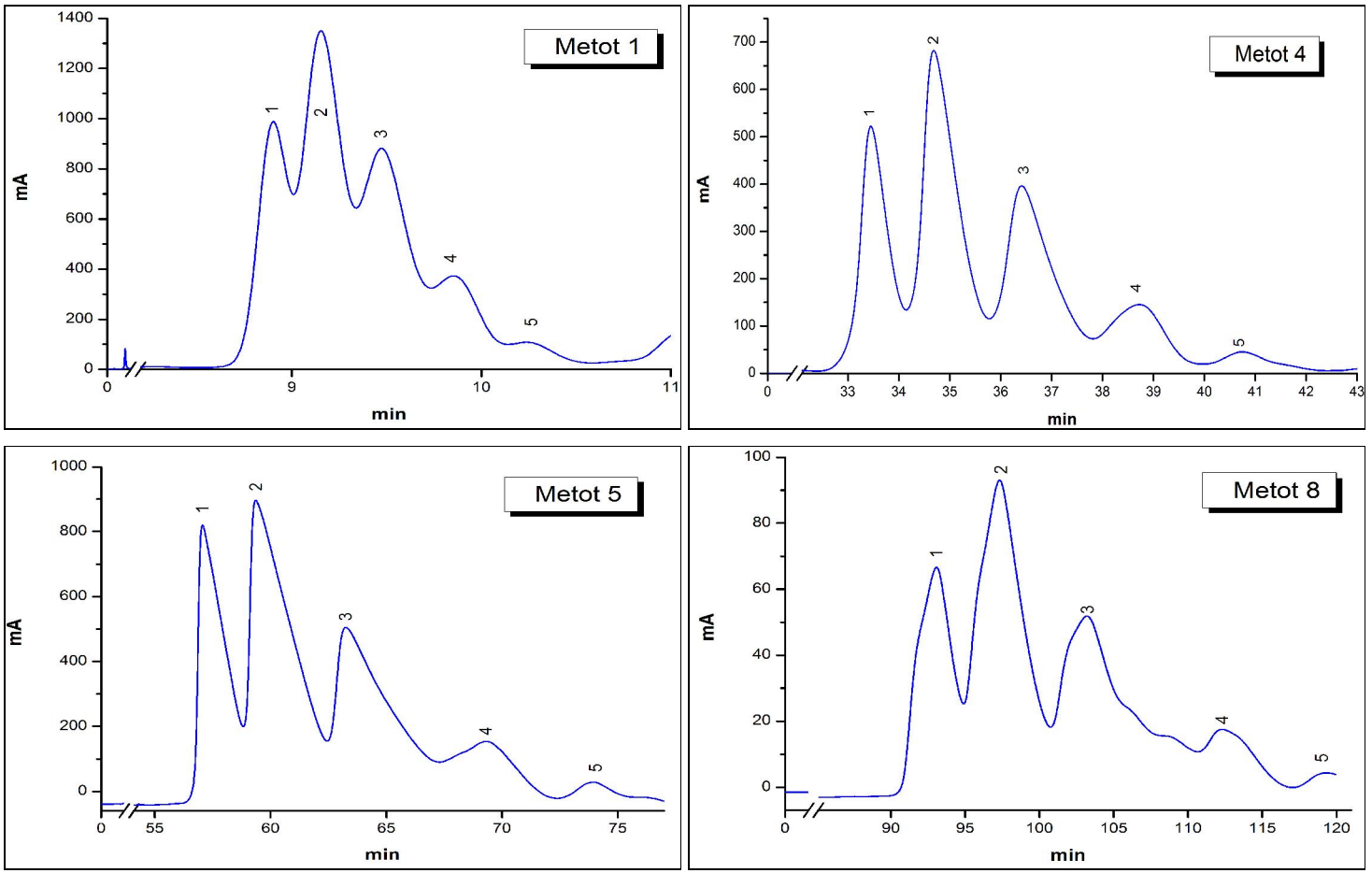
4.7.1 Kromatografik şartların belirlenmesi

HPLC`de yürütülen *trigliserit* analizlerinde; standart AOCS Ce 5b-89 metodu (AOCS. 1998) ve bu metodun modifiye edilmiş hali olan 7 farklı metot olmak üzere toplamda 8 metot kullanılmış ve kromatografik ayrımlar için en uygun metot tespit edilmeye çalışılmıştır. Analizler standart metotlar kullanılarak gerçekleştirildiğinde; bahsedilen konjuge trigliserit türleri için yeterli ayrımı sağlamamaktadır. Kromatografik ayırımlarda *1 ve 2 trigliserit* türlerinin ayrımı özellikle dikkate alınmıştır. Kullanılan metotlara ait kromatografik ayırma verim hesaplamalarına dair sonuçlar **Çizelge 4. 23**`de yer almaktadır.

Çizelge 4. 23 Trigliserit Analiz Metotları Kromatografik Verim Sonuçları

	Aseton (%)	Asetonitril (%)	Akış hızı (mL/min)	k`	α	N	H	Rs
Metot 1(AOCS. 1998)	50	50	1.5	11.3	1.03	14892	0.000017	0.76
Metot 2	60	40	1.5	7.4	1.02	2170	0.000012	0.46
Metot 3	40	60	1.5	17.3	1.03	4460	0.000056	0.61
Metot 4	25	75	1.0	34.1	1.04	18594	0.000013	1.19
Metot 5	15	85	1.5	54.9	1.04	16909	0.000015	1.19
Metot 6	15	85	1.0	51.0	1.04	14978	0.000017	0.98
Metot 7	10	90	1.5	67.1	1.04	11114	0.000022	0.84
Metot 8	0	100	1.5	137.3	1.05	11522	0.000022	1.11

Elde edilen hesaplamalar sonucunda; Metot 4`un *1 ve 2 trigliserit* türlerini ayırmada en etkili metot olduğu görülmüştür. Bu sebeple; nar çekirdeği yağı gibi yüksek konjuge yağ asit içeriğine sahip yağların *trigliserit* analizinde, kromatografik ayırma metodu olarak Metot 4 kullanımının uygun olduğu sonucuna varılmıştır. Çalışma sırasında kullanılan seçilmiş bazı metotlara ait kromatogramlar **Şekil 4. 27**`de verilmiştir.



Şekil 4. 27 Trigliserit Analizi Çalışmalarında Kullanılan Bazı Metotlara Ait Kromatogramlar

Önerilen bir metodun kullanılabilirlik kazanabilmesi için, metodun performansını ve üstünlüğünü gösteren validasyon çalışmalarının gerçekleştirilmesi, bunun yanı sıra; yeni metodun, daha önce kullanımda olan standart metotlarla istatistiksel olarak karşılaştırılması gerekmektedir (Ayyıldız 2010). Bu sebeple; rafine nar çekirdeği yağının trigliserit içeriğinin tespiti için geliştirilen Metot 4 metodu ile şimdiye kadar kullanılmakta olan standart AOCS Ce 5b-89 metodu istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

Rafine nar çekirdeği yağının trigliserit tayini için Metot 4 ve standart metot karşılaştırması yapılırken, t testi dikkate alınmış ve aşağıdaki formüller yardımıyla t değeri hesaplanmıştır. t değerinin hesaplanmasından sonra ise; serbestlik derecesine göre oluşturulmuş tablolardan kritik t değeri bulunmuş ve hesaplanan değerlerle karşılaştırılarak, hipotezlerden metodun uygunluğuna karar verilmiştir.

$$t = \frac{\bar{X}_d - \mu_0}{S_d/\sqrt{N}}$$

t: t testi

$\overline{X}_d$: Farkların Ortalaması

S_d: Farkların Standart Sapması

N: Farkların Sayısı

Metot 4 ve standart metot kullanılarak gerçekleştirilen standart karışımının tokoferol tayininden elde edilen verilerin karşılaştırılmasında aşağıdaki null ve alternatif hipotezleri kullanılmıştır:

H_0: $\mu_0 = 0$

H_A: $\mu_0 \neq 0$

Oluşturulan hipotezlere göre; H_0, Metot 4 ile standart metot verilerine ait ortalamalar arasında anlamlı olarak (%95 güven seviyesinde) bir fark olmadığını ileri sürerken, H_A, Metot 4 ile standart metot verilerine ait ortalamalar arasında anlamlı bir fark olduğunu savunmaktadır.

İki metottan elde edilen deneysel verilerin (**Çizelge 4. 18**) kullanılmasıyla, hesaplanan t değeri: -0.14 olarak, kritik t değeri (tablodan) ise 3.18 olarak belirlenmiştir (p=0.05).

Yukarıdaki bilgiler doğrultusunda, %95 güven seviyesinde H0 hipotezinin reddedilemeyeceği açıkça görülmektedir. Şöyle ki;

t hesaplanan : -0.14 < t kritik : 3.18

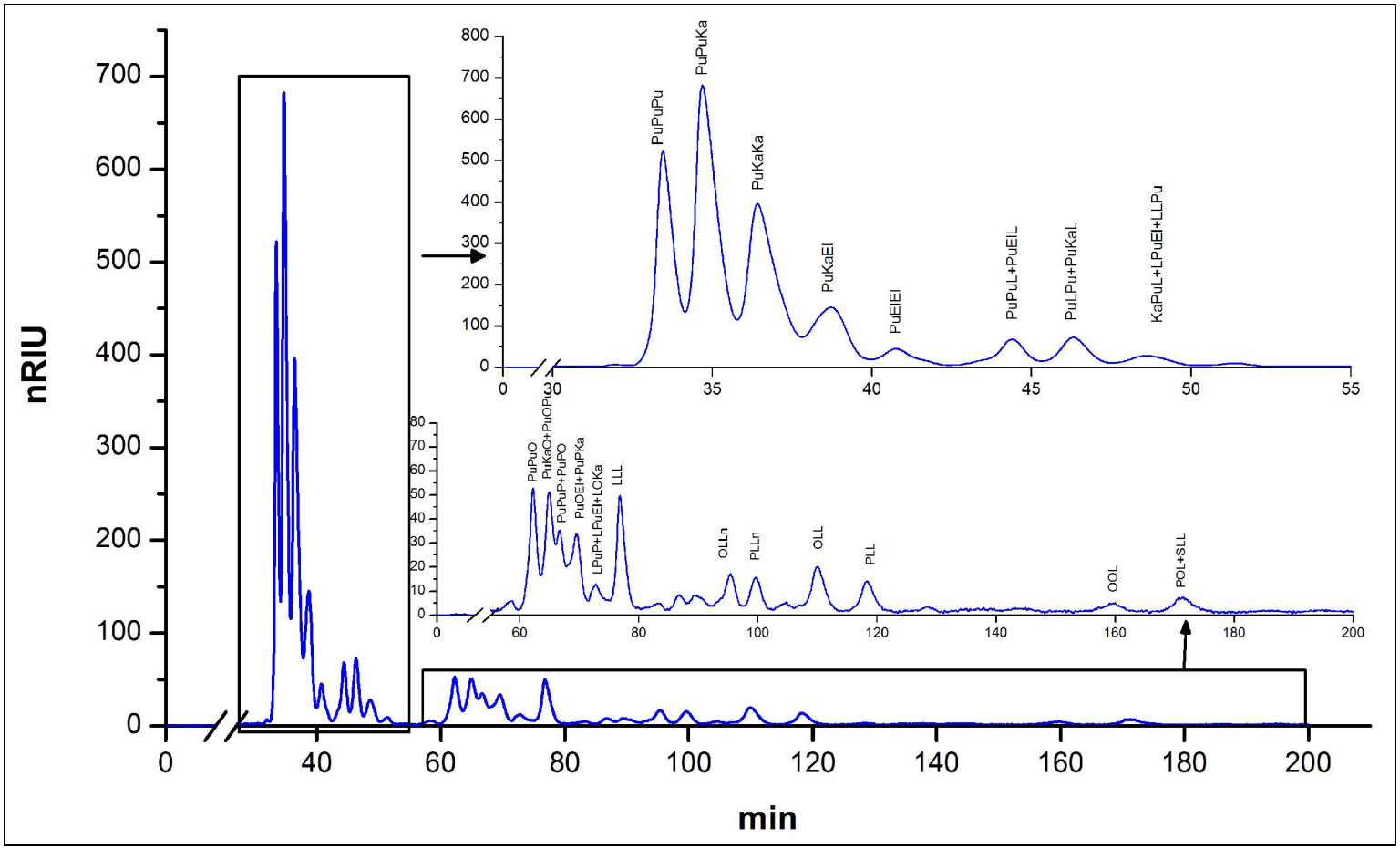
olduğundan hesaplanan t değeri, dağılım grafiğinde kabul bölgesine düşmektedir. Bu sebeple; H_0: μ_0 =0 olduğunu ileri süren H_0 hipotezi reddedilemez, yani; Metot 4 ve standart metotdan elde edilen veri gruplarının ortalaması birbirinden anlamlı olarak farklı değildir.

Çizelge 4. 24 AOCS Ce 5b-89 ve Metot 4 Metotları Kullanılarak Rafine Nar Çekirdeği Numunesi için Hesaplanan Trigliserit Değerleri

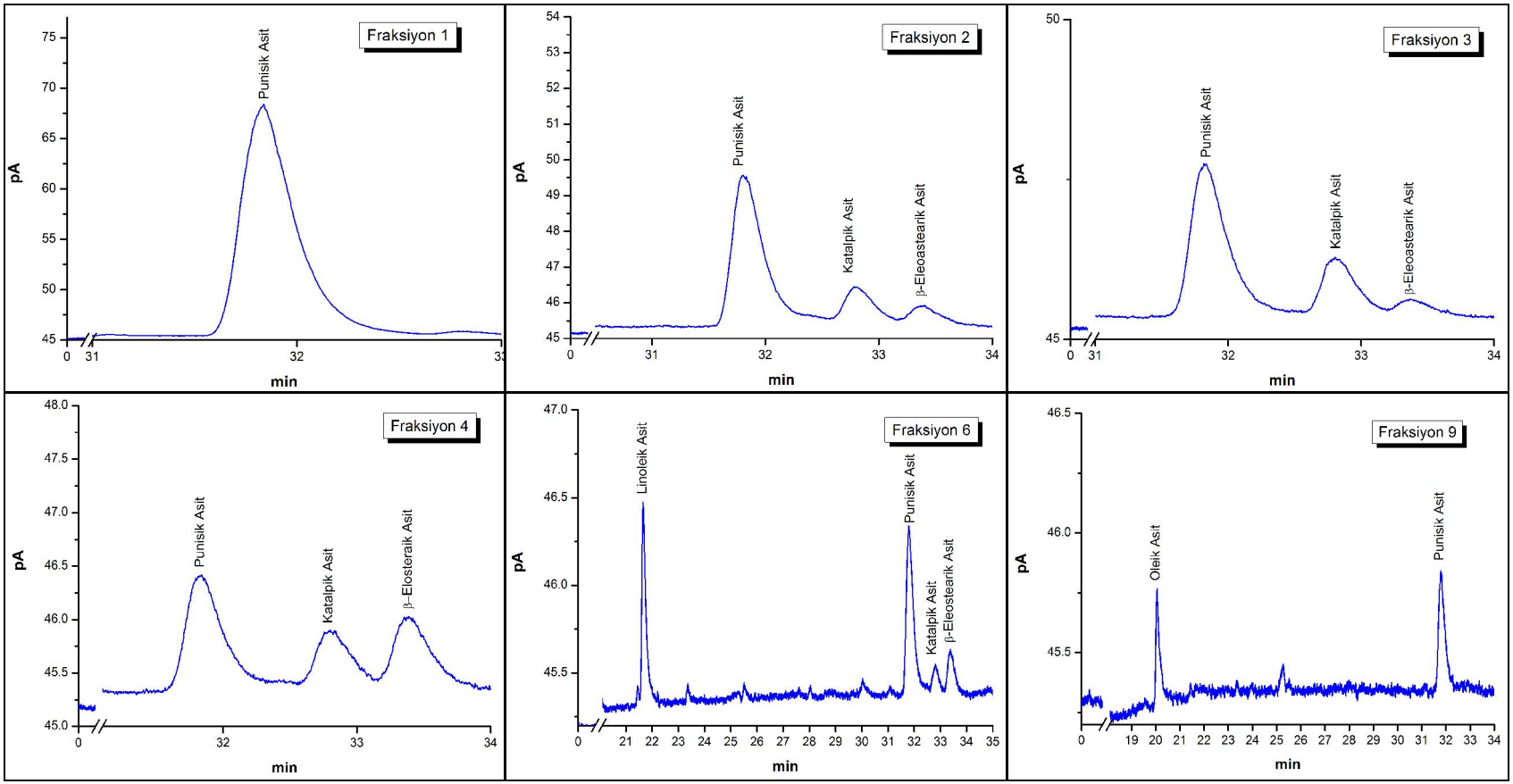
%	AOCS Ce 5b-89	Metot 4	Fark	
OLL	1.19	2.28	-1.09	
PLL	0.99	2.82	-1.83	$\bar{X}_d$:-0.38 S_d: 1.35
OOL	1.77	0.55	1.22	
POL+SLL	1.28	1.11	0.17	

4.7.2. Rafinasyon kademelerindeki değişim

Nar çekirdeği yağı rafinasyon prosesi süresince trigliserit yapısında meydana gelen değişimlerin belirlenmesi için yapılan deneylerde, yağ numuneleri hiçbir işleme tabi tutulmadan direk HPLC sistemine enjekte edilmiştir. Elde edilen kromatografik ayrımlara örnek teşkil etmesi açısından, rafine nar çekirdeği yağının trigliserit kompozisyonuna ait kromatogram **Şekil 4. 28**' da verilmiştir. Ayrıca analizler sırasında; nar çekirdeğine has olan konjuge linolenik yağ asitlerinin oluşturmuş olduğu trigliserit yapılarının ne olduğunu anlamak için, standartlar kullanılarak tespiti yapılamayan madde piklerini içeren çözeltiler çıkış zamanları dikkate alınarak teker teker toplanmıştır. Toplanan trigliserit çözeltileri, metilleme işlemine tabii tutulduktan sonra gaz kromatografisi cihazına enjekte edilerek, yağ asit kompozisyonları belirlenmiştir. Trigliserit çözeltilerin yağ asit kompozisyonlarına ait bazı kromatogramlar **Şekil 4. 29**`de, tümü **EK-4**`de verilmiştir. Rafinasyon kademelerinden alınan yağ numunelerinin trigliserit kompozisyonu değerleri **Çizelge 4. 25**`de özetlenmiştir. Ayrıca, çalışmalarda kullanılan nar çekirdeği yağının trigliserit analiz sonuçları rafinasyon kademelerine göre değişimi de incelenmiştir (**Şekil 4. 30).**



Şekil 4. 28 Rafine Nar Çekirdeği Yağı Trigliserit Kompozisyonu

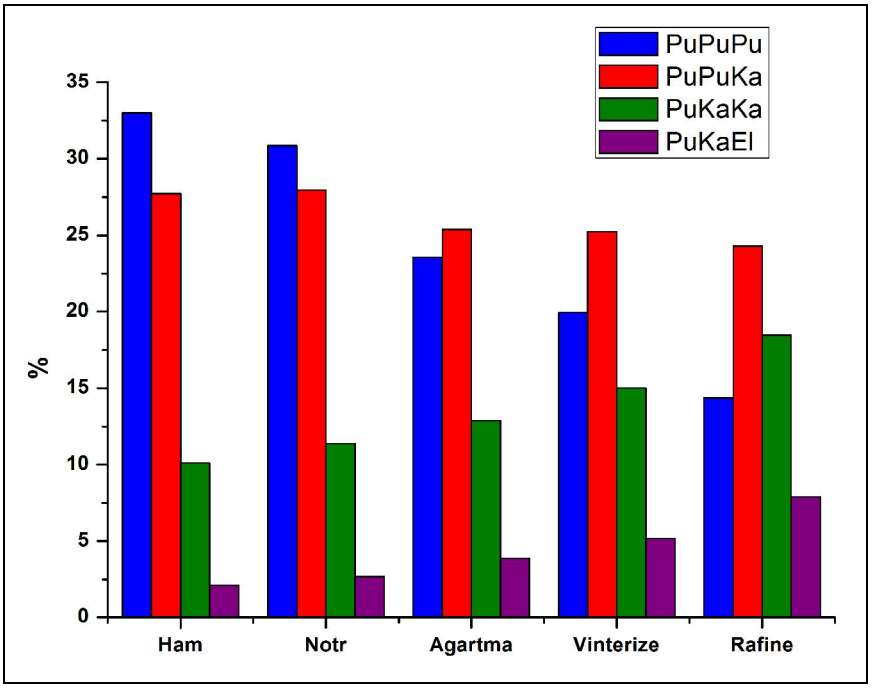


Şekil 4. 29 Trigliserit Analizi için Yağ Asitlerinin Belirlenmesine Ait Kromatogramlar

Çizelge 4. 25 Rafinasyon Kademelerine ait Trigliserit Kompozisyonu Sonuçları (%)

	Ham	Notr	Agartma	Vinterize	Rafine
PuPuPu	32.99±0.26	30.87±0.00	23.57±0.04	19.95±0.17	14.37±0.20
PuPuKa	27.72±0.13	27.96±0.04	25.37±0.03	25.25±0.15	24.30±0.22
PuKaKa	10.11±0.05	11.38±0.03	12.88±0.02	15.02±0.07	18.47±0.13
PuKaEl	2.11±0.02	2.68±0.01	3.89±0.02	5.17±0.04	7.90±0.01
PuElEl	0.38±0.04	0.49±0.00	0.85±0.02	1.24±0.01	2.28±0.03
PuPuL+PuElL	4.41±0.02	4.34±0.01	3.65±0.02	3.39±0.03	3.17±0.00
PuLPu+PuKaL	2.74±0.03	2.88±0.02	2.86±0.04	3.03±0.02	3.32±0.00
LPuKa+LPuEl+LLPu	0.88±0.09	1.02±0.04	1.27±0.03	1.69±0.03	2.16±0.09
PuPuO	6.49±1.31	5.55±0.03	4.61±0.09	4.20±0.05	3.56±0.01
PuKaO+PuOPu	2.73±0.41	2.77±0.02	2.86±0.04	3.05±0.06	3.38±0.08
PuPuP+PuPO	2.84±0.90	3.17±0.06	2.57±0.05	2.42±0.04	2.03±0.05
PuOEl+PuPKa	1.32±0.85	1.84±0.02	2.01±0.02	2.35±0.04	2.81±0.02
LPuP+LPuEl+LOKa	0.26±0.11	0.29±0.04	0.41±0.03	0.60±0.06	0.92±0.05
LLL	0.17±0.03	0.16±0.03	3.76±0.05	3.61±0.08	3.20±0.03
OLLn	0.23±0.01	0.23±0.03	0.20±0.01	0.23±0.01	0.19±0.01
PLLn	TED	TED	0.55±0.03	0.45±0.08	0.43±0.01
SSPu	0.71±0.05	0.65±0.02	0.54±0.04	0.53±0.11	0.63±0.21
OLL	0.70±0.03	0.70±0.02	1.75±0.04	1.54±0.08	1.19±0.08
PLL	2.25±0.25	2.02±0.04	1.15±0.06	1.36±0.12	0.99±0.03
OOL	0.95±0.03	1.00±0.03	2.10±0.04	2.08±0.03	1.77±0.05
POL+SLL	TED	TED	1.44±0.05	1.39±0.06	1.28±0.03
PPL	TED	TED	0.57±0.11	0.49±0.16	0.52±0.11

