

BAZI BİTKİSEL YAĞLARIN GLİSERİT YAPILARININ BELİRLENMESİ

DETERMINATION OF TRIACYLGLYCEROLS OF SOME VEGETABLE OILS

Aziz TEKİN

Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, ANKARA

ÖZET: Soya, ayçiçek, mısır ve zeytinyağlarının gliserit yapıları, kütle dedektörü (ELSD) bağlı karşıt faz yüksek performans sıvı kromatografisi (RP-HPLC) ve enzimatik metot kullanılarak tespit edilmiş ve sonuçlar kıyaslanmıştır.

Bulgulara göre, her iki yöntemle elde edilen sonuçlar arasında büyük farklılıklar yoktur. Ancak RP-HPLC ile bazı gliserit pikleri ve izomerleri ayrılamazken, enzimatik metot ta bazı yağ asitleri açısından duyarlı bulunmuştur.

ABSTRACT: Triglyceride structures of four different vegetable oils (soybean, sunflower, corn and olive oils) were determined by reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) equipped with evaporative light scattering dedector (ELSD) and the results were compared with those obtained by enzymatic method. According to the results, there are not considerable differences between the results obtained by both methods. However, some glyceride pics and isomers were not able to be seperated by RP-HPLC and enzymatic method was not found sensitive to some fatty acids.

GİRİŞ

Trigliseritler yağların en önemli bileşenleridir. Değişik yapı ve özellikte olan bu bileşiklerin analiz edilmesi, yıllardır üzerinde önemle durulan bir konudur. Bu amaçla geliştirilmiş bazı teknikler mevcuttur. Gümüş nitratlı ince tabaka kromatografisi, emzimatik metot ve yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) bunlar arasında en önemlileridir.

Yıllarca yaygın bir şekilde kullanılan gümüş nitratlı ince tabaka kromatografisinde ayırma işlemi, prensip olarak silikaya yüklenmiş olan gümüş iyonlarının doymamış bağlarla kompleks yapmasına dayanmaktadır. Bu ayırma karbon zincir uzunluğu etkili değildir ve sadece doymamışlık derecesine göre bir ayırma söz konusudur (ACKMAN, 1991). Enzimatik yöntemde ise, lipaz enzimiyle belirli koşullarda gliseritlerin 1,3 bağları parçalanarak elde edilen 2-monogliseritler silika tabakalardan izole edilmekte ve esterleştirilerek gaz kromatografisine verilmektedir (LUDDY ve ark. 1964). Elde edilen bulgulardan özel formüller yardımıyla gliserit çeşit ve oranları hesaplanmaktadır.

Lipid analizlerinde yaygın olarak kullanılan HPLC tekniğinin, diğer kromatografi tekniklerine göre bazı avantajları vardır (HAMILTON, 1986).

a) Hidroperoksitler ve bazı gliseritler gibi yüksek sıcaklıktan zarar gören bileşiklerin analizlerinde HPLC tercih edilmektedir.

b) Kantitatif analizlerde HPLC, ince tabaka tekniğine göre daha avantajlı ve kolaydır.

c) Ayrılan bileşikler kolon çıkışında kolayca toplanabilir ve daha ileri seviyelerde analiz edilebilir.

Karşıt faz yüksek performans sıvı kromatografisi (RP-HPLC) tekniğinin, kompleks gliseritlerin ayırımında kullanıldığı bilinmektedir. Polar kolonlarda ayırmada çift bağın zincir uzunluğuna göre daha etkili olduğu gaz kromatografisi tekniğinin aksine, RP-HPLC ayırımlarında geliş zamanı üzerine çift bağ ve zincir uzunluğu aynı etkiyi yapmaktadır (HAMMOND, 1993).

RP-HPLC üzerine ilk çalışmayı PIE ve ark. (1975) yapmışlar ve metanol/su karışımı kullanarak trikaprin ile trilaurini ayırmışlardır. PARRIS (1978) yeni bir RP-HPLC uygulamasıyla palm, mısır ve balık karaciğeri yağlarında trigliserit analizleri yapmıştır. İlerleyen yıllarda bu konuda çalışmalar devam etmiş ve çeşitli araştırmacılar tarafından teknik sürekli modifiye edilmiştir.

HPLC analizlerinde değişik tipte dedektörler kullanılabilir. Bunlardan en yaygın olanı ultravide dedektördür. Ancak birçok lipid bileşeni ultraviole bölgesindeki ışığı kuvvetli bir şekilde absorbe etmediği için, bu dedektörün lipidler açısından kullanımı sınırlıdır. Diğer bir yaygın dedektör ise diferansiyel refraktometre dedektörüdür. Fakat çözgen programı uygulandığında bu dedektörden sağlıklı sonuçlar almak mümkün olmamaktadır. Çünkü çözgen kompozisyonu değiştğinde, refraktif indeks te değişmekte ve bu durum referans kullanılarak da düzeltilmemektedir. Bu nedenlerden dolayı son yıllarda ultraviole ve refraktif indeks dedektörlerin yerini kütle, alev iyonizasyon ve kütle spektrometri dedektörleri almaya başlamıştır. Bu çeşit dedektörler bütün çözgen ve çözgen karışımlarıyla çalışmaya izin vermektedir (KUKSİS, 1994).