* TED: Tespit Edilemeyen Değer



Şekil 4. 30 Rafinasyon Kademeleri Konjuge Yağ Asidi İçeren Trigliserit Değişimi

Rafinasyon boyunca nar çekirdeği yağının trigliserit yapısında meydana gelen değişimlerin aşağıdaki sebeplerden kaynaklandığı düşünülmektedir:

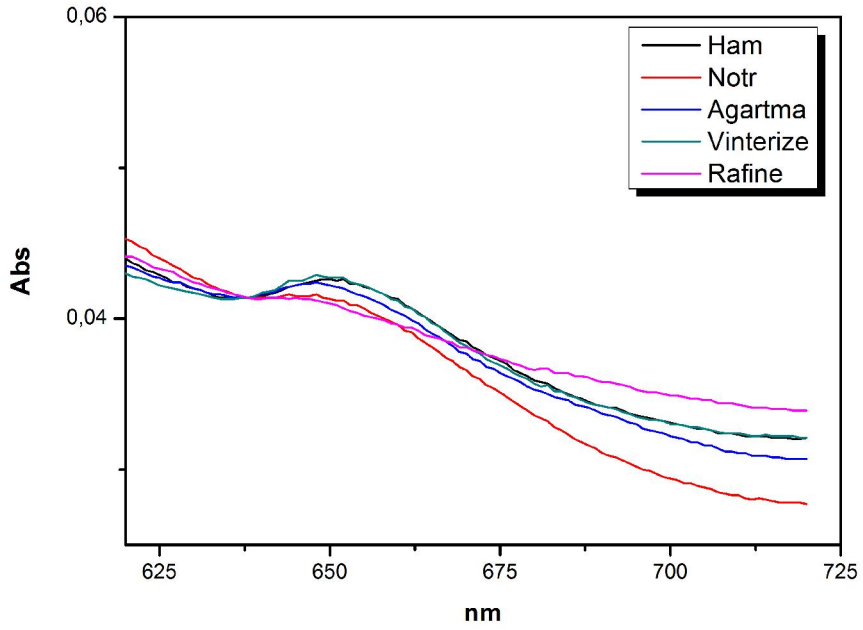
- ***NaOH ile yapılan nötralizasyon kademesi sonunda;*** *% PuPuPu, PuPuKa, PuKaKa ve PuKaEl* miktarlarının sırasıyla 31, 28, 11 ve 3`e ulaştıkları gözlenmiştir Meydana gelen bu değişimin, nötralizasyon işleminin sıcakta, fosforik asit ve NaOH li ortamda yapılmasından, hidrolize olan trigliseritlerin sodyum sabunlarına dönüştürülerek su ile yıkanarak uzaklaştırılmasından ve konjuge yağ asitlerinin izomerleşmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Elde edilen sonuçların yağ asit kompozisyonu analizi ile uyumlu olduğu görülmüştür.
- ***Ağartma kademesi sonunda;*** *% PuPuPu, PuPuKa, PuKaKa ve PuKaEl* miktarlarının sırasıyla 24, 25, 13 ve 4`e ulaştıkları gözlenmiştir. Meydana gelen bu değişimin, ağartma toprağının asidik özelliği sebebiyle yağı hidrolize etmesi sonucu oluşan serbest yağ asitlerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca trigliserit yüzdelerindeki değişimin; kullanılan ağartma toprağının, asidik olması ve sıcaklıktan dolayı konjuge yağ asitlerinin polimerizasyona uğramasından, izomerleşmesinden ve dönüşüme uğramasından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.
- ***Vinterizasyon kademesi sonunda;*** *% PuPuPu, PuPuKa, PuKaKa ve PuKaEl* miktarlarının sırasıyla 20, 25, 15 ve 5`e ulaştıkları gözlenmiştir. Meydana gelen bu değişimin, vinterizasyon kademesinde düşük sıcaklık uygulanmasından (4-6 ^{o}C) dolayı yağların daha kararlı bir yapı olan *trans* forma doğru izomerleşmesinden ve konjugasyonun bozularak konjuge olmayan linolenik asit formuna dönüşmesinden kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.
- ***2. ağartma kademesi sonunda (rafine yağ);*** *% PuPuPu, PuPuKa, PuKaKa ve PuKaEl* miktarlarının sırasıyla 14, 24, 18 ve 8`e ulaştıkları gözlenmiştir. Meydana gelen bu değişimin, ağartma toprağının asidik etkisi ve sıcaklıktan dolayı konjuge yağ asitlerinin polimerizasyona uğramasından, izomerleşmesinden ve dönüşüme uğramasından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

4.8. Uv-Visible Spektrofotometrik Analizler

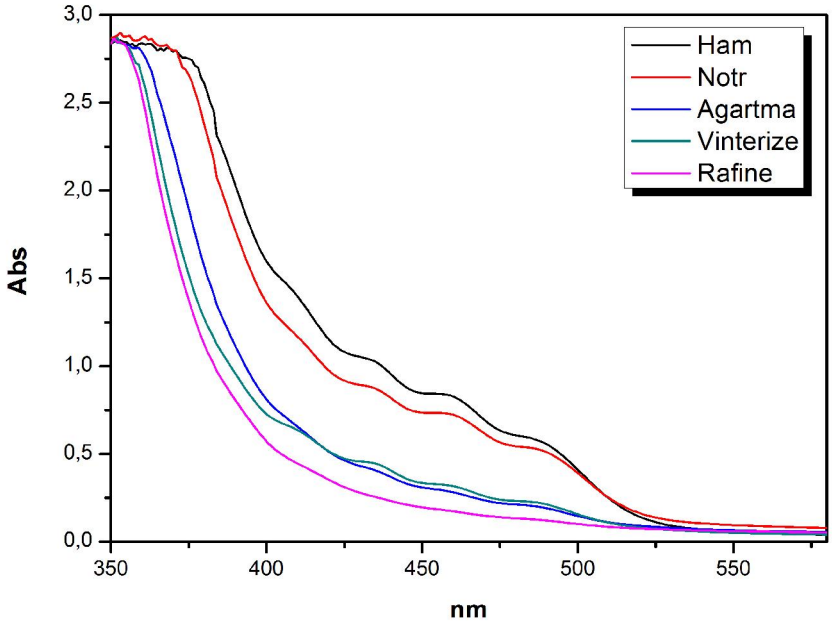
UV-Vis spektrofotometre kullanılarak gerçekleştirilen analizler genel olarak; oksokrom ve kromofor gruplar ihtiva eden renk pigmentlerinin (klorofil ve β-karoten) ve konjuge dien & trienlerin analizlerini kapsamaktadır.

4.8.1. Klorofil ve β-karoten tayini

Nar çekirdeği yağı rafinasyon prosesi süresince *klorofil* ve *β-karoten* miktarında meydana gelen değişimlerin belirlenmesi için Uluslararası Alfa Laval ALS metotları (4031-E-162 ve 4031-E-163) kullanılmıştır. 200-800 nm arasında gerçekleştirilen spektrum taramaları sonucunda elde edilen *klorofil* ve *β-karoten* pikleri **Şekil 4. 31** ve **Şekil 4. 32**`de gösterilmiştir. Türlerin kantitatif miktarları ise ppb cinsinden **Çizelge 4. 26**`de özetlenmiştir.



Şekil 4. 31 Klorofil Miktarı Rafinasyon Kademelerine Ait UV-vis Spektrofotometre Taraması



Şekil 4. 32 β-Karoten Miktarı Rafinasyon Kademelerine Ait UV-vis Spektrofotometre Taraması

Çizelge 4. 26 Rafinasyon Kademelerine ait Klorofil ve Karoten Sonuçları (ppb)

	Klorofil (ppb)	Karoten (ppb)
Ham	45.66	3231.26
Notr	40.06	2808.97
Ağartma	38.71	1164.55
Vinterize	30.23	1269.46
Rafine	12.62	747.51

Rafinasyon boyunca *klorofil* ve *β-karoten* içeriğinde meydana gelen sürekli azalışın aşağıdaki sebeplerden kaynaklandığı düşünülmektedir:

- ***NaOH ile yapılan nötralizasyon kademesi sonunda;*** *klorofil* ve *β-karoten* miktarlarının sırasıyla 40 ve 2808 ppb`ye düştüğü gözlenmiştir. Meydana gelen bu değişimin, nötralizasyon işleminin sıcaklıkta, fosforik asit ve NaOH li ortamda yapılmasından, sodyum sabunlarına dönüştürülen serbest yağ asitleri ile birlikte yağdan uzaklaştırılmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.
- ***Ağartma kademesi sonunda;*** *klorofil* ve *β-karoten* miktarlarının sırasıyla 38 ve 1164 ppb`ye düştüğü gözlenmiştir. Meydana gelen bu değişimin, ağartma toprağının adsorpsiyon ve katalitik özelliği sebebiyle *klorofil* ve *β-karoteni* adsorbe etmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir

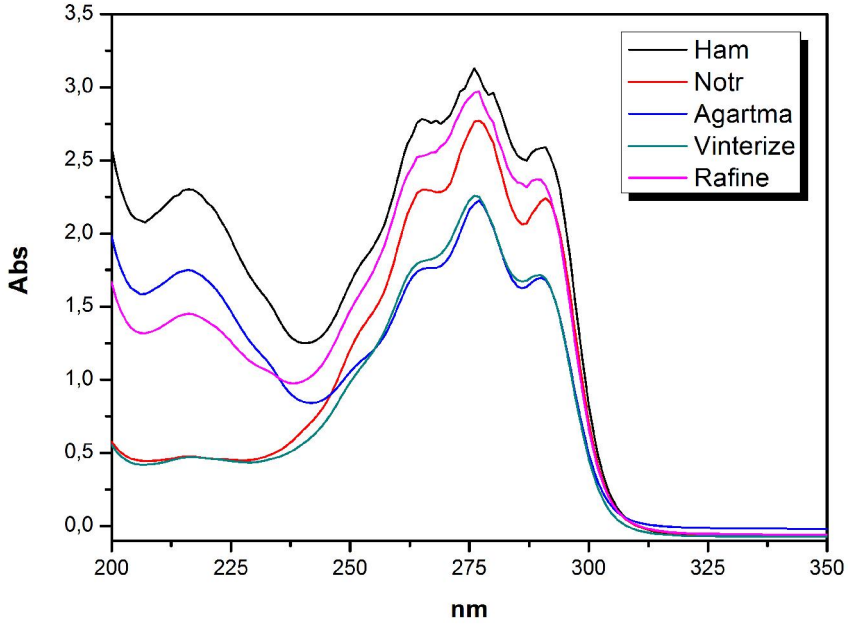
- ***Vinterizasyon kademesi sonunda*** *klorofil* ve *β-karoten* miktarlarının sırasıyla 30 ve 1269 ppb`ye ulaştıkları gözlenmiştir. Bu kademede belirgin bir değişim olmamasının nedeni; sıcaklık, basınç ve katalitik etki gibi parametrelerin uygulanmadığından ve kristallendirme işlemi dışında herhangi bir işlemin uygulanmamış olmasıdır .
- ***2. ağartma kademesi sonunda (rafine yağ);*** *klorofil* ve *β-karoten* miktarlarının sırasıyla 12 ve 747 ppb`ye düştüğü gözlenmiştir. Meydana gelen bu azalışa, toprağının adsorpsiyon ve katalitik etkisi ile birlikte, fazla miktarda süzmeyi kolaylaştırıcı maddenin kullanılmasının neden olduğu düşünülmektedir.

4.8.2. Birincil ve ikincil oksidasyon ürünlerinin (Özgül Abs.) tayini

Nar çekirdeği yağı rafinasyon prosesi süresince *birincil* ve *ikincil oksidasyon* ürünlerinin miktarında meydana gelen değişimlerin belirlenmesinde; 200-800 nm dalga boyu aralığında yapılan tarama sonuçları kullanılmış, elde edilen değerler **Çizelge 4. 27**`de, spektrum tarama sonuçları **Şekil 4. 33**`de özetlenmiştir.

Çizelge 4. 27 Nar Çekirdeği Yağı Rafinasyon Kademelerine ait Özgül Absorbans Sonuçları

	As_{232}	As_{269}
Ham	3,3	5,7
Notr	1,0	4,7
Ağartma	2,4	3,7
Vinterize	0,9	3,8
Rafine	2,2	5,4



Şekil 4. 33 Özgül Absorbans Tayini Rafinasyon Kademelerine Ait UV-vis Spektrofotometre Taraması

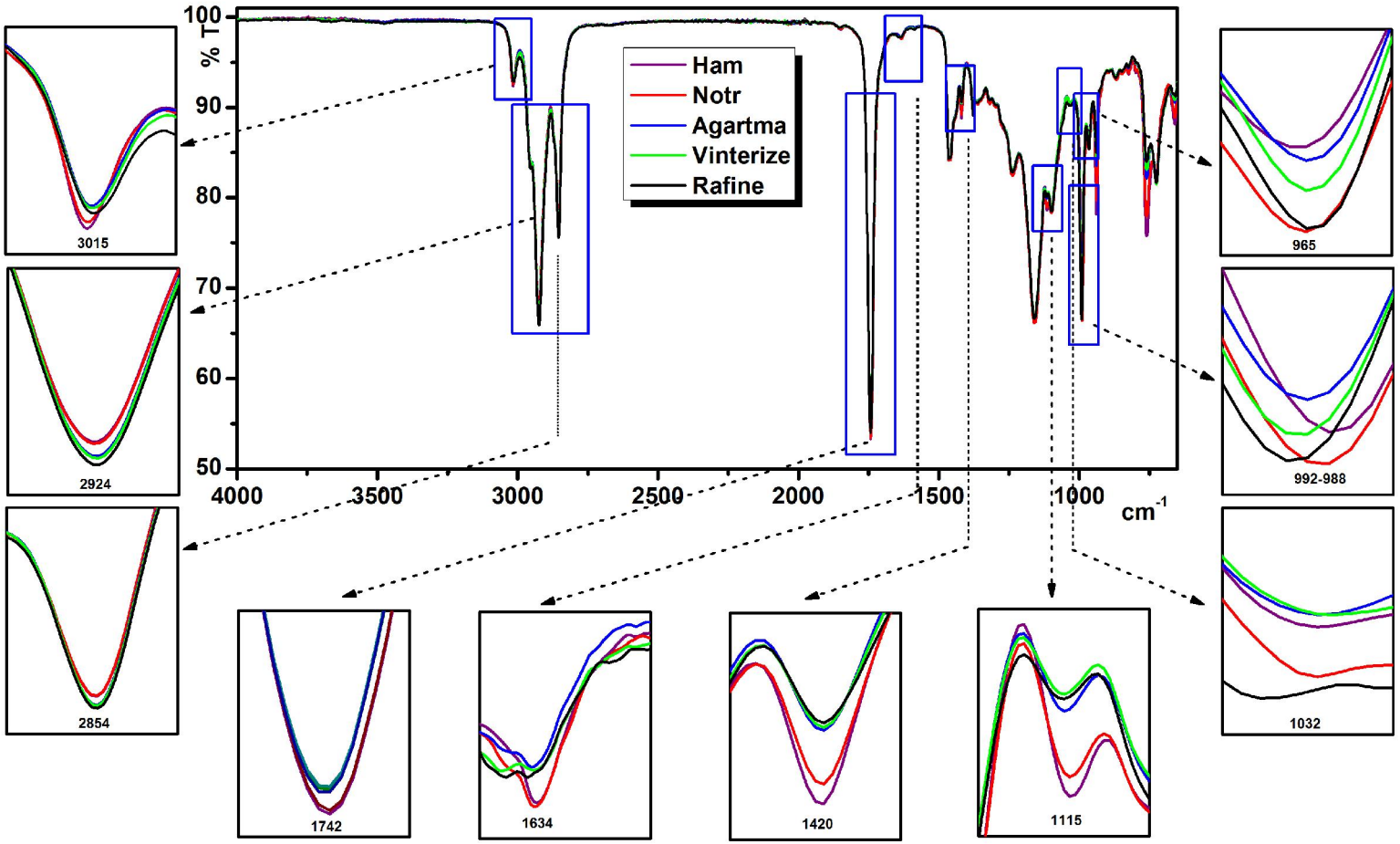
Rafinasyon boyunca *birincil* ve *ikincil oksidasyon* ürünlerinin miktarında meydana gelen değişimlerin aşağıdaki sebeplerden kaynaklandığı düşünülmektedir:

- ***NaOH ile yapılan nötralizasyon kademesi sonunda;*** *birincil* ve *ikincil oksidasyon* ürünlerinin miktarlarının sırasıyla 1,0 ve 4,7`ye düştüğü gözlenmiştir. Meydana gelen bu değişimin, nötralizasyon işleminin sıcaklıkta, fosforik asit ve NaOH`li ortamda yapılmasından ve sodyum sabunlarına dönüştürülen serbest yağ asitleri ile birlikte hidroperoksitlerin, aldehitlerin ve ketonların yağdan uzaklaştırılmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.
- ***Ağartma kademesi sonunda;*** *birincil* ve *ikincil oksidasyon* ürünlerinin miktarlarının sırasıyla 2,4 ve 3,7`ye ulaştıkları gözlenmiştir. Meydana gelen bu değişimin, ağartma toprağının adsorpsiyon, katalitik özelliği ve sıcaklık sebebiyle *birincil oksidasyon* ürünlerinin oluşumunu hızlandırdığı, *ikincil oksidasyon* ürünlerini adsorbe etmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir
- ***Vinterizasyon kademesi sonunda*** *birincil* ve *ikincil oksidasyon* ürünlerinin miktarlarının sırasıyla 0,9 ve 3,8`e ulaştıkları gözlenmiştir. Bu kademede belirgin bir değişim olmamasının nedeni; sıcaklık, basınç ve katalitik etki gibi parametrelerin uygulanmadığından ve kristallendirme işlemi dışında herhangi bir işlemin uygulanmamış olmasıdır ..

– ***2. ağartma kademesi sonunda (rafine yağ);*** *birincil* ve *ikincil oksidasyon* ürünlerinin miktarlarının sırasıyla 2,2 ve 5,4 `e yükseldiği gözlenmiştir. Meydana gelen bu yükselişe, toprağının adsorpsiyon, katalitik etkisi ve sıcaklık ile birlikte, fazla miktarda süzmeyi kolaylaştırıcı madde kullanılmasının neden olduğu düşünülmektedir.

4.9. FTIR Analizleri

Rafinasyon prosesi süresince; nar çekirdeği yağının yapısı, fonksiyonel grupları ve içeriğinde bulunan safsızlıkların nicel tayini için; yağ analizlerinde uygulanan ilk spektroskopik yöntem olan (Shahidi 2002) FTIR spektroskopisi yöntemi kullanılmıştır. 650-4000 cm^{-1} arasında gerçekleştirilen spektrum tarama sonuçları **Şekil 4. 34**'de, her bir frekansta meydana gelen değişimler ise **Çizelge 4. 28**`de özetlenmiştir.



Şekil 4. 34 Rafinasyon Kademelerine Ait FTIR Tarama Sonuçları

Çizelge 4. 28 Rafinasyon Kademelerine ait FTIR Sonuçları (%T)

	cm^{-1}	**3015**	**2924**	**2854**	**1742**	**1420**	**1115**	**1032**	**990**	**965**
%T	**Ham**	92,3	67.3	76.4	53.3	88.8	78.7	90.2	67.8	86.4
	Notr	92,6	67.2	76.4	53.4	89.3	78.9	90.3	66.3	85.3
	Ağartma	93.2	66.4	75.8	54.0	90.5	79.9	90.5	69.2	86.3
	Vinterize	93.1	66.3	75.7	54.1	90.5	80.2	90.5	67.6	85.9
	Rafine	93.0	65.9	75.6	53.9	90.6	80.1	90.6	66.5	85.4

FTIR analizleri sonucunda elde edilen veriler değerlendirildiğinde; rafinasyon boyunca nar çekirdeği yağının temel bileşenlerinde meydana gelen nicel ve kabaca nitel değişimlerin aşağıdaki sebeplerden kaynaklandığı düşünülmektedir:

3015 cm^{-1}; bu frekansta genel olarak disüpstitüe alkenlerin cis–trans izomerlerinin yer aldığı bilinmektedir. Genel olarak; konjuge olmayan yağ asitlerinin cis/trans yapılarının irdelendiği bu frekansta, konjuge yağ asitlerinin *cis-cis, cis-trans* ve *trans-trans* yapıları da görülebilmektedir (Mahesar 2011). Elde edilen analiz sonuçlarına göre; nar çekirdeği yağının rafinasyonu sırasında bu frekanstaki %T değişiminin; *ham > nötr > rafine > ağartma > vinterize* şeklinde bir sıralama izlediği görülmüştür. Rafinasyon prosesi boyunca; konjuge yağ asitlerinde meydana gelen değişimin (nar çekirdeği yağı için CLnA) FTIR analizleri ile tespit edilmesinin uygun olup olmadığının belirlenmesi için, yağ asit kompozisyonu analizlerinden elde edilen veriler (*nötr > ham > rafine > ağartma > vinterize*) ile FTIR analizlerinden elde edilen veriler piklerin oranları dikkate alınarak karşılaştırılmış, her iki metottan elde edilen sonuçların uyumluluk gösterdiği tespit edilmiştir. Dolayısıyla; bu frekansta CLnA izomerlerinin de gözlenebileceği sonucuna varılmıştır.

2924 ve 2854 cm^{-1}; bu frekanslarda genel olarak simetrik ve asimetrik yapıdaki alifatik -CH_2 grupları gözlenmektedir (Mahesar 2011). Yemeklik yağlar göz önünde bulundurulduğunda ise; bu bölgede serbest ve parçalanmış yağ asitleri yer almaktadır. Elde edilen analiz sonuçlarına göre nar çekirdeği yağının rafinasyonu sırasında bu frekanstaki %T değişiminin; *ham=nötr < ağartma = vinterize < rafine* şeklinde bir sıralama izlediği görülmüştür.

1742 cm^{-1}; bu frekansda genel olarak -C=O ester gruplarının yer aldığı bilinmektedir. Yemeklik yağlar göz önünde bulundurulduğunda ise; bu bölgede serbest ve parçalanmış yağ asitlerinin yanı sıra hidroperoksitlerin de bulunduğu düşünülmektedir (Mahesar 2011). Elde edilen analiz sonuçlarına göre nar çekirdeği

yağının rafinasyonu sırasında bu frekanstaki %T değişimi; *ham* = *nötr* > *ağartma* = *vinterize* > *rafine* şeklinde bir sıralama izlemiştir.

1634 cm^{-1}; bu frekansda genel olarak -CH_2 ve -CH asimetrik doymamış mono aldehit gerilme titreşimlerinin yer aldığı bilinmektedir. Yemeklik yağlar göz önünde bulundurulduğunda ise; bu bölge, ikincil oksidasyon ürünlerinden olan aldehitlere karşılık gelmektedir (Mahesar 2011). Elde edilen analiz sonuçlarına göre nar çekirdeği yağının rafinasyonu sırasında bu frekanstaki %T değişimi; *nötr* > *ham* > *rafine* > *vinterize* > *ağartma* şeklinde bir sıralama izlemiştir.

1420 ve 1115 cm^{-1}; bu frekanslarda genel olarak C-O esterine ait gerilme titreşimleri yer almaktadır. Yemeklik yağlar göz önünde bulundurulduğunda ise; bu bölge, yağlardaki cis yapılara karşılık gelmektedir (Mahesar 2011). Elde edilen analiz sonuçlarına göre nar çekirdeği yağının rafinasyonu sırasında bu frekanstaki %T değişimi; *ham* > *nötr* > *ağartma* > *vinterize* > *rafine* şeklinde bir sıralama izlemiştir.

1032 cm^{-1}; bu frekansda genel olarak yağda çözünen vitaminler (ADEK) yer almaktadır. Elde edilen analiz sonuçlarına göre nar çekirdeği yağının rafinasyonu sırasında bu frekanstaki %T değişimi; ham > nötr > ağartma = vinterize > rafine şeklinde bir sıralama izlemiştir. Yukarıdaki sıralama, HPLC ile yürütülen vitamin analiz sonuçları ile örtüşmektedir.

992-988 cm^{-1}; bu frekans aralığında genellikle konjuge =CH bağları yer almaktadır. Nar çekirdeği yağ numuneleri için bu aralıkta elde edilen veriler incelendiğinde; farklı rafinasyon kademelerinden alınan yağ numunelerinin farklı frekans noktalarında pik verdikleri görülmüştür; rafine ve vinterize nar çekirdeği yağları 992 cm^{-1}`de, ağartma kademesinden alınan yağ numunesi 990 cm$^{-1}$`de, nötr ve ham yağnumuneleri ise sırasıyla 989 cm^{-1} ve 988 cm^{-1}`de pik vermektedir. Farklı rafinasyon kademelerindeki yağ numuneleri için gözlenen bu farklılığın, yağ asitlerindeki cis trans yapılarda meydana gelen kaymalardan kaynaklandığı düşünülmektedir.

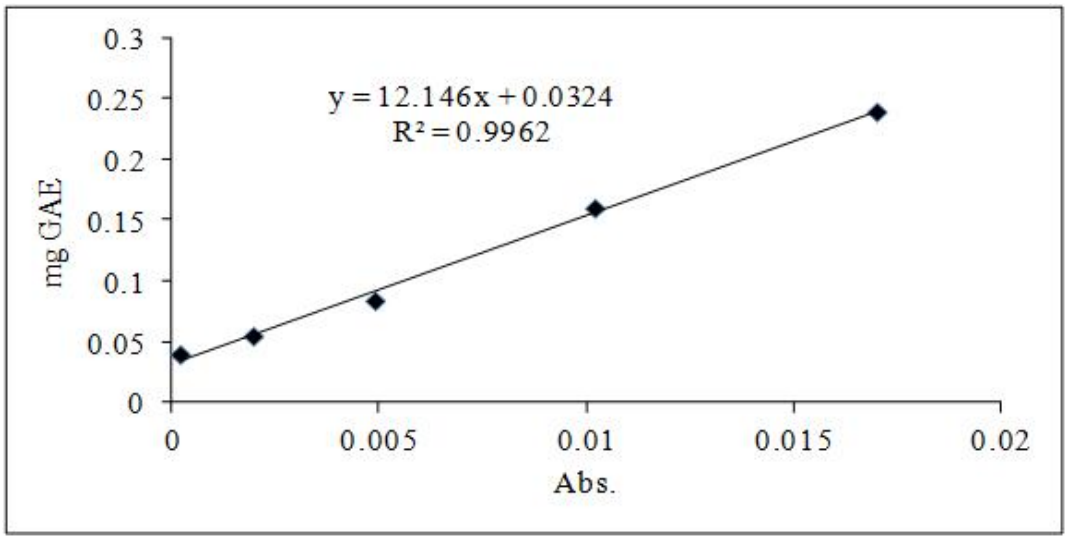
965 cm^{-1}; bu frekansta genel olarak konjuge =CH bağları yer almaktadır Özellikle *cis* ve *trans* yapıların görüldüğü bu frekansta çoğunlukla konjuge yağ asitlerinin *cis-cis*, *cis-trans* ve *trans-trans* yapıları yer almaktadır. Elde edilen analiz sonuçlarına göre nar çekirdeği yağının rafinasyonu sırasında bu frekanstaki %T değişimi; *nötr* > *rafine* > *vinterize* > *ağartma* > *ham* şeklinde bir sıralama izlemiştir.

4.10. Antioksidan aktivitesi ve toplam fenolik madde tayinleri

Okside olabilen substratların oksidasyonlarını önleyen veya geciktiren moleküller olarak tanımlanan antioksidanların; insan vücudunda açığa çıkan serbest radikallerin olumsuz etkilerini azaltan, parkinsondan - akut renal yetmezliğine, down sendromundan - serviks kanserine kadar birçok hastalığı önlemede etkinliği kanıtlanan bileşikler oldukları yapılan birçok çalışmada vurgulanmıştır (Sağlam. 2007, Aktürk. 2010). Doğal kaynaklarda farklı miktarlarda bulunan ve antioksidan etki gösteren maddelerin başında; vitaminler (özellikle C ve E), karotenoidler ve fenolik bileşikler gelmektedir (Sağlam. 2007). Antioksidan etki gösteren madde içeriği bakımından zengin bir kaynak olduğu düşünülen nar çekirdeği yağının antioksidan içeriğinin belirlenmesinde; farklı rafinasyon kademesinden alınan yağ numuneleri üzerinde toplam fenolik madde, serbest radikal yakalama aktivitesi (DPPH Testi) ve toplam antioksidan kapasitesi tayinleri belirlenen koşullarda gerçekleştirilmiştir. Yürütülen incelemelerden elde edilen sonuçlara ilişkin bilgiler, aşağıda ayrı başlıklar altında detaylı bir şekilde sunulmuştur.

4.10.1. Toplam fenolik madde tayini

Nar çekirdeği yağı rafinasyon prosesi süresince toplam fenolik madde miktarında meydana gelen değişimlerin belirlenmesi için yapılan deneylerde, ekstraksiyon işlemine tabii tutulan yağ numuneleri kullanılmış ve standart gallik asit çözeltileri yardımıyla çizilen kalibrasyon grafiğinden (**Şekil 4. 35**) faydalanılmıştır. Farklı rafinasyon kademelerinden alınan yağ numuneleri için hesaplanan toplam fenolik madde değerleri **Çizelge 4. 29**`de yer almaktadır.



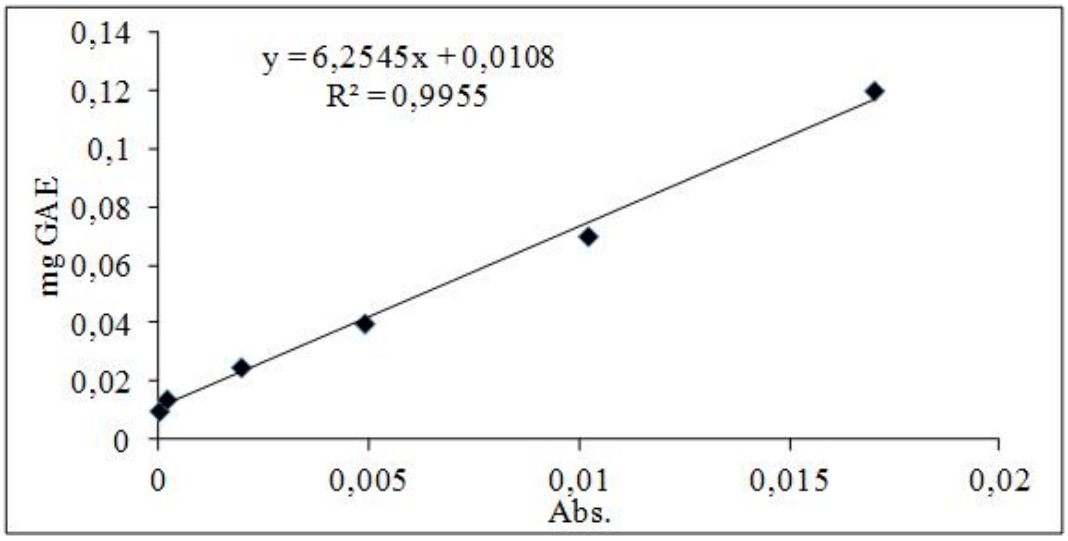
Şekil 4. 35 Toplam Fenolik Madde Tayini için Kalibrasyon Grafiği

Çizelge 4. 29 Kademelerine ait Toplam Fenolik Madde Sonuçları (mg GAE/kg oil)

	Toplam Fenolik Madde
Ham	55.38±1,51
Notr	51.72±1,35
Ağartma	38.48±1,30
Vinterize	34.15±1,15
Rafine	10.17±1,00

4.10.2. Serbest radikal yakalama aktivitesi (DPPH Testi) tayini

Antioksidan kapasite testleri arasında en yaygın kullanılanı, serbest radikal yakalama aktivitesidir. Bu test ismini kullanılan radikal cinsinden almaktadır (DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)). Nar çekirdeği yağı rafinasyon prosesi süresince DPPH serbest radikal yakalama etkinliği değişimlerinin belirlenmesi için yapılan deneylerde, ekstraksiyon işlemine tabii tutulan yağ numuneleri kullanılmış ve standart gallik asit çözeltileri yardımıyla çizilen kalibrasyon grafiğinden (**Şekil 4. 36**) faydalanılmıştır. Farklı rafinasyon kademelerinden alınan yağ numuneleri için hesaplanan DPPH serbest radikal yakalama etkinliği değerleri **Çizelge 4. 30**`de yer almaktadır.



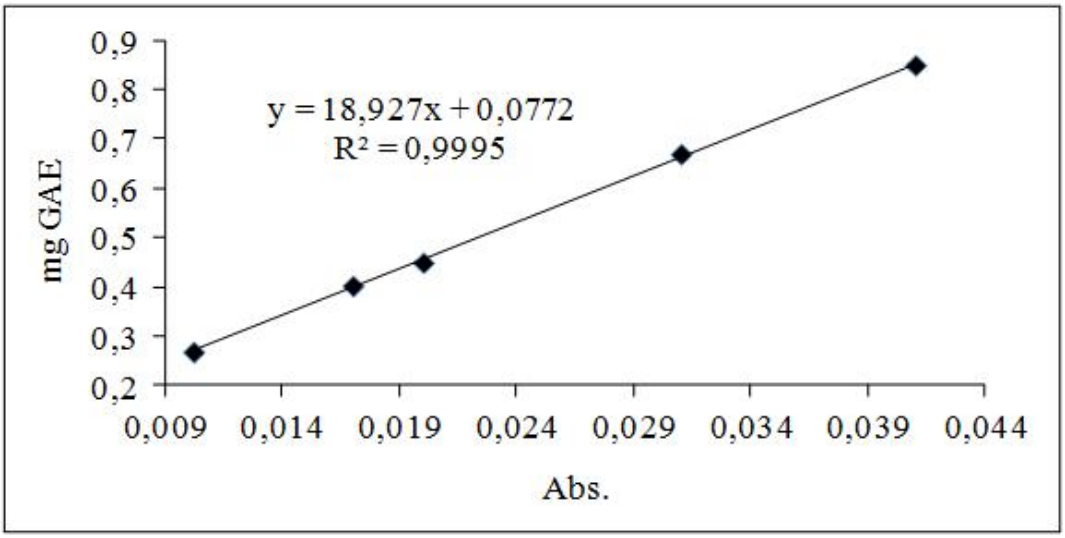
Şekil 4. 36 DPPH Testi için Kalibrasyon Grafiği

Çizelge 4. 30 Rafinasyon Kademelerine ait DPPH Testi Sonuçları (mg GAE/kg oil)

	DPPH Testi
Ham	16.43±1,00
Notr	8.34±0,91
Ağartma	3.27±0,55
Vinterize	1.99±0,35
Rafine	0.12±0,05

4.10.3. Toplam antioksidan kapasite tayini

Nar çekirdeği yağı rafinasyon prosesi süresince toplam antioksidan kapasitesi değişimlerinin belirlenmesi için yapılan deneylerde, yine ekstraksiyon işlemine tabii tutulan yağ numuneleri kullanılmış ve standart gallik asit çözeltileri yardımıyla çizilen kalibrasyon grafiğinden (**Şekil 4. 37**.) faydalanılmıştır. Farklı rafinasyon kademelerinden alınan yağ numuneleri için hesaplanan toplam antioksidan kapasitesi değerleri **Çizelge 4. 31**`de yer almaktadır.



Şekil 4. 37 Toplam Antioksidan Kapasitesi için Kalibrasyon Grafiği

Çizelge 4. 31 Rafinasyon Kademelerine ait Toplam Antioksidan Kapasitesi (mg GAE/kg oil)

	Toplam Antioksidan Kapasitesi
Ham	249.30±1,55
Notr	220.18±1,25
Ağartma	214.05±1,20
Vinterize	173.49±2,09
Rafine	131.19±1,85

Rafinasyon boyunca *toplam fenolik madde, DPPH serbest radikal yakalama aktivitesi* ve *toplam antioksidan kapasitesi* içeriğinde meydana gelen değişimlerin aşağıdaki sebeplerden kaynaklandığı düşünülmektedir:

- ***NaOH ile yapılan nötralizasyon kademesi sonunda;*** *toplam fenolik madde, DPPH serbest radikal yakalama aktivitesi* ve *toplam antioksidan kapasitesi* miktarının sırasıyla 51, 8 ve 220 ppm`e düştüğü gözlenmiştir. Meydana gelen bu değişimin, nötralizasyon işleminin sıcaklıkta, fosforik asit ve NaOH li ortamda yapılmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.
- ***Ağartma kademesi sonunda;*** *toplam fenolik madde, DPPH serbest radikal yakalama aktivitesi* ve *toplam antioksidan kapasitesi* miktarının sırasıyla, 38, 3 ve 214 ppm`e düştüğü gözlenmiştir. Meydana gelen bu değişimin, ağartma toprağının adsorpsiyon ve kompleks oluşum özelliği sebebiyle fenolik maddelerle etkileşime girmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

- ***Vinterizasyon kademesi sonunda*** *toplam fenolik madde, DPPH serbest radikal yakalama aktivitesi* ve *toplam antioksidan kapasitesi* miktarının sırasıyla, 34, 2 ve 173 ppm`e düştüğü gözlenmiştir. Bu kademede belirgin bir değişim olmamasının nedeni; sıcaklık, basınç ve katalitik etki gibi parametrelerin uygulanmadığından ve kristallendirme işlemi dışında herhangi bir işlemin uygulanmamış olmasıdır .
- ***2. ağartma kademesi sonunda (rafine yağ);*** *toplam fenolik madde, DPPH serbest radikal yakalama aktivitesi* ve *toplam antioksidan kapasitesi* miktarının sırasıyla, 10, 0.1 ve 131 ppm`e düştüğü gözlenmiştir. Meydana gelen bu azalışa, toprağının adsorpsiyon ve kompleks oluşum etkisi ile birlikte, fazla miktarda süzmeyi kolaylaştırıcı madde kullanılmasının neden olduğu düşünülmektedir.

Bu bölümde ayrıca; nar çekirdeği yağının antioksidan kapasitesi analizlerinden elde edilen veriler, diğer bazı yağ türlerininki ile, literatürde yer alan bilgiler ışığında karşılaştırılmaya çalışılmıştır (**Çizelge 4. 32). Çizelge 4. 32**`de görüldüğü gibi, toplam fenolik maddenin en fazla nar çekirdeği yağında bulunduğu yapılan çalışmalarda bulunmuştur (Minioti 2010, Saura-Calixto 2006).

Çizelge 4. 32 Nar Çekirdeği Yağının Farklı Yağlar ile ile Toplam Fenolik Madde ve Toplam Antioksidan Miktarı Karşılaştırması (mg GAE/kg oil)

	Bu Çalışmada	**Abbasi 2008**	**Minioti 2010**	**Saura-Calixto 2006**	
	Ham Nar	**Nar**	**Zeytin**	**Zeytin**	**Ayçiçek**
Toplam Fenolik Madde	55,38	Max 72,1	28,0-	17,3	14,0
DPPH	16.43		133-	-	
Toplam Antioksidan Kapasitesi	249.30	-	-	-	-

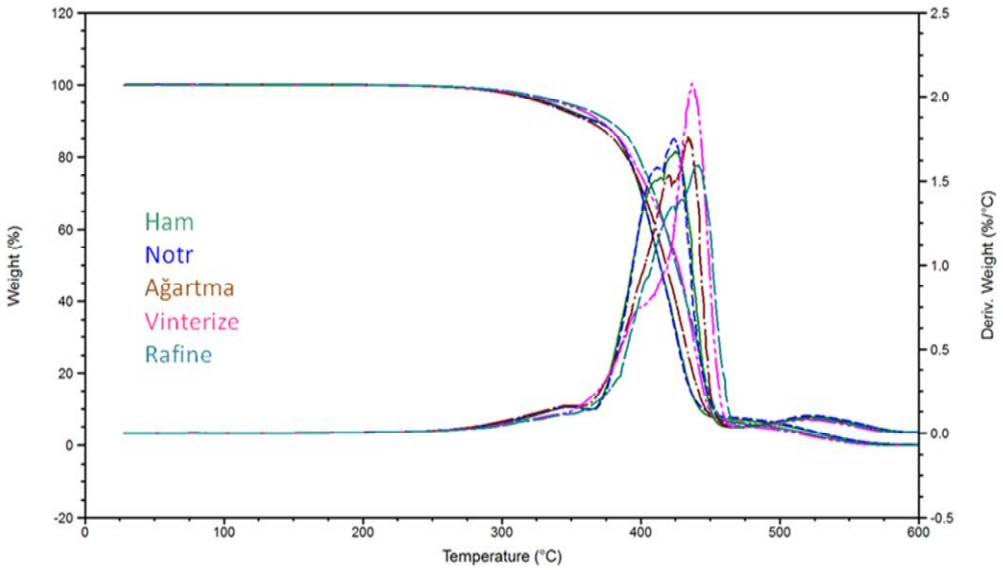
4.11. Termogravimetrik Analizler

Nar çekirdeği yağı rafinasyon prosesi süresince sıcaklık artışı ile yağda meydana gelebilecek yapısal değişiklikler hakkında fikir edinmek amacıyla gerçekleştirilen termogravimetrik (TG) ve diferansiyel termogravimetrik (DTG) analizler sonunda elde edilen TGA ve DTG grafikleri **Şekil 4. 38**' da yer almaktadır. Analizler sonucunda elde edilen veriler; farklı rafinasyon kademelerinden alınan yağ numunelerinin, benzer major ve minör bileşen içeriğine sahip olmaları sebebiyle termogramlarında çok küçük farklılıkların olduğunu göstermiştir (**Şekil 4. 39**).

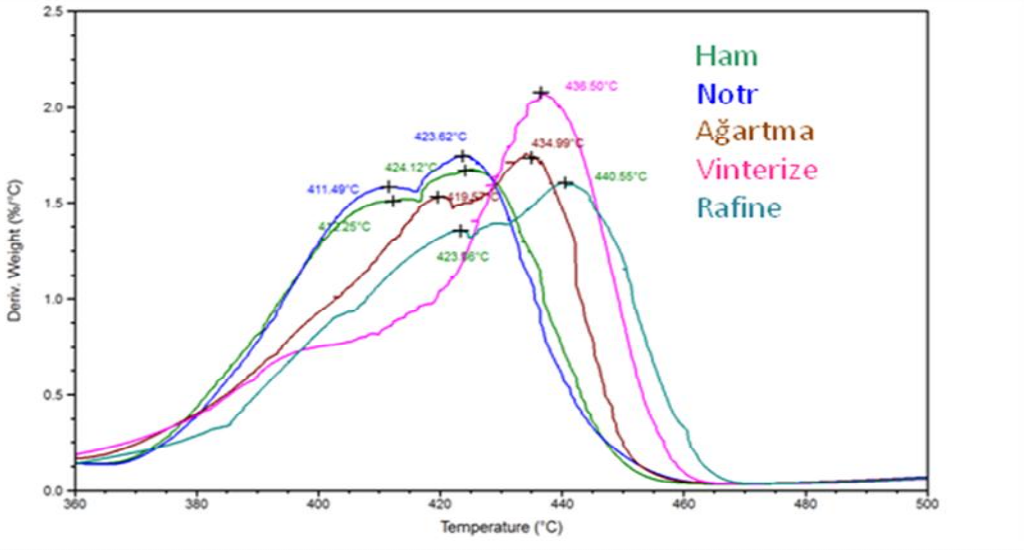
Sıcaklık değişimiyle numunede meydana gelen kütle kaybının hangi noktalarda daha belirgin olduğunu anlamak için kullanılan ve TGA eğrilerinin birinci türevinin, zaman ya da sıcaklığa bağlı değişimini gösteren DTG eğrileri incelendiğinde; numunede yer alan yağ harici maddelerin, 340 °C civarında bozunmaya başladıkları ve bu bozunmanın rafinasyon kademelerine göre farklı bir değişim izlediği tespit edilmiştir (**Şekil 4. 40**).

Çizelge 4. 33 TGA Deney Paramatreleri

Dinamik hava atmosferi (mL/min)	**Rampa**	
	°C/min	**°C**
250		30
	100	600

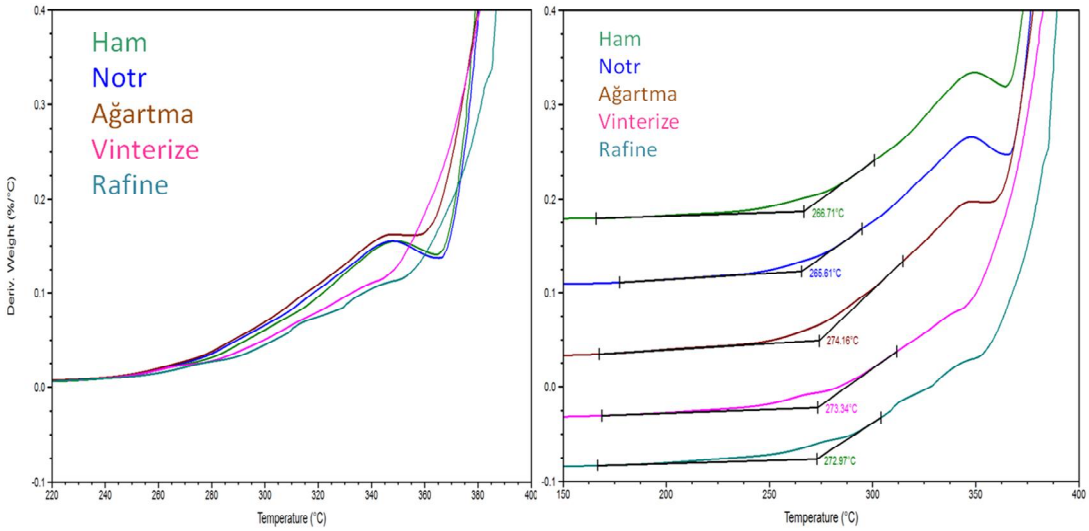


Şekil 4. 38 Rafinasyon Kademeleri Termogravimetrik (TG) ve Diferansiyel Termogravimetrik (DTG) Tarama Sonuçlarına Ait Termogramlar



Şekil 4. 39 Rafinasyon Kademeleri Diferansiyel Termogravimetrik (DTG) Tarama Sonuçlarına Ait Termogram

Rafinasyon prosesinden alınan numunelerin sıcaklık değişimine karşı sergiledikleri davranışların gözlenmesi, dolayısıyla rafinasyon prosesinin yağda bulunan yağ harici maddelerin uzaklaştırılması üzerine olan etkisinin incelenmesi amacıyla; analizlerde rafine nar çekirdeği yağı sonucu baseline olarak alınmış ve bu değer diğer basamaklardaki numunelerden çıkarılarak **Hata! Başvuru kaynağı bulunamadı.**`de gösterilen toplu termogram elde edilmiştir. Elde edilen termogramdan da görüldüğü gibi; rafinasyon prosesi boyunca, ham nar çekirdeği yağından rafine nar çekirdeği yağına kadar numunelerde belirli bir kütle kaybı meydana gelmiştir. Bu kütle kaybının yağ harici safsızlıklardan kaynaklandığı düşünülmekle birlikte, yağ numunelerinin oldukça fazla sayıda minör bileşen ihtiva etmesi sebebiyle, meydana gelen kütle kayıplarının hangi maddelerden kaynaklandığı ile ilgili herhangi bir yorumda bulunulmamıştır. Fakat, elde edilen veriler ışığında, rafine nar çekirdeği yağının diğer rafinasyon basamaklarından alınan yağ numunelerine kıyasla çok daha az yağ dışı madde içerdiği söylenebilir.



Şekil 4. 40 Rafinasyon Kademeleri DTG Tarama Sonuçlarına Ait Büyütülmüş Termogramlar

4.12. Yağ Analiz Sonuçları

Tez çalışması süresince yapılan analizlere ait sonuçlar **Çizelge 4. 34**`da verilmiştir.

Çizelge 4. 34 Nar Çekirdeği Yağı Rafinasyon Kademeleri Toplu Analiz Sonuçları

		Ham	Notr	Ağartma	Vinterize	Rafine
YAĞ ASİT KOMPOZİSYONU (%)	**C14:0**	0.01±0.00	0.01±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.01
	C16:0	2.49±0.01	2.41±0.00	3.64±0.01	3.64±0.05	3.70±0.04
	C16:1	0.01±0.00	0.01±0.00	0.04±0.00	0.04±0.01	0.04±0.00
	C17:0	0.03±0.00	0.04±0.00	0.04±0.00	0.04±0.00	0.05±0.01
	C17:1	0.06±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
	C18:0	1.82±0.01	1.73±0.01	2.29±0.01	2.24±0.03	2.17±0.03
	C18:1ω9t	TED	0.01±0.00	0.01±0.00	TED	TED
	C18:1ω9c	3.91±0.02	3.65±0.01	6.68±0.69	7.81±0.02	8.19±0.63
	C18:1 iso	0.97±0.01	1.00±0.01	1.06±0.71	TED	0.31±0.62
	C18:2ω6t	0.19±0.00	0.19±0.00	0.17±0.01	0.18±0.00	0.19±0.01
	C18:2ω6c	4.73±0.00	4.60±0.00	16.29±0.01	15.69±0.03	14.77±0.03
	C20:0	0.38±0.00	0.35±0.00	0.32±0.00	0.34±0.00	0.35±0.02
	C18:3ω3	TED	TED	0.05±0.03	0.07±0.01	0.09±0.01
	C20:1	0.53±0.03	0.51±0.00	0.45±0.03	0.55±0.08	0.46±0.04
	C20:2	0.13±0.04	0.20±0.01	0.14±0.01	0.16±0.01	0.10±0.05
	C22:0	0.05±0.04	0.05±0.00	0.05±0.00	0.07±0.00	0.07±0.01
	C23:0	0.20±0.00	0.20±0.00	0.17±0.01	0.14±0.09	0.19±0.02
	Pünisik Asit	76.57±0.02	78.51±0.02	59.93±0.62	55.89±0.56	57.73±0.13
	Katalpik Asit	6.47±0.03	5.46±0.01	6.92±0.14	9.71±0.16	9.02±0.01
	β-eleostearik Asit	1.45±0.03	1.06±0.00	1.56±0.13	3.36±0.25	2.55±0.05

STEROL KOMPOZİSYONU (ppm)	**Kolesterol**	36.5±0.1	23.5±0.1	31.9±0.1	24.6±0.3	26.3±0.5
	Kampasterol	473.6±0.1	400.9±0.7	383.1±0.2	408.1±0.2	377.6±0.2
	Stigmasterol	257.5±0.2	220.4±0.2	215.3±0.1	237.6±0.2	215.4±0.2
	β- Sitositerol	4154.2±0.1	4083.2±0.1	3905.9±0.1	3797.0±0.2	3482.2±0.1
	Avenesterol	254.4±0.3	249.1±0.2	229.7±0.1	244.2±0.1	212.0±0.0
	Toplam	5176.3±0.2	4977.2±0.9	4765.8±0.4	4711.5±0.7	4313.3±0.6
VAKS KOMPOZİSYONU (ppm)	**C40**	14.2 ±0.2	13.8±0.3	18.1±0.0	4.4±0.2	4.2±0.2
	C42	29.5±0.7	29.6±1.6	32.0±1.4	8.6±0.2	7.8±0.4
	C44	25.2±0.6	25.4±0.6	32.6±1.5	8.3±0.6	7.9±0.4
	C46	7.5±0.5	6.1±0.1	17.3±0.3	4.6±0.3	4.2±0.3
	Toplam	76.4±1.7	74.9±1.8	75.0±3.2	25.8±0.5	24.1±1.17
POLİMERİK MADDE (%)	**Trigliserit**	88.70±0.07	89.54±0.36	87.97±0.13	88.69±0.07	89.30±0.06
	Digliserit	2.54±0.04	2.58±0.10	2.81±0.07	2.89±0.00	2.64±0.05
	Monogliserit	0.50±0.02	0.42±0.05	0.43±0.05	0.45±0.01	0.43±0.03
	Serbest Yağ Asitler	1.26±.0.01	1.34±0.12	1.50±0.06	1.69±0.02	1.45±0.05
	Toplam Polimerik Madde	7.00±0.07	6.12±0.09	7.30±0.06	6.28±0.07	6.18±0.04
POLAR VE APOLAR MADDE (%)	**Apolar**	83.1±0.4	84.8±0.3	88.0±0.3	85.1±0.5	78.9±0.2
	Polar	16.9±0.4	15.2±0.3	12.0±0.3	14.9±0.5	21.1±0.2
POLAR FRAKSİYON (%)	**Polimerik Triaçilgliserol**	24.7±0.1	21.8±0.1	25.2±0.1	22.4±0.1	16.5±0.1
	Oxd. Triaçilgliserol	58.5±0.1	58.2±0.1	60.8±0.1	57.5±0.1	69.3±0.1
	Oxd. Di açilgliserol	9.4±0.1	11.8±0.1	8.9±0.1	11.9±0.1	8.0±0.1
	Oxd. Mono açilgliserol	0.6±0.1	0.5±0.1	0.3±0.1	0.4±0.1	0.5±0.1
	FFA	6.8±0.1	7.6±0.1	4.8±0.1	7.8±0.1	5.8±0.1
APOLAR FRAKSİYON (%)	**Polimerik Triaçilgliserol**	0.1±0.1	0.1±0.1	0.2±0.1	0.1±0.1	0.2±0.1
	Triaçilgliserol	98.8±0.1	98.0±0.1	97.7±0.1	98.9±0.1	98.4±0.1

VİTAMİN-TOKOL (ppm)	**Vitamin A**	6.54±0.34	3.57±0.46	2.87±0.13	2.69±0.02	2.06±0.05
	Vitamin D	21.52±0.29	2.61±0.17	2.27±0.24	1.91±0.18	1.16±0.09
	Vitamin K	439.60±0.20	386.88±0.18	301.49±0.06	281.35±0.06	192.54±0.21
	α-T	32.35±1.34	36.70±0.14	19.13±3.05	20.90±0.85	18.40±2.62
	α-T_3	22.75±2.47	21.10±0.57	8.47±1.01	16.87±1.18	8.20±0.87
	β-T	18.95±2.33	13.90±4.53	18.97±3.23	16.60±2.09	20.83±1.60
	β-T_3	52.90±2.55	43.40±3.25	2.77±0.57	29.20±0.52	10.79±5.70
	γ-T	935.10±6.36	858.05±6.01	613.07±11.50	595.70±8.72	544.20±15.70
	γ-T_3	37.22±0.03	34.02±0.03	5.60±0.01	5.41±0.03	3.21±0.01
	δ-T	57.20±0.57	54.25±0.35	9.17±0.21	51.73±0.74	57.33±1.29
	Σ-T	1043.60±2.65	962.90±2.76	660.33±4.50	684.93±3.10	640.77±5.30
	Σ-T_3	112.87±1.68	98.52±1.28	16.83±0.53	51.48±0.57	22.20±2.19
	Σ -Tokol	1156.47±2.24	1061.42±2.13	677.17±2.80	736.41±2.02	662.97±3.97
SPEKTROSKOPİK ANALİZLER	**Klorofil (ppb)**	45.66	40.06	38.71	30.23	12.62
	Karoten (ppb)	3231.26	2808.97	1164.55	1269.46	747.51
	232 nm	3,3	1,0	2,4	0,9	2,2
	269 nm	5,7	4,7	3,7	3,8	5,4
FTIR	**cm^{-1}**	% T				
	3015	92,3	92,6	93.2	93.1	93
	2924	67.3	67.2	66.4	66.3	65.9
	2854	76.4	76.4	75.8	75.7	75.6
	1742	53.3	53.4	54	54.1	53.9
	1420	88.8	89.3	90.5	90.5	90.6
	1237	82.4	82.5	82.9	83	82.8
	1115	78.7	78.9	79.9	80.2	80.1
	1032	90.2	90.3	90.5	90.5	90.6
	990	67.8	66.3	69.2	67.6	66.5
	965	86.4	85.3	86.3	85.9	85.4

TRİGLİSEİT (%)	**PuPuPu**	32.99±0.26	30.87±0.00	23.57±0.04	19.95±0.17	14.37±0.20
	PuPuKa	27.72±0.13	27.96±0.04	25.37±0.03	25.25±0.15	24.30±0.22
	PuKaKa	10.11±0.05	11.38±0.03	12.88±0.02	15.02±0.07	18.47±0.13
	PuKaEl	2.11±0.02	2.68±0.01	3.89±0.02	5.17±0.04	7.90±0.01
	PuElEl	0.38±0.04	0.49±0.00	0.85±0.02	1.24±0.01	2.28±0.03
	PuPuL+PuElL	4.41±0.02	4.34±0.01	3.65±0.02	3.39±0.03	3.17±0.00
	PuLPu+PuKaL	2.74±0.03	2.88±0.02	2.86±0.04	3.03±0.02	3.32±0.00
	LPuKa+LPuEl+LLPu	0.88±0.09	1.02±0.04	1.27±0.03	1.69±0.03	2.16±0.09
	PuPuO	6.49±1.31	5.55±0.03	4.61±0.09	4.20±0.05	3.56±0.01
	PuKaO+PuOPu	2.73±0.41	2.77±0.02	2.86±0.04	3.05±0.06	3.38±0.08
	PuPuP+PuPO	2.84±0.90	3.17±0.06	2.57±0.05	2.42±0.04	2.03±0.05
	PuOEl+PuPKa	1.32±0.85	1.84±0.02	2.01±0.02	2.35±0.04	2.81±0.02
	LPuP+LPuEl+LOKa	0.26±0.11	0.29±0.04	0.41±0.03	0.60±0.06	0.92±0.05
	LLL	0.17±0.03	0.16±0.03	3.76±0.05	3.61±0.08	3.20±0.03
	OLLn	0.23±0.01	0.23±0.03	0.20±0.01	0.23±0.01	0.19±0.01
	PLLn	TED	TED	0.55±0.03	0.45±0.08	0.43±0.01
	SSPu	0.71±0.05	0.65±0.02	0.54±0.04	0.53±0.11	0.63±0.21
	OLL	0.70±0.03	0.70±0.02	1.75±0.04	1.54±0.08	1.19±0.08
	PLL	2.25±0.25	2.02±0.04	1.15±0.06	1.36±0.12	0.99±0.03
	OOL	0.95±0.03	1.00±0.03	2.10±0.04	2.08±0.03	1.77±0.05
	POL+SLL	TED	TED	1.44±0.05	1.39±0.06	1.28±0.03
	PPL	TED	TED	0.57±0.11	0.49±0.16	0.52±0.11
Antioksidan Kapasite (mg GAE/kg yağ)	**Toplam Fenolik Madde**	55.38±1,51	51.72±1,35	38.48±1,30	34.15±1,15	10.17±1,00
	DPPH Testi	16.43±1,00	8.34±0,91	3.27±0,55	1.99±0,35	0.12±0,05
	Toplam Antioksidan Kapasitesi	249.30±1,55	220.18±1,25	214.05±1,20	173.49±2,09	131.19±1,85

Fiziksel veKimyasal Tayinler	**% Serbest Yağ Asidi**	1,50 ± 0,05	0,06 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,01
	Peroksit Sayısı (meg/kg O2)	2,4 ± 0,1	0,8± 0,1	0,4± 0,1	0,4± 0,1	0,4± 0,1
	Renk (Lovibont)	8,3-70	Sep-70	4,8-70	3,8-70	2,8-70
	Sabun (ppm)	0	0	0	0	0
	Bulanıklık (NTU)	2,40± 0,05	3,95± 0,05	2,00± 0,05	1,48± 0,05	1,35± 0,05
	İyot Sayısı (g I_2/100g yağ)	234± 1	235± 1	214± 1	215± 1	215± 1

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Yüksek miktarda konjuge yağ asidi ve tokoferol-tokotrienol içeriği ile diyetin önemli bir parçasını oluşturabilecek potansiyele sahip olan, fakat ülkemizde ve dünyada istenilen ölçüde üretilmeği için kullanımı son derece kısıtlı bulunan, şimdiye kadar yemeklik yağ olarak özellikleri incelenmemiş nar çekirdeği yağının; yumuşak rafinasyon koşullarında gerçekleştirilen rafinasyon kademelerinin her birinde meydana gelen değişiklikleri incelemek ve kapsamlı bir şekilde değerlendirmek amacıyla yürütülen bu çalışmada; her bir rafinasyon kademesinden alınan nar çekirdeği yağı numuneleri üzerinde yağ asit kompozisyonu, sterol, vaks, polar ve polimerik madde, tokoferol-tokotrienol, vitamin, trigliserit, antioksidan kapasitesi, spektrofotometrik UV-Visible - FTIR ve TGA/DTG analizleri, GC-MS, GC, HPLC, Uv-Visible Spektrometre, FTIR ve TGA cihazları yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Çalışmalar sırasında bazı analizler için resmi olarak yayımlanmış standart metotlar kullanılırken; yağ asit kompozisyonu, sterol, tokoferol–tokotrienol, vitamin gibi bazı analizler için ise, nar çekirdeği yağı ve kendisi gibi özel yağ sınıfında bulunan diğer bazı yağlar için tarafımızdan geliştirilen metotlar kullanılmıştır. Böylece deneyler sonunda, kesinliği, tekrarlanabilirliği ve doğruluğu daha yüksek sonuçlar elde edilebilmiştir. Her bir rafinasyon kademesinden alınan nar çekirdeği yağı numuneleri üzerinde yürütülen analizlerden elde edilen veriler yardımıyla ulaşılan sonuçlar aşağıda özetlenmiştir:

- ***Yağ Asit Kompozisyonu Analizleri:*** Nar çekirdeği yağına farklı ve önemli bir yağ olma özelliği kazandıran yağ asit kompozisyonunun belirlenmesine yönelik analizler, rafinasyon prosesi sırasında nar çekirdeği yağının yağ asit kompozisyonun, izomerizasyondan dolayı önemli oranda değişime uğradığını göstermiştir. Örneğin; nar çekirdeği yağında oldukça yüksek oranda bulunan Pünisik asit miktarı, ham yağda % 76.57 iken, rafine yağda bu değer % 57.73`e kadar düşmüştür. Herbir rafinasyon basamağından alınan yağ numunelerinin yağ asit kompozisyonları sonucunda; izomerizasyon oluşumuna en fazla sebep olan rafinasyon basamaklarının ağartma ve ikinci ağartma (rafine) kademeleri olduğu gözlenmiştir.

Yağ asit kompozisyonu analizlerinde ön işlem basamağını teşkil eden ve farklı sıcaklık & ortam şartlarında (asidik ve bazik) yürütülen, yağ asitlerinin metil ester formlarına dönüştürülmesi işlemleri sonucunda elde edilen veriler; BF_3 reaktifi

kullanılarak asidik ortamda gerçekleştirilen esterleştirme işleminin, yağ numunesinde bulunan konjuge yağ asitlerinin önemli derecede izomerizasyonuna sebep olduğunu, alkali metilleme tekniği ile yapılan metilleme işleminin ise gözle görülür ölçüde bir değişim meydana getirmediğini göstermiştir. Bu veriler ışığında; oldukça yüksek konjuge yağ asidi içeriğine sahip nar çekirdeği yağının yağ asit kompozisyonu analizinde, esterleştirme işleminin bazik ortamda yapılmasının daha uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

- ***Sterol Analizleri:*** Yağların sabunlaşmayan bölümlerinin önemli bir parçasını oluşturan sterollerin analizi sonucunda; nar çekirdeği yağı numunelerinin sterol miktarlarının, rafinasyon prosesi boyunca azaldığı ve en fazla azalışın ikinci ağartma (rafine) basamağında olduğu tespit edilmiştir. Bu azalmanın, ikinci ağartma (rafine) basamağında kullanılan süzmeyi kolaylaştırıcı maddenin, sterolleri önemli ölçüde adsorplaması sonucu meydana geldiği sonucuna varılmıştır.

- ***Vaks Analizleri:*** Uzun zincirli yağ asitleri ile alkollerin esterleşmesi sonucu oluşan vaksların analizi sonucunda; nar çekirdeği yağı numunelerinin vaks miktarlarının, rafinasyon prosesi boyunca azaldığı ve en fazla azalışın vinterizasyon basamağında olduğu tespit edilmiştir. Bu azalmanın, winterizasyon basamağının düşük sıcaklıkta (4-6^{o}C) gerçekleştirilmesinden ve işlem sırasında çekirdek oluşumunu hızlandırarak daha büyük vaks kristalleri elde etmek için çekirdek oluşturucu malzeme kullanılmasından kaynaklandığı sonucuna varılmıştır.

- ***Polar ve polimerik Madde Analizleri:*** Nar çekirdeği yağının rafinasyon prosesi boyunca; polar ve polimerik madde miktarlarında artış ve azalışlar olduğu gözlenmiştir. Bu analizler için, rafinasyon proses basamaklarından vinterizasyon basamağının kilit nokta konumunda olduğu sonucuna varılmıştır. Şöyle ki; nar çekirdeği yağının rafinasyonu sırasında polimerik madde miktarı ağartma basamağına kadar sürekli bir artış göstermiş, vinterizasyon basamağında ise, oluşan bu polimerlerin vakslarla birlikte yağdan uzaklaştırıldığı tespit edilmiştir. Nihai ürün olan rafine nar çekirdeği yağındaki toplam polimerik madde içeriğinin, diğer rafinasyon basamaklarındakine kıyasla en düşük olması ise, rafinasyon işleminin ne kadar doğru ve başarılı bir şekilde yapıldığının kanıtı olarak değerlendirilmiştir.

- ***Vitamin ve Tokol Analizleri:*** Vitamin ve Tokol analizlerinden elde edilen sonuçlar; nar çekirdeği yağının, diğer yemeklik yağlara kıyasla oldukça zengin bir

vitamin ve tokol profiline sahip olduğunu göstermiştir. Nar çekirdeği yağında en fazla miktarda bulunan tokol homoloğunun ise gama-tokoferol olduğu tespit edilmiştir. Diğer sabunlaşmayan maddelerde söz konusu olduğu gibi, nar çekirdeği yağının vitamin ve tokol içeriğinde de rafinasyon prosesi boyunca sürekli bir azalış meydana gelmiş, en fazla vitamin kaybının meydana geldiği rafinasyon basamağının ise nötralizasyon olduğu, en fazla tokol kaybının meydana geldiği rafinasyon basamağı ağartma basamağı olarak tespit edilmiştir. Nötralizasyon basamağında meydana gelen bu kaybın; degumming sırasında fosforik asit, nötralizasyon sırasında NaOH kullanılmasından, işlemin sıcakta yapılmasından ve ortamda hava bulunmasından dolayı, vitamin ve tokollerin oksidasyona uğramasından kaynaklandığı, ağartma basamağında meydana gelen bu kaybın; sıcaklıkla birlikte ağartma toprağının adsorpsiyon ve katalitik özelliği sebebiyle vitaminleri ve tokoferolleri adsorbe etmesinden ve oksidasyona uğratmasından kaynaklandığı sonucuna varılmıştır.

- ***Trigliserit Analizleri:*** Yağ asit kompozisyonu analiz sonuçları ile oldukça parelel bir yaklaşım sergileyen trigliserit analiz sonuçları, rafinasyon prosesi sırasında nar çekirdeği yağının trigliserit içeriğinin, yağ asitlerinin izomerizasyona uğramaları sebebiyle önemli oranda değişime uğradığını göstermiştir.

- ***Spektrofotometrik UV-Vis Analizleri:*** Analizler sonucunda elde edilen spektum tarama sonuçları, nar çekirdeği yağında bulunan *klorofil* ve *β-karoten* renk pigmenetlerinin rafinasyon prosesi boyunca sürekli olarak azaldığını, *birincil ve ikincil oksidasyon ürünlerinin* miktarlarında ise düzensiz değişimlerin meydana geldiğini göstermiştir. Rafinasyon prosesi sonunda; yağların oksidasyon hızını arttırdığı düşünülen *klorofil* değerinin 12 ppb`ye kadar düşmesi, oksidasyona karşı direnci arttırdığı bilinen *β-karoten* değerinin ise 747 ppb gibi bir değerde kalması, rafinasyon basamaklarının başarılı bir şeklide tamamlandığının göstergesi olarak kabul edilmiştir.

- ***Spektrofotometrik FTIR Analizleri:*** 650-4000 cm^{-1} arasında gerçekleştirilen spektrum tarama sonuçları, nar çekirdeği yağında bulunan birçok major ve minör bileşiğin tespiti için etkin bir biçimde kullanılmış, analizler sayesinde rafinasyon prosesi boyunca nar çekirdeği yağındaki bu bileşiklerin yapılarında ve miktarlarında meydana gelen değişiklikler kolayca gözlenebilmiştir.

- ***Antioksidan Kapasite Tayinleri:*** Antioksidan kapasite tayinlerinden elde edilen sonuçlar; nar çekirdeği yağının diğer pek çok yemeklik yağa göre oldukça fazla

fenolik madde ve *aktioksidan* içeriğine sahip bir yağ olduğunu, fakat nar çekirdeği yağının antioksidan içeriğinin belirlenmesinde kullanılan toplam fenolik madde miktarı, serbest radikal yakalama aktivitesi ve toplam antioksidan kapasitesi değerlerinin, uygulama koşulları sebebiyle rafinasyon prosesi boyunca sürekli olarak azaldığını göstermiştir.

- ***Termogravimetrik Analizler:*** Nar çekirdeği yağının, sıcaklık artışı ile yapısında meydana gelebilecek değişiklikler hakkında fikir edinmek amacıyla gerçekleştirilen *TGA/DTG* analiz sonuçları; nar çekirdeği yağının termal olarak kararlı, ancak oksidatif stabilite açısından kararsız bir yapı sergilediğini göstermiştir.

Sonuç olarak; bu tez çalışması ile, şimdiye kadar yemeklik yağ olarak özellikleri incelenmemiş nar çekirdeği yağının birçok fiziksel ve kimyasal özellikleri ayrıntılı bir şekilde irdelenmiş; elde edilen veriler, nar çekirdeği yağının yüksek konjuge linolenik yağ asidi içeriği (~%80), termal kararlılığı, yüksek antioksidan kapasitesi ve E vitamini içeriği gibi üstün özellikleri sebebiyle ile özel bir yağ olarak kabul edilmesi ve sağlıklı bir ürün olarak kullanılması gerektiğini ortaya koymuştur.

KAYNAKLAR

Abbasi. H.. Rezaei. K.. Emamdjomeh. Z.. Mousavi. S.M.E..2008. Effect of various extraction conditions on the phenolic contents of pomegranate seed oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 110. 435–440.

Abbasi. H.. Rezaei.K.. Rashid. L.. 2008. Extraction of essential oils from the seeds of pomegranate using organic solvents and supercritical CO_2. *J Am Oil Chem Soc* 85.83–89.

Akdeniz. G.. 2010. U*urtica dioica* (ısırgan otu) bitkisinin Türkiye'deki etnobotanik önemine dair, bölgesel antioksidan kapasitesi, toplam fenolik içeriği ve moleküler düzeydeki farklılıklarının tespiti. Yüksek Lisans Tezi. *Fatih Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*. İstanbul.1-33

Aktürk. E.. 2010. Mührüsüleyman (*Polygonatum Orientale*) bitkisinin i*n vitro* antioksidan kapasitesinin incelenmesi ve bazı vitamin içerikleri. Yüksek Lisans Tezi. *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*. Tokat.1-33

Alfa Laval Separation.1995. General Manual MA 0901, *Methods for Analysis/Application*,

Andrikopoulos. N.K.. Brueschweiler. H.. Felber. H.. Taeschler. Ch.. 1991. HPLC analysis of phenolic antioxidants, tocopherols and triglycerides. *J. Am. Oil Chem. Soc*. 68. 359-364.

AOCS. 1998. *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society*. 4th edition, Champaign, IL: AOCS Press.

Aragón. Á.Cortés. J.M. Toledano. R.M. Villén J. Vázquez. A..2011. Analysis of vaks esters in edible oils by automated on-line coupling liquid chromatography–gas chromatography using the through oven transfer adsorption desorption (TOTAD) interface. *Journal of Chromatography A*, 1218. 4960–4965.,

Arao K.. Wang. Y.M. Inoue. N.. Hirata. J.. Cha. J.Y.. Nagao. K.. and Yanagita. T.. 2004. Dietary effect of pomegranate seed oil rich in 9cis, 11trans, 13cis conjugated linolenic acid on lipid metabolism in obese, hyperlipidemic OLETF Rats. *Lipids in Health and Disease* 3:24. 1-7.

Arslan. F.N.. 2009. Ülkemizde üretilen pamuk yağlarının rafinasyonunun iyileştirilmesiyle kullanım verimliliklerinin artırılması. Yüksek Lisans Tezi. *Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*. Konya.1-18

Ayyıldız. H.F.. 2010. Otomatikleştirilmiş akış enjeksiyon sistemleriyle yağ analiz metotlarının geliştirilmesi. Doktora Tezi. *Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*. Konya.1-13

Başoğlu. F.. 2006. Yemeklik Yağ Teknolojisi. Nobel Yayınları. No:956. Ankara

Benveniste. P.. 2002. Sterol metabolism. In E. M. Meyerowitz. & C. Somerville (Eds.). *The Arabidopsis book* (pp. 1–31). American Society of Plant Biologists.

Bilber. O.. 2010. Bazı gıdalarda suda ve yağda çözünen vitaminlerin eşzamanlı tayin metodunun optimizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. *Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*. Konya.1-12

Bozkurt İ.. 2005. Kalsiyum ve vitamin D ilavesinin sporcularda kemik mineral yoğunluğu ve bazı kan parametreleri üzerine etkisinin belirlenmesi. Doktora Tezi. *Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*. Konya.20-21

Caldwell. J.D.. Cooke. B.S. and Greer. M.K.. 2011. High Performance Liquid Chromatography–Size Exclusion Chromatography for Rapid Analysis of Total Polar Compounds in Used Frying Oils. *J Am Oil Chem Soc*. 88.1669-1674.

Caligiani. A.. Bonzanini F.. Palla. G.. Cirlini. M…Bruni. R.. 2010. Characterization of a Potential Nutraceutical Ingredient:Pomegranate (Punicagranatum L.) Seed Oil Unsaponifiable Fraction. *Plant Foods Hum Nutr.* 65(3). 277-83.

Cao. Y.. Gao. H.L.. Chen. J.N.. Chen.. Z.Y Yang. L.... 2006. Identification and Characterization of Conjugated Linolenic Acid Isomers by Ag^{+}-HPLC and NMR. *J. Agric. Food Chem.* 54. 9004−9009.

Cao. Y.. Yang. L.. Gao. H.L.. Chen. J.N.. Chen.. Z.Y.. Ren. Q.S.. 2007. Re-characterization of three conjugated linolenic acid isomers by GC–MS and NMR. *Chemistry and Physics of Lipids.* 145. 128–133.

Carelli. A.A.. Frizzera.L.M.. Forbito.p.R..and Crapiste. G.H.. 2002. Vaks Composition of Sunflower Seed Oils. *JAOCS* 79. 763–768

Cheikh. R.S.. Besbes. S.. Lognayb. G.. Blecker. C.. Deroanne. C.., Attia. H..2008. Sterol composition of black cumin (Nigella sativa L.) and Aleppo pine (Pinus halepensis Mill) seed oils. *Journal of Food Composition and Analysis* 21. 162 – 168.

Chen. J.. Cao. Y.. Gao. H.. Yang. L.. Yu. Z.. 2007. Isomerization of conjugated linolenic acids during methylation. *Chemistry and Physics of Lipids* 150. 136–142.

Cherif. A.. Belkacemi. K.. Kallel. H.. Angers. P.. Arul. J.. Boukhchina. S.. 2009. Phytosterols, unsaturated fatty acid composition and accumulation in the almond kernel during harvesting period: Importance for development regulation. *C. R. Biologies* 332. 1069–1077

Chiou. A.. Kalogeropoulos. N.. Salta. F.N.. Efstathiou. P.. Andrikopoulos. N.K.. 2009. Pan-fryin g of French fries in three different edible oils enriched with olive leaf extract: Oxidative stability and fate of microconstituents. *Food Science and Technology* 42. 1090–1097.

Christie. W. W.. 2011. *Sterols 3. Sterols and theır conjugates from plants and lower organısms. Structure, occurrence, bıochemıstry and analysıs*. [online]. James Hutton Institute (and Mylnefield Lipid Analysis), Invergowrie, Dundee (DD2 5DA), Scotland. http://www.lipidlibrary.aocs.org/Lipids/plant_st/index.htm. [Ziyaret Tarihi: 14 Ocak 2012].

Christie. W. W.. 2011. *Vakses. Structure, composıtıon, occurrence and analysıs*. [online]. James Hutton Institute (and Mylnefield Lipid Analysis), Invergowrie, Dundee (DD2 5DA), Scotland. http://www.lipidlibrary.aocs.org/lipids/vakses/index.htm. [Ziyaret Tarihi: 14 Ocak 2012].

Christy. A.A.. 2009. Evidence in the formation of conjugated linoleic acids from thermally induced 9t12t linoleic acid: a study by gas chromatography and infrared spectroscopy. *Chemistry and Physics of Lipids*. 161. 86–94.

Chuna. J.. Lee. J.. Ye. L.. Exler. J.. Eitenmiller. R. R.. 2006. Tocopherol and tocotrienol contents of raw and processed fruits and egetables in the United States diet. *Journal of Food Composition and Analysis*. 19. 196 – 204

COI/ T.20/ Doc. no.10/ Rev. 1. 2001. Determination Of The Composition And Content Of Sterols By Capillary-Column Gas Chromatography.. *International Olive Oil Council.* Madrit. İspanya

COI/ T.20/ Doc. no.18/ Rev. 2. 2003. Determınatıon Of Vaks Content By Capıllary Column Gas Chromatography. *International Olive Oil Council.* Madrit. İspanya

Çam M.. 2009. Basınçlı solvent ekstraktörü kullanılarak nar kabuğu ve çekirdeğinin antioksidan bileşiklerin su ile ekstraksiyonu. Doktora Tezi. *Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*. İzmir.11-37

Çeltikci N. P.. 2008. Türkiye ekonomisinde nar ve nar türevleri. Yüksek Lisans Tezi. *Akdeniz Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü*. Antalya 37-71

Çoban. D.. 2007. Geç K vitamini eksikliğinde görülen nörolojik sekeller. Tıpta Uzmanlık Tezi. *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*. Kaseri.3-8

Damirchia S.A.. Savageb G.P.. and Dutta P.C.. 2005. Sterol Fractions in Hazelnut and Virgin Olive Oils and 4,4′-Dimethylsterols as Possible Markers for Detection of Adulteration of Virgin Olive Oil. *JAOCS* 82. 717–725

Damon. M.. Zhang. N.Z.. Haytowitz. D.B.. Booth. S.L.. 2005. Phylloquinone (vitamin K1) content of vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis*. 18. 751–758.

Deffense E. 2011. *Edible Oil Processing Chemıcal Degummıng*.Crystallisation & Degumming S.P.R.L., 21 Terre l'Oreye, Charleroi 6032, Belgium. http://lipidlibrary.aocs.org/processing/chem-degum/index.htm[Ziyaret Tarihi: 15 Şubat 2013].

Dhar. P.. Ghosh. S.. and Bhattacharyya. D.K.. 1999. Dietary Effects of Conjugated Octadecatrienoic Fatty Acid (9 cis, 11 trans, 13 trans) Levels on Blood Lipids and Nonenzymatic in vitro Lipid Peroxidation in Rats. *Lipids*. 34.109-114

Dijkstra A. J. 2011. *Edible Oil Processing – Refining Degumming – Introduction.* Carbougnères, 47210 St Eutrope-de-Born, France. http://lipidlibrary.aocs.org/processing/degum-intro/index.htm. [Ziyaret Tarihi: 14 Ocak 2012].

Dobarganes. M. C.. Velasco. J.. and 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 Appl. Chem*., 72, No. 8,1563-1575 (IUPAC standart metodu).

Dobarganes. M.C.. Velasco. J.. Dieffenbacher. A.. 2000. Determination of polar compounds, polymerized and oxidized triacylglycerols, and diacylglycerols in oils and fats. *Pure Appl Chem*. 72.1563–1575

Doğan. M.. 2005. K3 vitamininin diferansiyel puls polarografisi ile tayini için yöntem geliştirilmesi ve uygulanması. Yüksek Lisans Tezi. *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*. Ankara.1-11

Dussert. S.. Laffargue. A.. Kochko A..Joët. T.. 2008. Effectiveness of the fatty acid and sterol composition of seeds for the chemotaxonomy of Coffea subgenus Coffea. *Phytochemistry* 69. 2950–2960

Ergün. S.. 2004. Katı ve sıvı yağların lipid peroksidasyonu ve antioksidan sistemler üzerine olan etkilerinin araştırılması. Doktora Tezi. *Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*. Kütahya.1-20

Fadavi. A.. Barzegar. M.. Azizi. M. H.. 2006. Determination of fatty acids and total lipid content in oilseed of 25 pomegranates varieties grown in Iran, *Journal of Food Composition and Analysis* 19. 676 – 680.

Fadavi. A.. Barzegar. M.. Azizi. M.H.. 2006. Determination of fatty acids and total lipid content in oilseed of 25 pomegranates varieties grown in Iran. *Journal of Food Composition and Analysis* 19. 676 – 680

Ghosh S.P. Jensen. M.H. ve Kumar K.S..2009. *Tocotrienols Vitamin E Beyond Tocopherols. Part C. Chemistry of Tocotrienols.* AOCS Press. CRC Press Taylor & Francis Group. United States of America.

Gökhan. H.B.. 2005. Elazığ, Keban yöresinde yaşayan salyangoz (Helix lucorum, Linnaeus, 1758)`da vitamin A ve β-karotenin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. *Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*. Elazığ.1-8

Gürbüz. Ü.. 2006. Sığır plazmasındaki k vitaminine bağımlı proteinlerin iki boyutlu elektroforezle ayrılması. Yüksek Lisans Tezi. *Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*. İstanbul.5-11

Gürcan. Ü. 2001. Yağ rafinasyonunda oluşan trans yağ asitlerinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. *Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*. Konya.

Habibnia M., Ghavami M.. Ansaripour M., VosoughS.. 2012. Chemical Evaluation of Oils Extracted from Five Different Varieties of Iranian Pomegranate Seeds, *Journal of Food Biosciences and Technology.* 2. 35-40

Harde. H.. Schumacher. W.. Firbas, F.. Deffer. D.. 1970. Strasburg's Textbook of Botany. Chaucer, London.

Hartmann. M.-A.. 1998. Plant sterols and the membrane environment. *Trends in Plant Science*, 3 (5). 170–175.

Hernandez. F.. Melgarejo. P.. Olias. J.M.. Artes. F..2000. Fatty acid composition and total lipid content of seed oil from three commercial pomegranate cultivars. *http://ressources.ciheam.org/om/pdf/a42/00600273.pdf*

Herslöf. B.. Podlaha. O.. and Töregård. B..1979. HPLC of triglycerides. *Journal of The Amerıcan Oıl Chemısts' Socıety.* 56. 864-866

Heudi. O.. Trisconi. M.J.., Blake C.J..2004. Simultaneous quantification of Vitamins A, D3 and E in fortified infant formulae by liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 102. 115–123

Hopkins. C.Y.. and Chrisholm. M.J.. 1968. A Survey of the Conjugated Fatty Acids of Seed Oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 45.176–182

Hornung. E.. Pernstich. C.. Feussner. I.. 2002. Formation of conjugated $\Delta^{11}\Delta^{13}$-double bonds by Δ^{12}-linoleic acid (1,4)-acyl-lipid-desaturase in pomegranate seeds. *European Journal of Biochemistry.* 269. 4852–4859

Igarashi. M.. Miyazawa. T.. 2000. Newly recognized cytotoxic effect of conjugated trienoic fatty acids on cultured human tumor cells. *Cancer Letters* 148. 173-179.

İreş. N. 2009. Konya çevresinde kullanılan yem ve bileşenlerindeki suda ve yağda eriyen vitaminlerin eş zamanlı tayin metodunun geliştirilmesi. Yüksek Lisans Tezi. *Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*. Konya.1-15

Ju. S.J.. Harvey.H.R.. 2003. Lipids as markers of nutritionalcondition and diet in the Antarctic krill Euphausia superba and Euphausia crystallorophias during australwinter. *Deep-Sea Research II* 51. 2199–2214

Kamal-Eldin A.. Gorgen. S.. Pettersson. J.. Lampi. A.M.. 2000. Normal-phase high-performance liquid chromatography of tocopherols and tocotrienols Comparison of different chromatographic columns. *Journal of Chromatography A*, 88. 217–227.

Kanya. T.C. S., Rao. L. J., Sastry. M.C. S., 2007. Characterization of vaks esters, free fatty alcohols and free fatty acids of crude vaks from sunflower seed oil refineries. *Food Chemistry* 101: 1552–1557

Kanya. T.C.S.. Rao. L.J.. Sastry M.C.S.. 2007. Characterization of vaks esters, free fatty alcohols and free fatty acids of crude vaks from sunflower seed oil refineries. *Food Chemistry* 101. 1552–1557.

Kara. H., Gürcan. Ü. and Topkafa M. 2007. Comparison of the Amount of Trans Fatty Acid Formed During the Rafinery Process of Sunflower Oil 1st International Türkiye-Pakistan Chemistry Days Book of Abstract, 27-28 April Konya-TÜRKİYE

Kara. H. 2008. Yağ Rafinasyon Teknikleri Ders Notları. Selçuk Üniversitesi. Konya

Karabulut. İ.. 2004. Bitkisel yağlardan enzimatik interesterifikasyon yolu ile anne sütü yağına özdeş yağ üretimi. Doktora Tezi. *Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*. Ankara.1-22

Kıralan. M.. Golukcu M.. Tokgoz H.. 2009. Oil and Conjugated Linolenic Acid Contents of Seeds from Important Pomegranate Cultivars (Punica granatum L.) Grown in Turkey. *J Am Oil Chem Soc* 86. 985–990.

Kohno H.. Suzuki. R..Yasui. Y.. Hosokawa. M.. Miyashita. K.. and Tanaka. T.. 2004. Pomegranate seed oil rich in conjugated linolenic acid suppresses chemically induced colon carcinogenesis in rats. *Cancer Sci.* 95. 481–486

Kramer. J.K.G.. Blais. L.. Fouchard. R.C.. Melnyk. R.A.. Kallury. K.M.R.. 1997. A rapid method for the determination of vitamin E forms in tissues and diet by high-performance liquid chromatography using a normal-phase diol column. *Lipids* 32. 323-330.

Lansky. E. P.. Harrison. G.. Froom. P.. and. Jiang. W. G.. 2005 Pomegranate (Punica granatum) pure chemicals show possible synergistic inhibition of human PC-3 prostate cancer cell invasion across Matrigel. *Investigational New Drugs* 23. 121–122.

Lindsey. K.. Pullen. M. L.. Topping. J. F.. 2003. Importance of plant sterols in pattern formation and hormone signalling. *Trends in Plant Science*, 8 (11). 521–525.

Mahesar. S.A.. Sherazi. S.T.H.. Kandhro. A.A.. Bhanger M.I.. Khaskheli A.R.. Talpur. M.Y.. 2011. Evaluation of important fatty acid atios in poultry feed lipids by ATR FTIR spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy* 57. 177–181.

Martini. S. and M.C. An 2000. Determination of Vaks Concentration in Sunflower Seed Oil. *JAOCS* 77. 1087–1092

Mata-Granados. J.M.. Quesada Gómez. J.M.. Luque de Castro. M.D.. 2009. Fully automatic method for the determination of fat soluble vitamins and vitamin D metabolites in serum *Clinica Chimica Acta* 403. 126–130

Matthausa. B.. Vosmanna. K.. Phamb. L.Q.. and Aitzetmüller. K.. 2003. FA and Tocopherol Composition of Vietnamese Oilseeds. *JAOCS* 80, 1013–1020

Melgarejo. P.. Arte´s. F.. 2000. Total lipid content and fatty acid composition of oilseed from lesser known sweet pomegranate clones. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 80.1452-1454

Minioti. K.. and. Georgiou. C.A.. 2010. Comparison of different tests used in mapping the Greek virgin olive oil production for the determination of its total antioxidant capacity. *Grasas Y Aceites.* 45-51.

Molyneux. P.. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Sciennce and Technology*. 26. 211.

Mouloungui. Z.. Roche. J.. Bouniols. A.. 2006. Limitations extractives desingrédients fonctionnels natifs: Lipides bioactifs par modifications chimiques.*Oléagineux, Corps gras Lipides*, 13(1). 16–22.

Nagao. K.. Yanagita. T.. 2005. Conjugated Fatty Acids in Food and Their Health Benefits. *Journal Of Bioscience and Bioengineering*. 100. 152–157

Naz. S.. Sherazi. S.T.H.. Talpur. F.N.. Changes of Total Tocopherol and Tocopherol Species During Sunflower Oil Processing. *J Am Oil Chem Soc.* 88. 127–132.

Ostlund. R.E., Racette. S.B., Stenson. W.F. 2002. Effect of trace components of dietary fat on cholesterol metabolism: phytosterols, oxysterols and squalene. *Nutr Rev* 60. 349–359

Owen. R.W.. Giacosa. A.. Hull W.E.. Haubner. R.. Spiegelhalder. B.. Bartsch H.. 2000. The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *European Journal of Cancer* 36. 1235-1247.

Öner. N.. 2008. Akut romatizmal ateş ve romatizmal kalp hastalığı tanısında 'hıgh sensıtıve c reaktıf proteın', total antioksidan kapasitesi, homosistein, haptoglobin ve kan lipid profilinin onemi. *Tıpta Uzmanlık Tezi. Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Çocuk Sağlığı Ve Hastalıkları Kliniği*. Ankara.3-41

Özgül-Yücel. S. 2005. Determination of Conjugated Linolenic Acid Content of Selected Oil Seeds Grown in Turkey. *JAOCS* 82. 893–897.

Parcerisa. J.. Richardson. D.G.. Rafecas. M.. Codony. Rafael..Boatella.. 1998. Fatty acid, tocopherol and sterol content of some hazelnut varieties (Corylus avellana L.) harvested in Oregon (USA). *Journal of Chromatography A*, 805. 259–268.

Plattner. R. D.. Spencer. G. F. and Kleiman. R.. 1977. Triglyceride separation by reverse phase high performance liquid chromatography. *Journal of The Amerıcan Oıl Chemısts' Socıety*.54. 511-515.

Prieto. P.. Pineda. M.. Aguilar. M. 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphor molybdenum complex: Specific application to the determination of vitamin E, *Analytical Biochemistry*. 269. 337–341.

Qian. H.. Sheng. M.. 1998. Simultaneous determination of fat-soluble vitamins A, D and E and pro-vitamin D_2 in animal feeds by one-step extraction and high-performance liquid chromatography analysis. *Journal of Chromatography A*, 825. 127–133.

Ramadan, M.F., Mörsel J-T., 2002. Direct isocratic normal-phase HPLC assay of fat-soluble vitamins and β-carotene in oilseeds. *Eur Food Res Technol* 214.521–527.

Roche. J.. Alignan.M.. Bouniols. A.. Cerny. M.. Mouloungui. Z.. Merah. O.. 2010. Sterol concentration and distribution in sunflower seeds (Helianthus annuus L.) during seed development. *Food Chemistry* 119. 1451–1456.

Sağlam. F.. 2007. Antosiyanince zengin dut, kiraz ve gilaburu meyvelerindek fenolikler ve antioksidan kapasitesi üzerine reçel yapım işleminin etkisi. Yüksek Lisans Tezi. *Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*. Konya.1-9

Santos. J.C.O.. Dos Santos. I.M.G.. De Souza. A.G.. Prasad. S. Dos Santos. A.V.. 2002. Thermal Stability and Kinetic Study on Thermal Decomposition of Commercial Edible Oils by Thermogravimetry. *Journal Of Food Scıence*. 67. 1393-1398.

Sassano. G., Sanderson. P., Franx. J., Groot. P., Straalenb. J. and Bassaganya-Riera. J.. 2009. Analysis of pomegranate s eed oil f or the presence of jacaric acid. *J Sci Food Agric*; 89. 1046-1052.

Saura-Calixto. F.,*, Gon˜i. I., 2006. Antioxidant capacity of the Spanish Mediterranean diet. *Food Chemistry* 94: 442–447

Schubert. Y. S., Lansky. E. P., Neeman. I.. 1999. Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties ofpomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. *Journal of Ethnopharmacology* 66. 11 – 17.

Schwartz. H.. Ollilainen. V.. Piironen. V.. Lampi A.M.. 2008. Tocopherol, tocotrienol and plant sterol contents of vegetabl e oils and industrial fats. *Journal of Food Composition and Analysis.* 21. 152 – 161.

Seppanen. C.M.. Song. Q.. A. Csallany. S.. 2010. The Antioxidant Functions of Tocopherol and Tocotrienol Homologues in Oils, Fats, and Food Systems. *J Am Oil Chem Soc.* 87.469–481.

Shahidi. F.. Wanasundara P. K. J. P. D.. 2002. *Food Lipids. Part I. 5. Extraction and Analysis of Lipids.* Marcel Dekker, Inc. New York, Basel.

Sırt. F.. 1991. Diyarbakır yöresinde (yerli ve göçmen olrak yaşayan)yetişkinlerin tükettikleri A vitamini ile serum vitamin düzeyleri arasındaki ilişki. Bilim Uzmanlığı Tezi. *Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*. Ankara.1-16

Sivrikaya. A.. 2007. Sağlıklı kişilerde ve koroner kalp hastalarında bitki sterolleri, total antioksidan kapasite (TAS), okside LDL (OX-LDL) ve homosistein düzeylerinin araştırılması. Doktora Tezi *Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*. Konya.1-42

Slinkard, K.. Singleton, V.L. 1977. Total phenol analyses: automation and comparison with manual methods*. American Journal of Enology and Viticulture.* 28. 49–55.

Souza. A.G.. Santos J.C.O.. Conceição. M.M.. Silva. M.M.D. Prasad. S.. 2004. A thermoanalytıc and kınetıc study of sunflower oıl. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 21. 265–273.

Suzukia. R.. Noguchia. R.. Otab. T.. Abec. M.. Miyashitaa. K.. and Kawada. T.. 2001. Cytotoxic Effect of Conjugated Trienoic Fatty Acids on Mouse Tumor and Human Monocytic Leukemia Cells. *Lipids.* 36. 477–482

Süzen H.F.. 2009. Mısır yağı ile kudret narı yağ asitleri arışımınınasidolizi ile yapılandırılmış yağ üretimi ve Optimizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. *İstanbul Teknik Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü*. İstanbul 18-22.

Syed. D.N.. Afaq. F.. Mukhtar. H.. 2007. Pomegranate derived products for cancer chemoprevention. *Seminars in Cancer Biology* 17. 377–385.

Şerbetci. H.. 2007 Meyan (Glycyrrhiza Glabra l.) bitkisinin antioksidan kapasitesinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. *Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*. Erzurum.1-23

Tasan. M.. Demirci. M.. 2005. Total and individual tocopherol contents of sunflower oil at different steps of refining. *Eur Food Res Technol*. 220. 251–254.

Topkafa. M.ve Ekerbiçer. Ü.. 2004. Yemeklik yağların bazı özelliklerinin kromatografik metotlarla incelenmesi. Lisans Mezuniyet Çalışması, *Selçuk Üniversitesi*. Konya.

TS-894. 1970. Yemeklik Bitkisel Yağlar-Muayene Metodları. *Türk Standartları Enstitüsü*. Ankara.

Tsape. K.. Sinanoglou. V.J.. Meimaroglou. S.M.. 2010. Comparative analysis of the fatty acid and sterol profiles of widely consumed Mediterranean crustacean species. *Food Chemistry* 122. 292–299.

Tsape. K..Sinanoglou. V.J.. Miniadis-Meimaroglou. S.. 2010. Comparative analysis of the fatty acid and sterol profiles of widely consumed Mediterranean crustacean species. Food Chemistry. 122. 292–299.

Turfan. Ö.. 2008. Nar suyu konsantresi üretim ve depolama sürecinde antosiyaninlerdeki değişimler. Yüksek Lisans Tezi. *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*. Ankara.1-20

Uncu. E.B.. 2008. Farklı lamine ambalajların öğütülmüş fındıklarda oksidasyon ve toplam tokoferol düzeyi üzerine etkileri. Yüksek Lisans Tezi. *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*. Ankara.1-17

Van Hoed. V.. Depaemelaere. G.. Vila Ayala. J.. Santiwattana. P..Verhé. R.. De Greyt. W.. 2006. Influence of Chemical Refining on the Major and Minor Components of Rice Bran Oil. *JAOCS.* 83. 315-321.

Verhé. R.. Verleyen. T.. Van Hoed. V.. De Greyt. W.. 2006. Influence of Refining of Vegetable Oils on Minor Components. *Journal of Oil Palm Research.* Special Issue. 168-179

Verleyen. T.. Sosinska. U. Ioannidou. S..Verhe. R.. Dewettinck. K.. Huyghebaert. A.. De Greyt. W.. 2002. Influence of the Vegetable Oil Refining Process on Free and Esterified Sterols. *JAOCS*. 79. 947-953.

Vikipedi. Özgür Ansiklopedi.. 2012. *E vitamini*. http://tr.wikipedia.org/wiki/E_vitamini . [Ziyaret Tarihi: 12 Mart 2012].

Vroegrijk. I.O.C.M.. Diepen. J. A.. Berg. S.. Westbroek. I.. Keizer. H.. Gambelli. L.. Hontecillas R.. Bassaganya-Riera. J.. Zondag. G.C.M.. Romijn. J.A.. Havekes.L.M.. Voshol. P. J.. 2011. Pomegranate seed oil, a rich source of Pünisik acid, prevents diet-induced obesity and insulin resistance in mice. *Food and Chemical Toxicology* 49. 1426–1430.

Werner Z. 2001. Bleaching of edible fats and oils. *Eur J Lipid Sci Tech*. 103. 505–508

Wetherilt. H., and Pala. M.. 1994. *Herbs and Spices Indigenous to Turkey, in Spices, Herbs and Edible Fungi.* Elsevier Press, New York. 285–307

Xu. X.. Dong. J.. Mu. X.. Sun. L.. 2011. Supercritical CO2 extraction of oil, carotenoids, squalene and sterols from lotus (Nelumbo nucifera Gaertn) bee polen. *Food And Bioproducts Processing.* 89. 47-52.

Yamasaki. M.. Kitagawa. T.. K. N.. C. H.. Maeda. H.. Kohno-Murase. J.. Imamura. Y..Tachibana. H.. and Yamada. K.. 2006. Dietary effect of pomegranate seed oil on immune function and lipid metabolism in mice. *Nutrition* 22. 54 –59

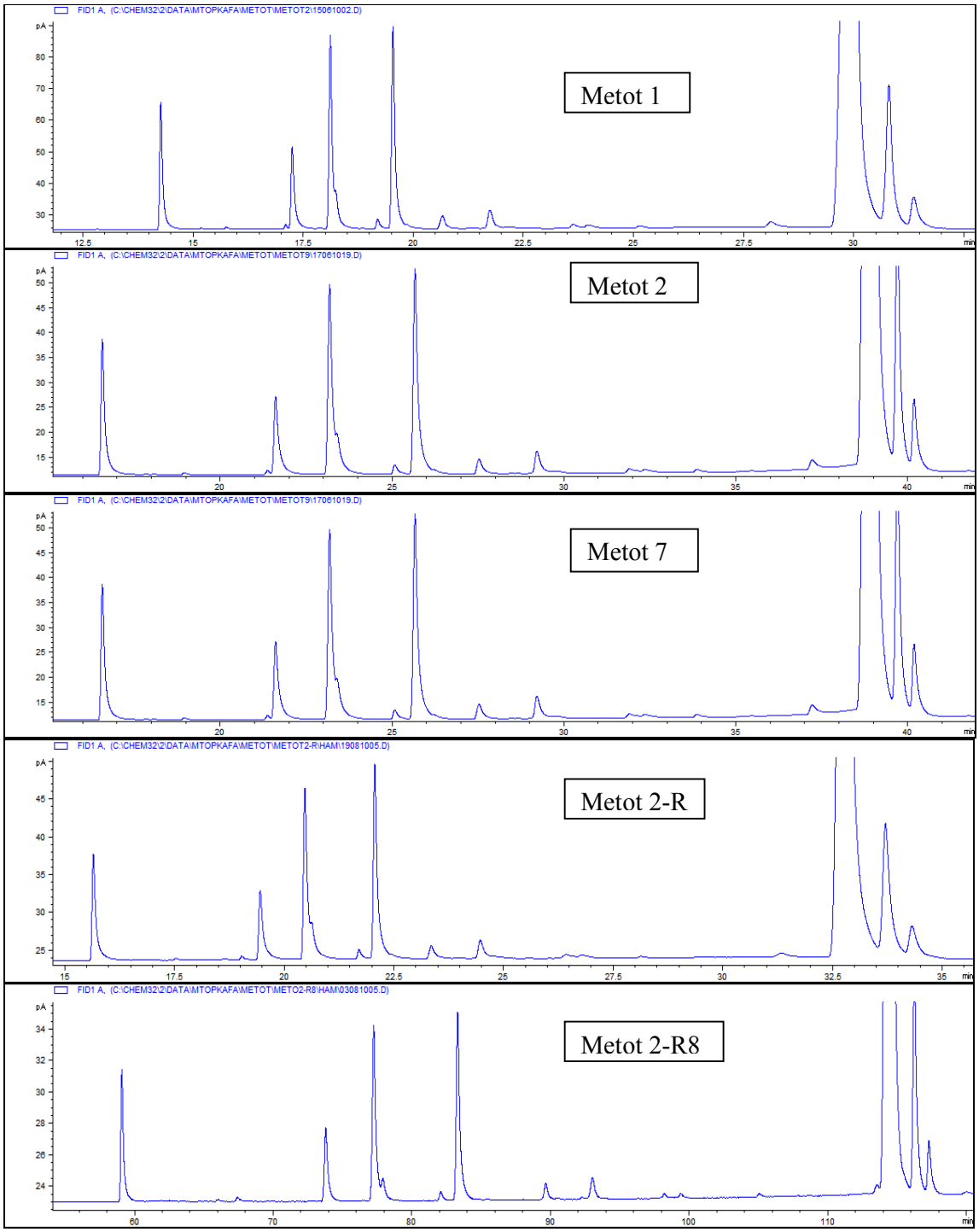
Yemişçioğlu. F.. 2002. Bitkisel kaynaklı sıvı yağlardan interesterifikasyon yöntemi ile katı yağ üretimi. Doktora Tezi. *Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*. İzmir.1-55

Yılmaz C.. 2005. Narda derim öncesi meyve çatlamasının anatomisi ve fizyolojisi. Doktora Tezi. *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*. Adana.1-12

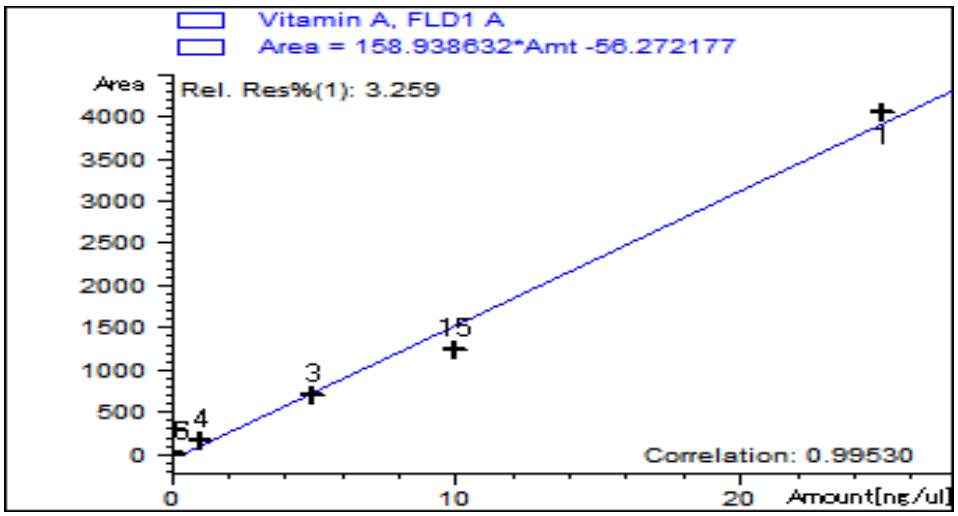
Yücel. C. Ö.. 2006. Determination of sterols in vegetable oil samples. Yüksek Lisans Tezi. *Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*. İzmir.1-11

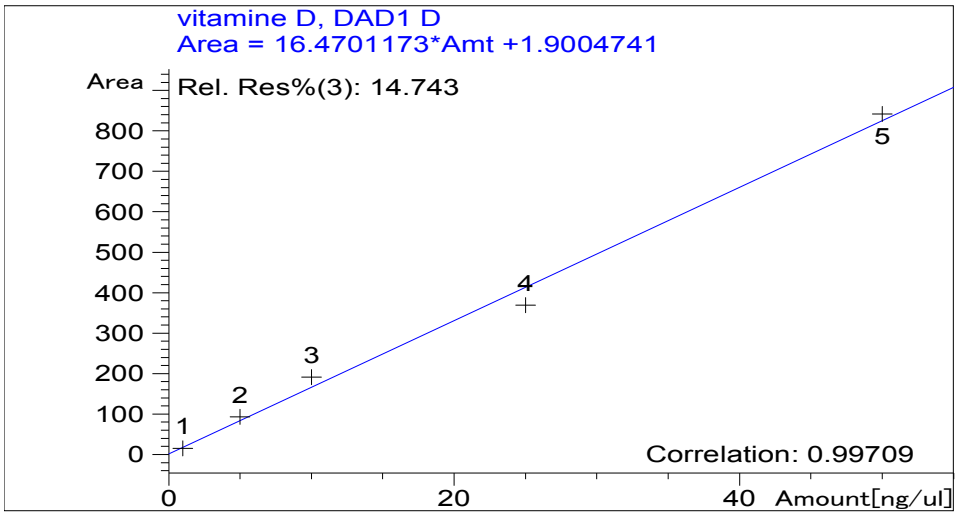
EKLER

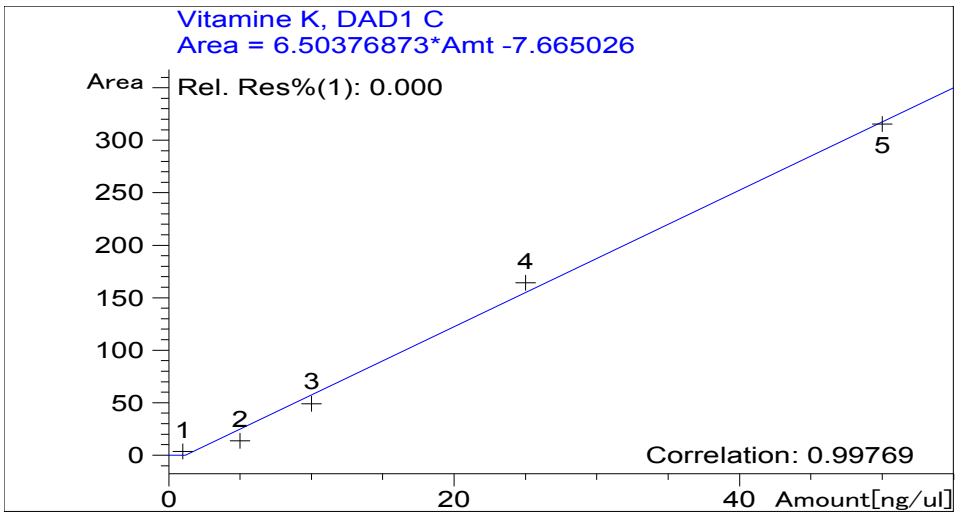
EK-1 Yağ Asit Kompozisyonu Analizi için Uygulanan Kromatografik Metotlara Ait Bazı Kromatogramlar.

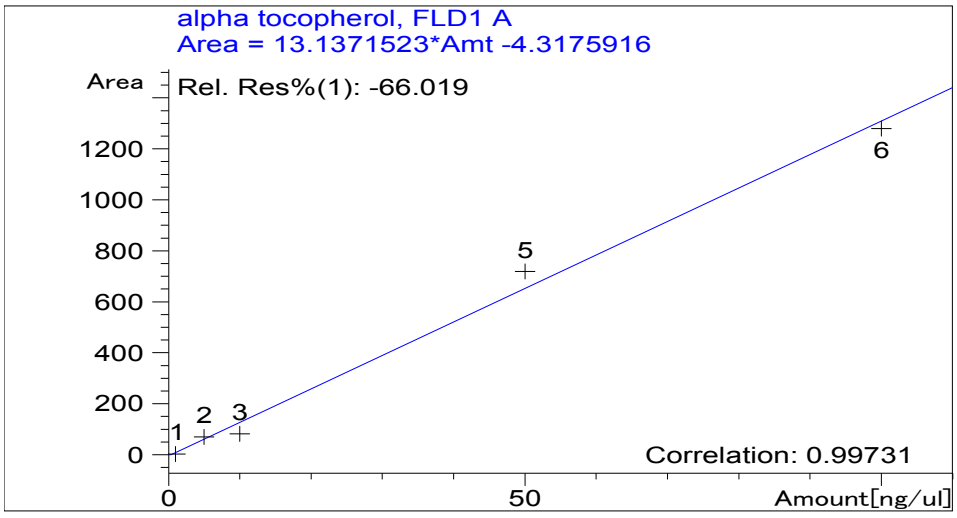


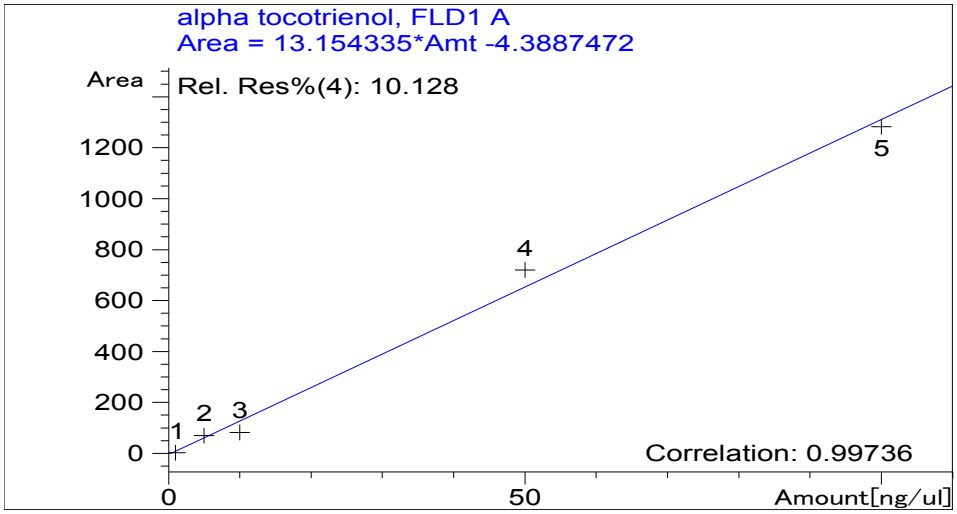
EK-2 Vitamin ve Tokoferol - Tokotrienol Analizi için Kalibrasyon Eğrileri

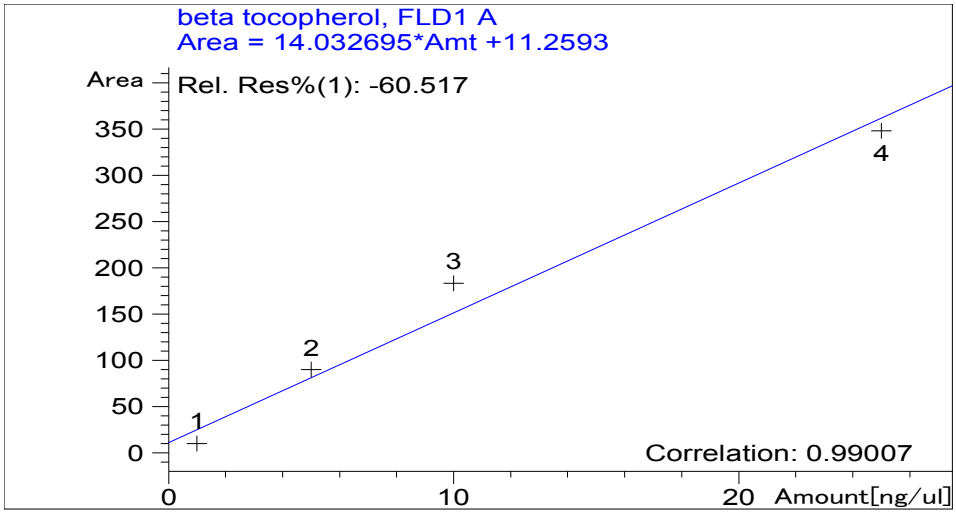


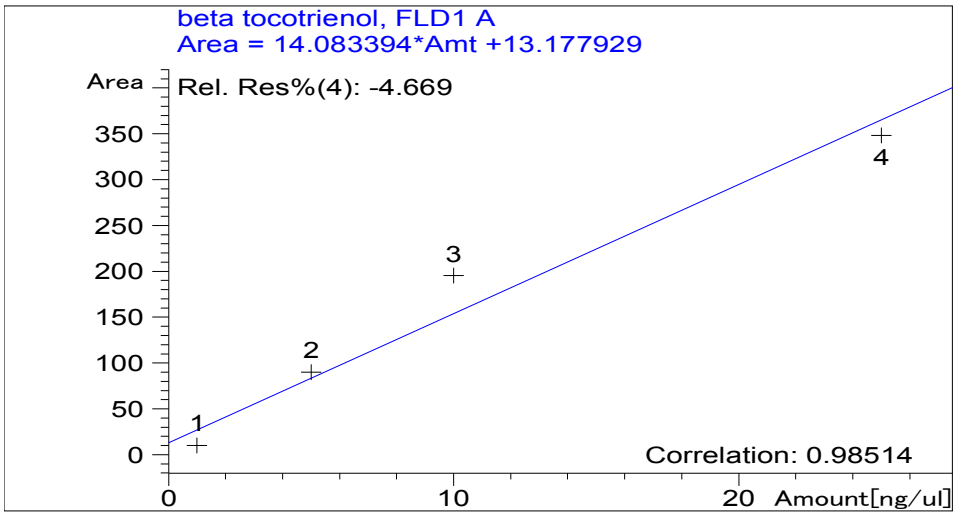


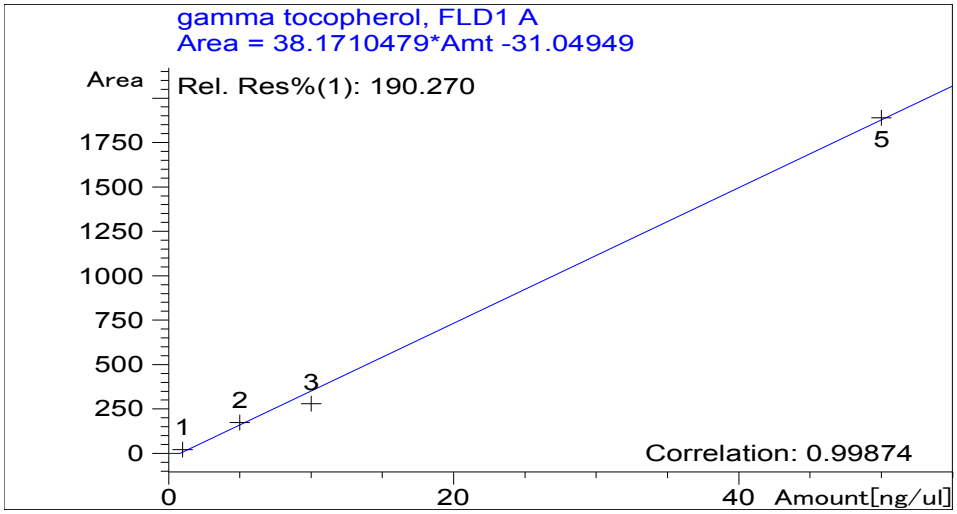


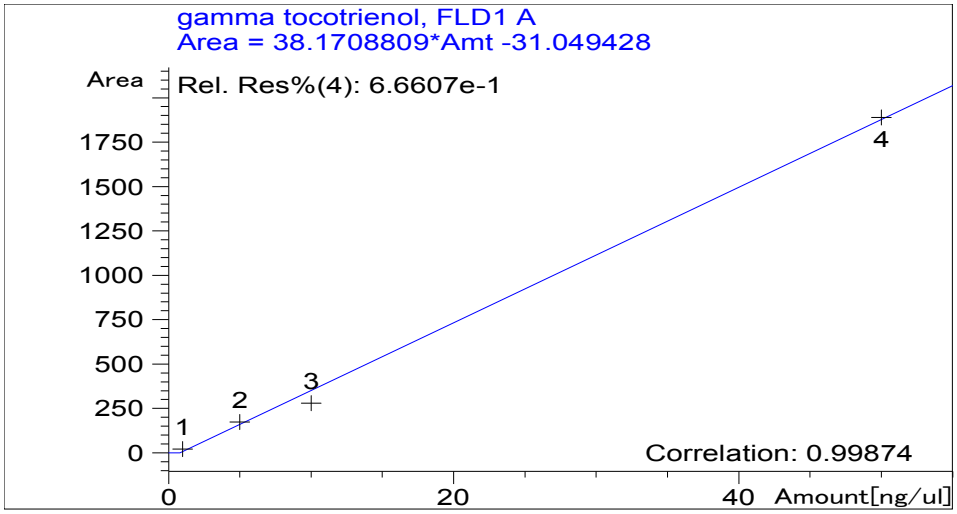

alpha tocopherol, FLD1 A
Area = 13.1371523*Amt -4.3175916
Area
Rel. Res%(1): -66.019
1200
1000
800
600
400
200
0
1
2
3
5
6
Correlation: 0.99731
0
50
Amount[ng/ul]

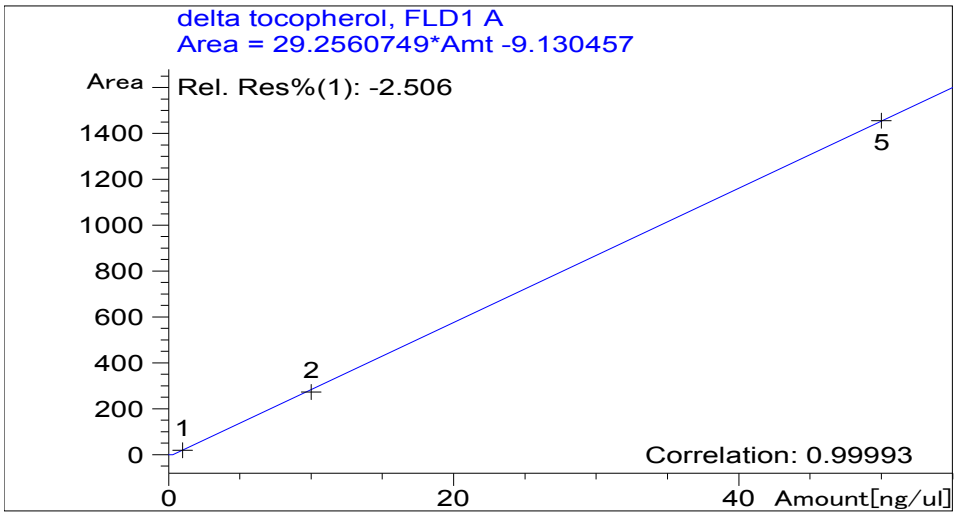

alpha tocotrienol, FLD1 A
Area = 13.154335*Amt -4.3887472
Area
Rel. Res%(4): 10.128
1200
1000
800
600
400
200
0
1
2
3
4
5
Correlation: 0.99736
0
50
Amount[ng/ul]

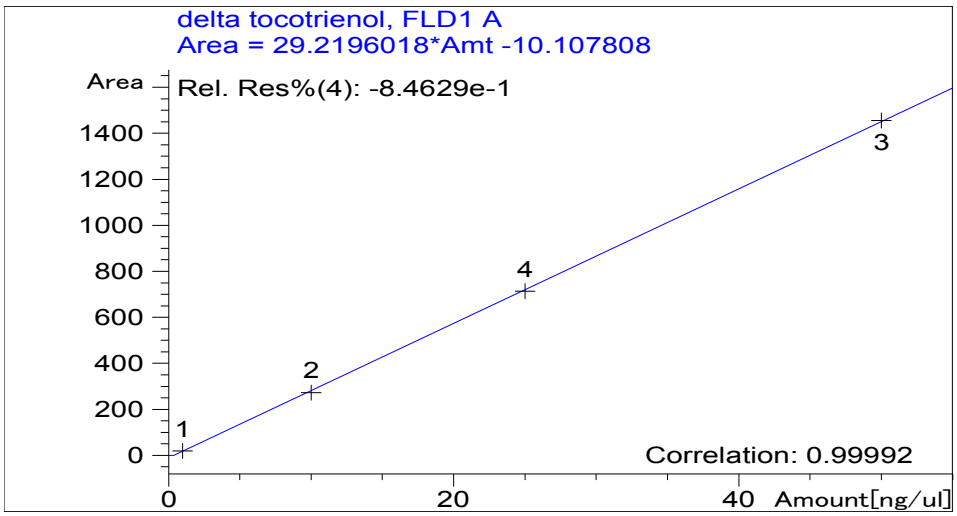

beta tocopherol, FLD1 A
Area = 14.032695*Amt +11.2593
Area
Rel. Res%(1): -60.517
350
300
250
200
150
100
50
0
1
2
3
4
Correlation: 0.99007
0
10
20
Amount[ng/ul]


beta tocotrienol, FLD1 A
Area = 14.083394*Amt +13.177929
Area
Rel. Res%(4): -4.669
350
300
250
200
150
100
50
0
1
2
3
4
Correlation: 0.98514
0
10
20
Amount[ng/ul]

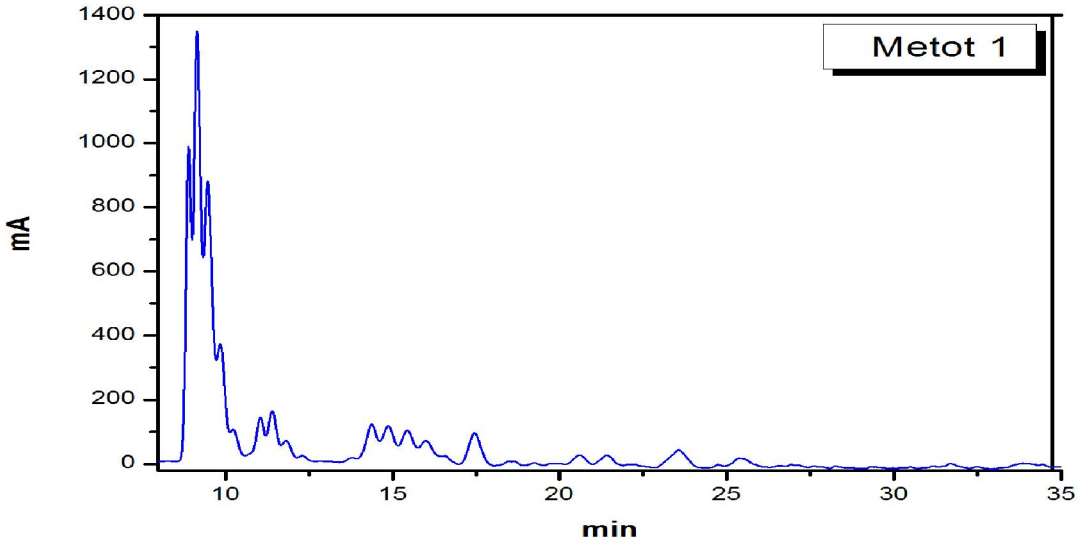

gamma tocopherol, FLD1 A
Area = 38.1710479*Amt -31.04949
Area
Rel. Res%(1): 190.270
1750
1500
1250
1000
750
500
250
0
1
2
3
5
Correlation: 0.99874
0
20
40
Amount[ng/ul]

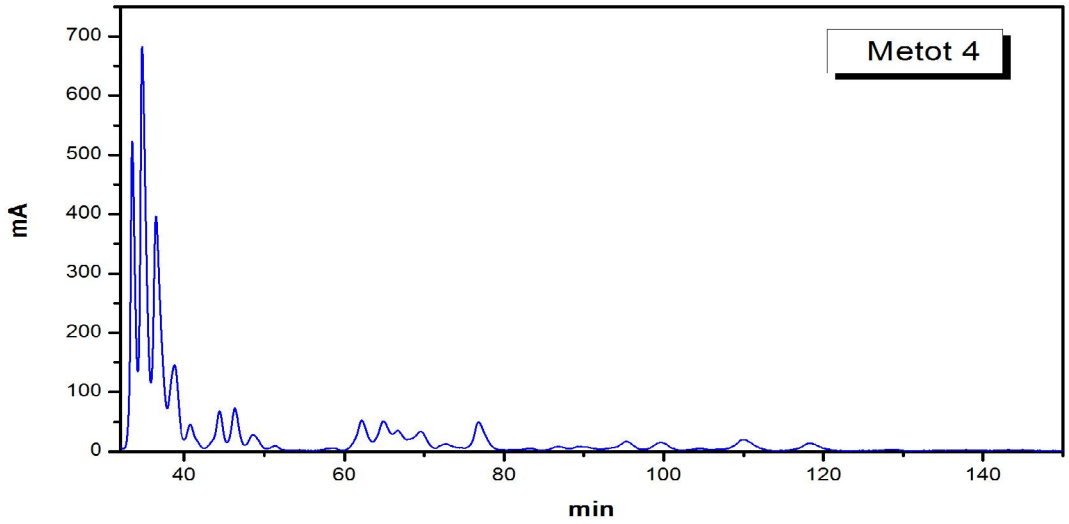

gamma tocotrienol, FLD1 A
Area = 38.1708809*Amt -31.049428
Area
Rel. Res%(4): 6.6607e-1
1750
1500
1250
1000
750
500
250
0
1
2
3
4
Correlation: 0.99874
0
20
40
Amount[ng/ul]

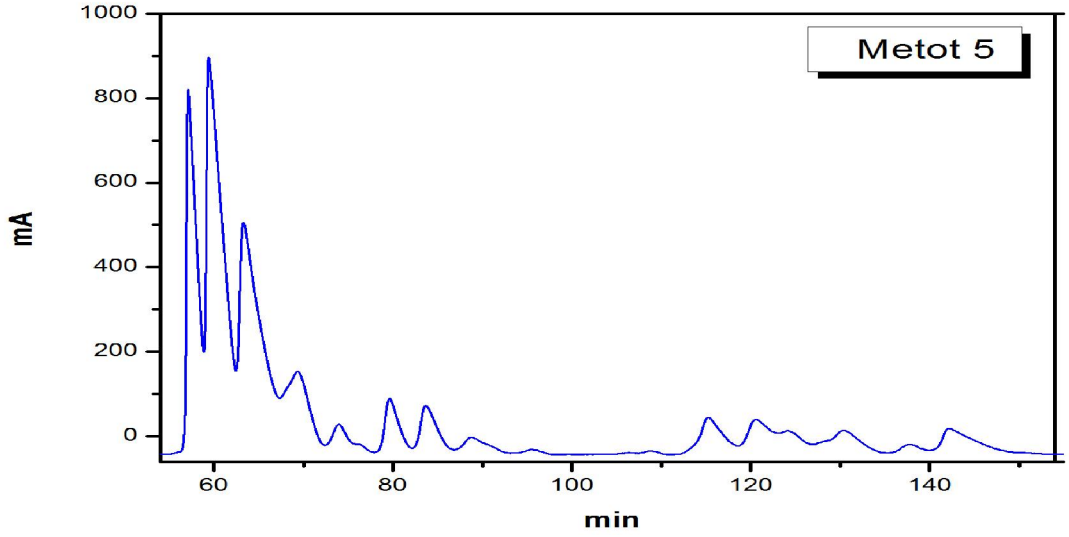

delta tocopherol, FLD1 A
Area = 29.2560749*Amt -9.130457
Area
Rel. Res%(1): -2.506
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
1
2
5
Correlation: 0.99993
0
20
40
Amount[ng/ul]


delta tocotrienol, FLD1 A
Area = 29.2196018*Amt -10.107808
Area
Rel. Res%(4): -8.4629e-1
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
1
2
4
3
Correlation: 0.99992
0
20
40
Amount[ng/ul]

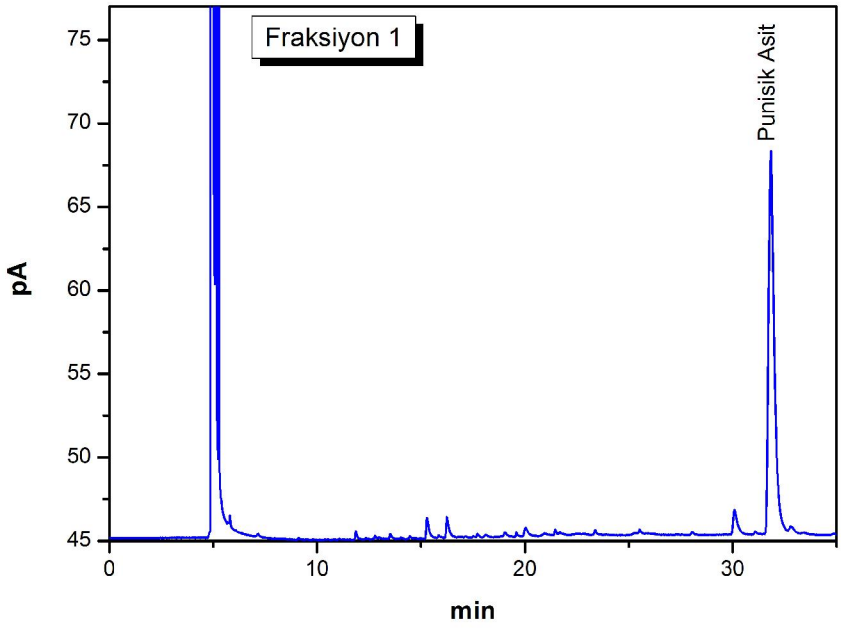
EK-3 Trigliserit Analizi için Uygulanan Kromatografik Metotlara Ait Bazı Kromatogramlar.

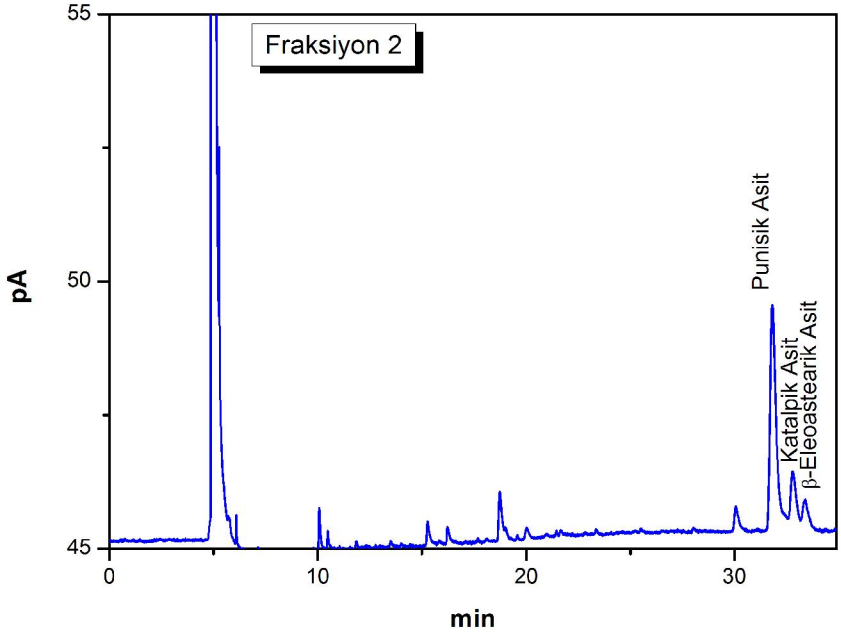


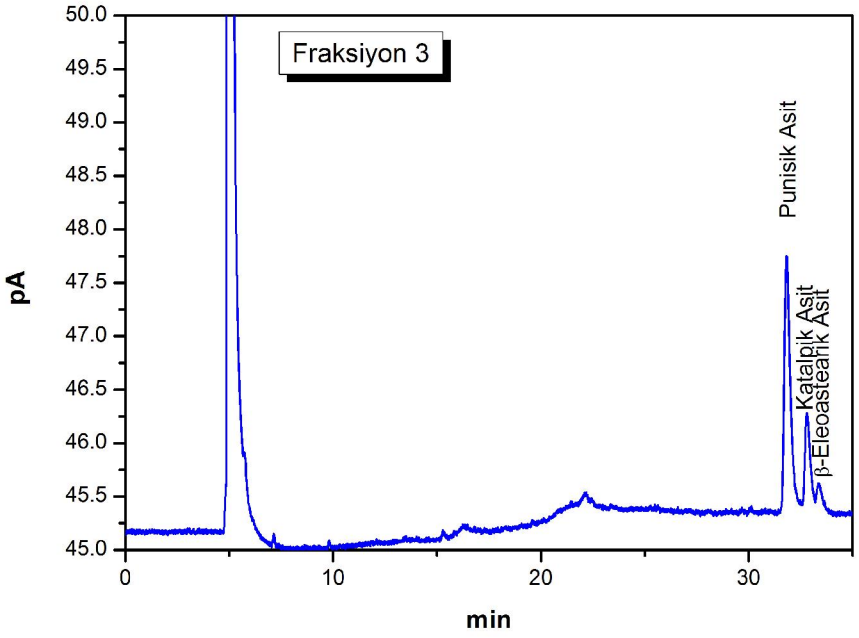


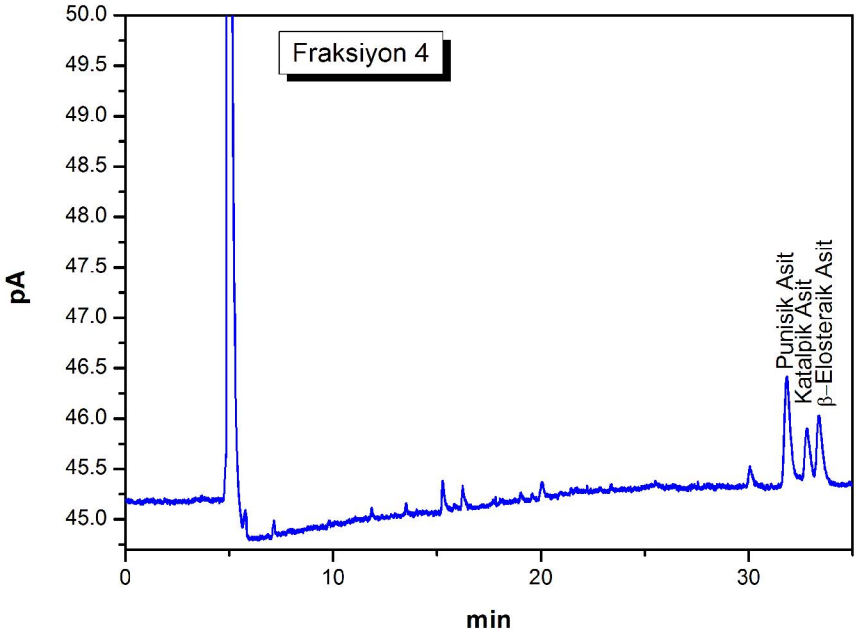


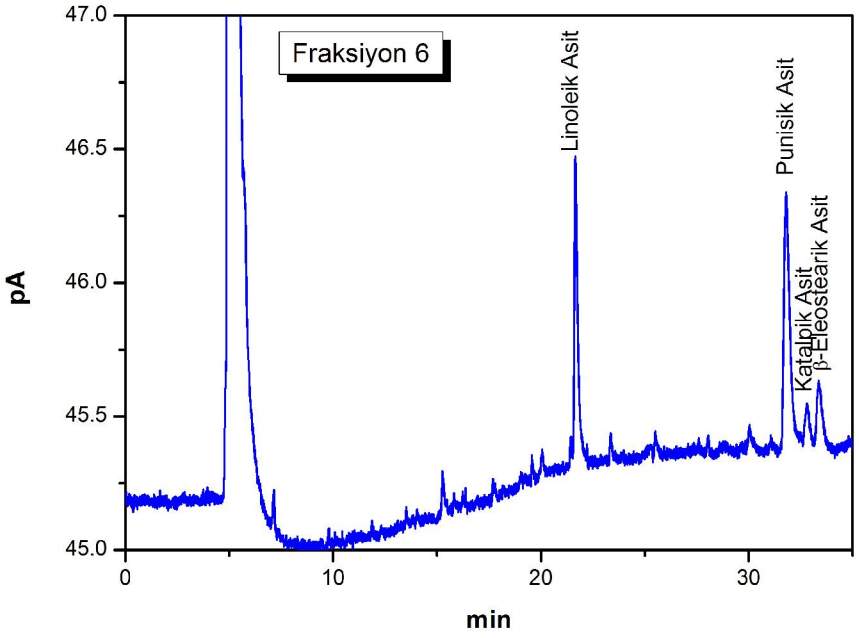
EK-4 Trigliserit Analizi için Uygulanan Fraksiyonlara Ait Bazı Kromatogramlar.

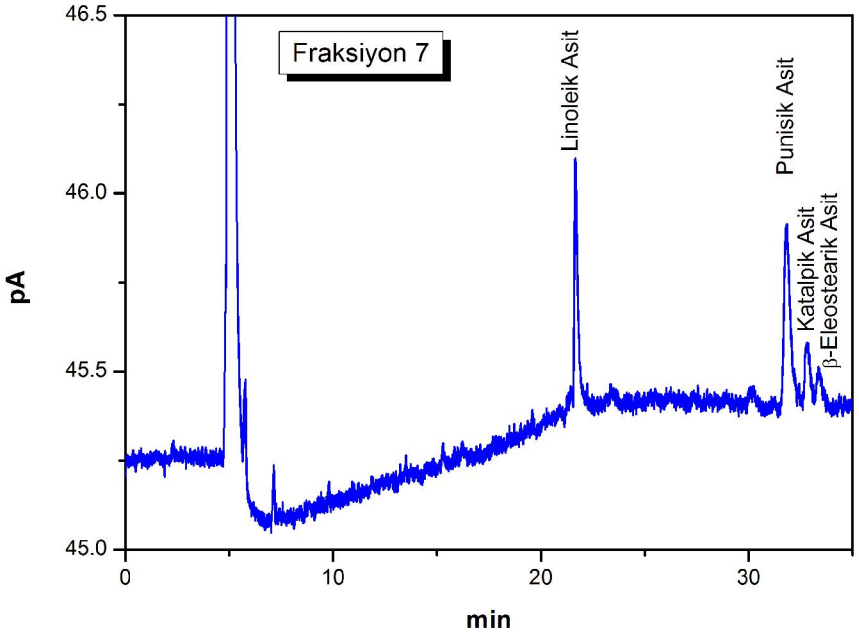


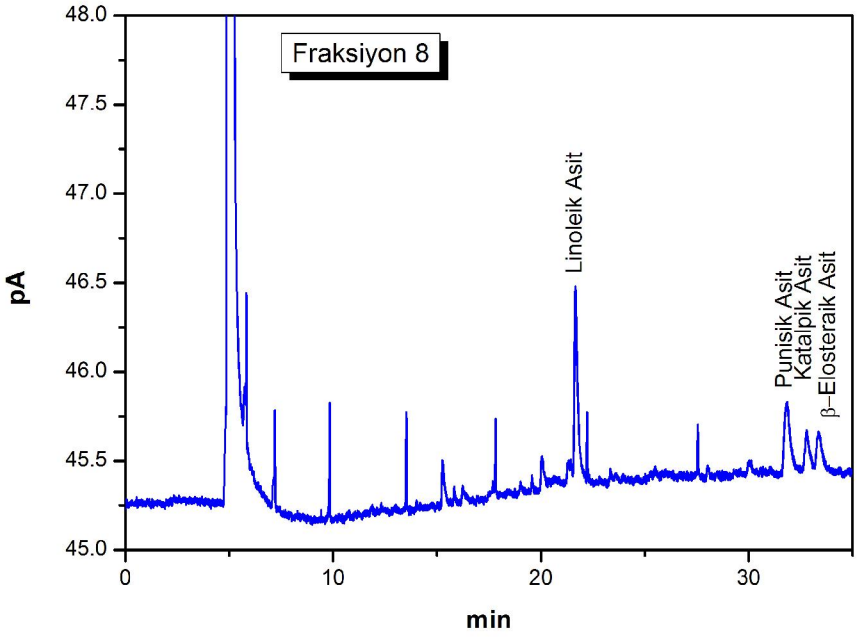


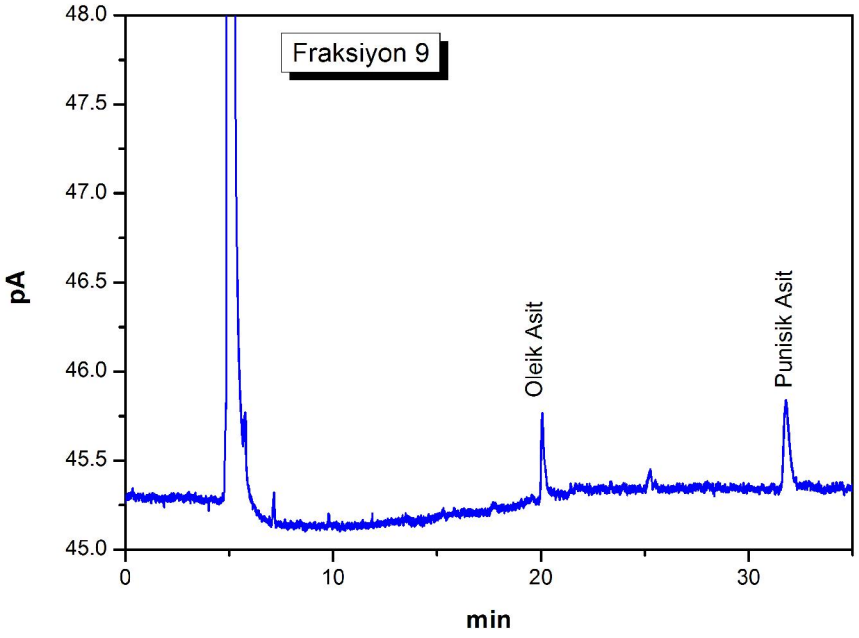

Fraksiyon 3
Punisik Asit
Katalpik Asit
β-Eleostearik Asit
pA
min
50.0
49.5
49.0
48.5
48.0
47.5
47.0
46.5
46.0
45.5
45.0
0
10
20
30

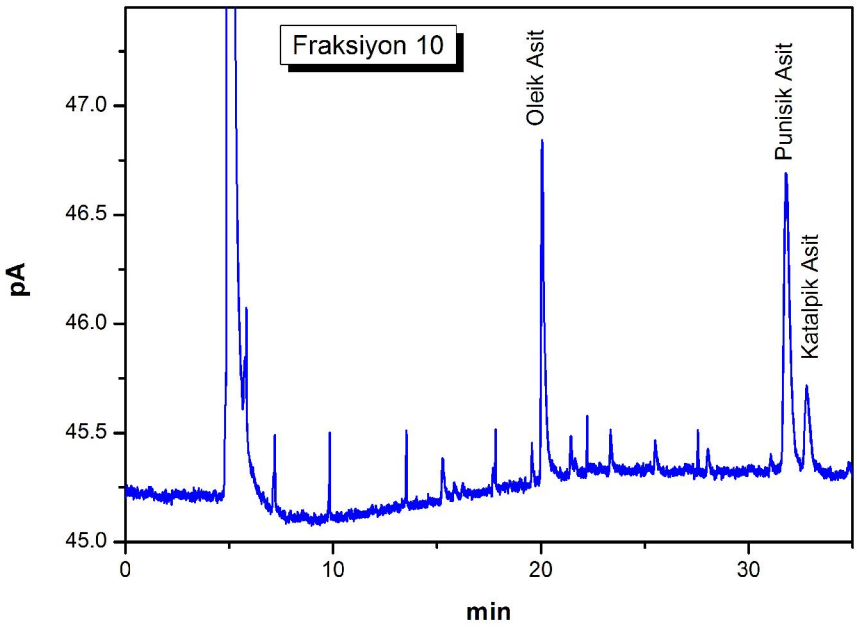

Fraksiyon 4
Punisik Asit
Katalpik Asit
β–Eleosteraik Asit
pA
min
50.0
49.5
49.0
48.5
48.0
47.5
47.0
46.5
46.0
45.5
45.0
0
10
20
30

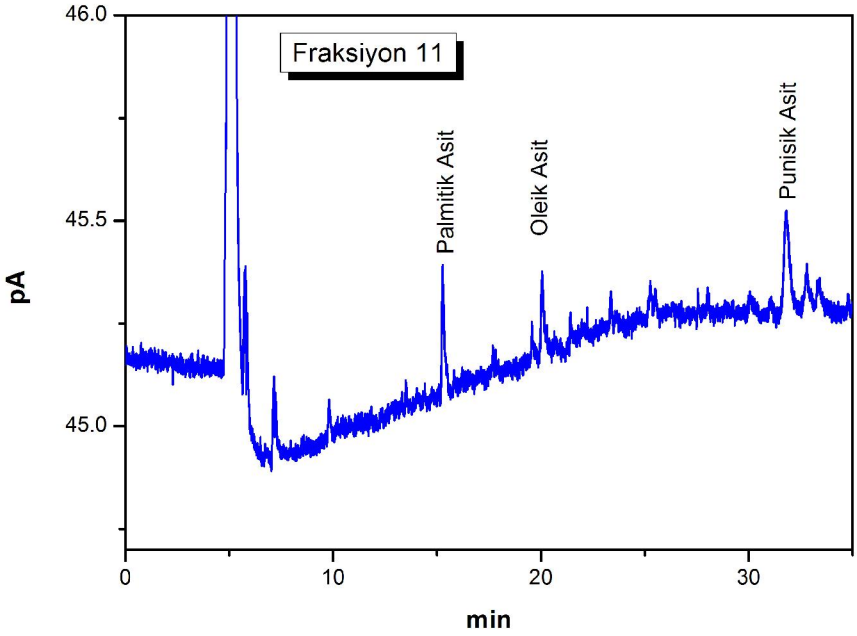

Fraksiyon 6
Linoleik Asit
Punisik Asit
Katalpik Asit
β-Eleostearik Asit
pA
min
47.0
46.5
46.0
45.5
45.0
0
10
20
30

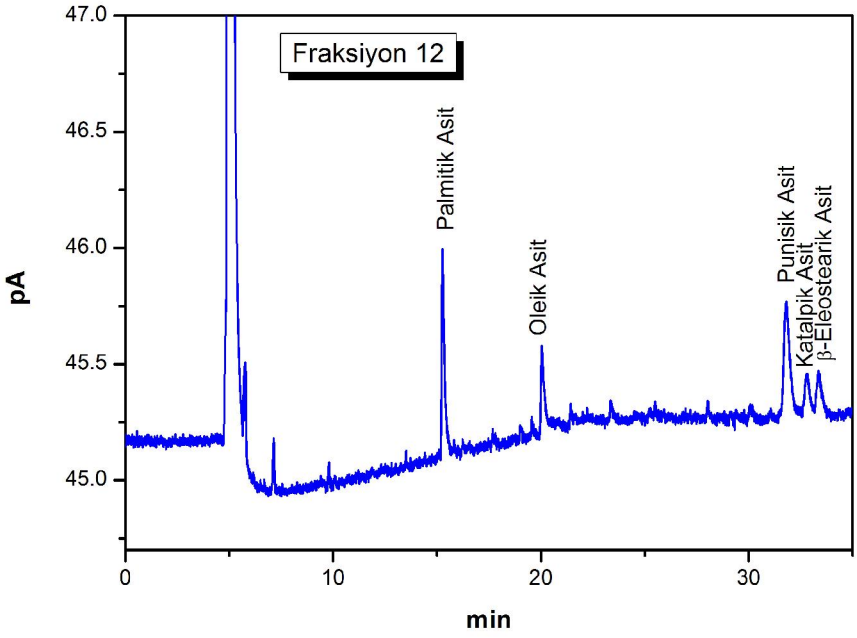

Fraksiyon 7
Linoleik Asit
Punisik Asit
Katalpik Asit
β-Eleostearik Asit
pA
min
46.5
46.0
45.5
45.0
0
10
20
30

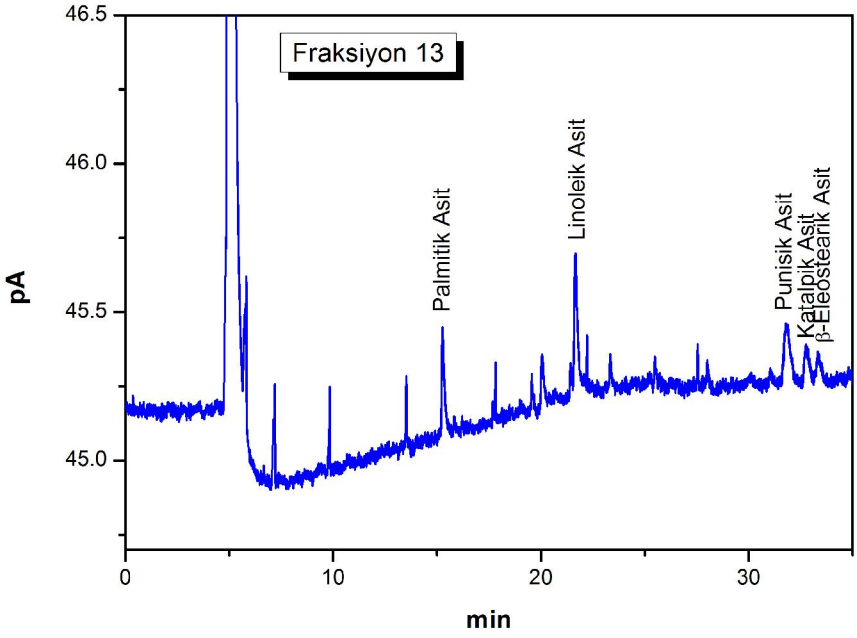

Fraksiyon 8
Linoleik Asit
Punisik Asit
Katalpik Asit
β–Eleosteraik Asit
pA
min
48.0
47.5
47.0
46.5
46.0
45.5
45.0
0
10
20
30


Fraksiyon 9
Oleik Asit
Punisik Asit
pA
min
48.0
47.5
47.0
46.5
46.0
45.5
45.0
0
10
20
30


Fraksiyon 10
Oleik Asit
Punisik Asit
Katalpik Asit
47.0
46.5
46.0
45.5
45.0
pA
0
10
20
30
min


Fraksiyon 11
Palmitik Asit
Oleik Asit
Punisik Asit
46.0
45.5
45.0
pA
0
10
20
30
min


Fraksiyon 12
Palmitik Asit
Oleik Asit
Punisik Asit
Katalpik Asit
β-Eleostearik Asit
pA
min
47.0
46.5
46.0
45.5
45.0
0
10
20
30


Fraksiyon 13
Palmitik Asit
Linoleik Asit
Punisik Asit
Katalpik Asit
β-Eleostearik Asit
pA
min
46.5
46.0
45.5
45.0
0
10
20
30

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Mustafa TOPKAFA
Uyruğu : T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi : Beyşehir / 1981
Telefon : 0 332 223 39 01
Faks : 0332 241 24 99
e-mail : mtopkafa@selcuk.edu.tr

EĞİTİM

Derece	Adı. İlçe. İl	Bitirme Yılı
Lise :	Selçuklu Lisesi. Selçuklu. Konya	1999
Üniversite :	Selçuk Üniversitesi. Selçuklu . Konya	2004
Yüksek Lisans :	Selçuk Üniversitesi. Selçuklu . Konya	2007
Doktora :		

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi
2006	**Helvacızade A.Ş.**	**Kimyager**

UZMANLIK ALANI

Ayırma teknikleri, Hümik Asit, Su, Adsorpsiyon-desorpsiyon, Spektroskopi

YABANCI DİLLER

İngilizce

YAYINLAR

1. H. Filiz Ayyildiz, Mustafa Topkafa, Fatma Nur Arslan, Fatih Durmaz, Semahat Kucukkolbasi, Ismail Tarhan, Huseyin Kara, **Removal and Preconcentration of Cobalt Ions from Aqueous Media Using ImHA Packed Column by On-Line SPE System**, Water, Air, & Soil Pollution, Volume 223, issue 7 (September 2012), p. 3817 - 3830.
2. H. Kara, H. Filiz Ayyıldız, M.Topkafa, **"Use of aminoprophyl silica-immobilized humic acid for Cu^{+2} ions removal from aqueous solution by using a continuously-monitored solid phase Extraction technique in a column Arrangement",** Colloids and Surfaces A: Physicochem.Eng. Aspects 312, (2008), 62–72