Bir kütle dedektörü olan ELSD, çok yönlü ve kullanımı kolay olan bir dedektördür. Prensip olarak, örnek dedektöre girdikten sonra N₂ gazı ile dedektör tüpüne doğru sürüklenmekte ve burada çözgen, sıcaklık etkisiyle buharlaşmaktadır. Sürüklenme hızıyla tüpten çıkan partiküller lazer ışık demetinin içinden geçerken ışığı dağıtmakta ve bu dağılıma dedektör tarafından algılanmaktadır. Burada önemli olan, ışık demetinin içine giren katı kısmın partikül büyüklüğüdür (HAMMOND, 1993).

Bu çalışmada soya, ayçiçek, mısır ve zeytinyağlarının gliserit analizleri gerek ELSD bağlanmış RP-HPLC, gerekse enzimatik yöntemle yapılmış ve sonuçlar kıyaslanmıştır.

MATERYAL VE METOD

Materyal

Rafine soya, mısır ve ayçiçek yağları ile riviera tipi zeytinyağı kullanılmıştır.

Metod

a. Yağ Asitleri Kompozisyonu: HAMMOND (1991)'e göre hazırlanan örnekler, aşağıda çalışma koşulları verilen gaz kromatografisine enjekte edilmiştir.

Gaz kromatografisi: Hewlett Packard 5890 Series III

Dedektör : FID

Kolon : Supelco Sp-2380 15m, 0.25 mm

Sıcaklıklar

Dedektör : 250 °C

Kolon : 200 °C

Enjektör : 250 °C

b. 2- Monogliseritlerin Analizi: Örnekler LUDDY ve ark. (1964)'na göre hazırlanmış ve analizde 1,3-pankreatik lipaz (Sigma) kullanılmıştır. Yukarıda verilen gaz kromatografi koşulları kullanılarak, 2- pozisyonundaki yağ asitleri tespit edilmiştir.

c. Trigliserit Yapılarının HPLC ile Belirlenmesi: Analizde kullanılan cihaza ait bilgiler aşağıdaki gibidir:

Kolon : Supelcosil LC-18 25 cm, 4.6mm, 5 µm

Pompa : Shimadzu LC-600

İntegratör: Shimadzu CR 501

Dedektör : Varex ELSD

Taşıyıcı solvent olarak aseton: asetonitril (75:25) karışımı ve akış hızı olarak da 1.5 ml/dakika kullanılmıştır (ANONYMOUS, 1989). Aseton içerisinde %2.5 oranında hazırlanan örnekler 0,45 µm'lik filtrelerden geçirildikten sonra 10 µl düzeyinde enjekte edilmiştir. Yapılan denemeler sonucunda dedektöre ait çalışma koşulları aşağıdaki gibi belirlenmiştir.

Egzost sıcaklığı : 64.5 °C

Tüp sıcaklığı : 104 °C

N₂ gaz akış hızı : 40 ml/dakika.

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Soya, ayçiçek, mısır ve zeytinyağlarına ait genel yağ asiti dağılımları Çizelge 1, 2- yerleşimli yağ asiti dağılımları Çizelge 2 ve gliserit dağılımları da Çizelge 3'te verilmiştir.

Çizelge 1 ve Çizelge 2 incelendiğinde, genel yağ asiti dağılımlarında %83.31-88.66 arasında değişen toplam doymamış yağ asiti oranlarının 2- yerleşimde %98.10-99.69'a kadar yükseldiği görülmektedir. Enzimatik olarak yapılan diğer çalışmalarda da 2- yerleşimde %98-99 oranında oleik ve linoleik asitlerin yer aldığı belirtilmiştir (HILDITCH, 1965). Ayrıca soya, ayçiçek ve mısır yağlarında 2- yerleşimde oleik ve linolenik asitler, genel yağ asitlerine göre bir miktar azalmış, buna karşılık linoleik asit oranı artmıştır. LITCHFIELD (1972) tohum yağlarında uzun zincirli ve doymuş yağ asitlerinin 1,3 yerleşime eşit olarak dağıldığını, daha sonra oleik ve linolenik asitlerin 1,3 yerleşim öncelikli olmak üzere, her üç pozisyona da dağıldığını ve geriye kalan yerleşimlerin linoleik asit tarafından doldurulduğunu belirtmiştir. Fakat meyve yağları için bu durum sözkonusu değildir. Nitekim araştırmada da zeytinyağında 2- yerleşimde oleik ve linolenik asit oranlarının arttığı görülmektedir.

Diğer taraftan Çizelge 3 incelendiğinde, HPLC ve enzimatik metotla tespit edilen gliserit oranlarında genellikle bir uyum sözkonusudur. Beş farklı kakao yağı üzerinde HPLC ve ince tabaka gaz kromatografi kombinasyonu teknikleriyle yapılan gliserit analizleri sonuçlarında da birkaç küçük farklılık dışında benzer sonuçlar bulunmuştur (SHUKLA, 1991). Ancak yapılan çalışmalarda 1,3 bağlarını parçalayan lipaz enziminin kısa zincirli ve çoklu doymamış yapıdaki yağ asitlerini (linolenik) daha kolay hidroliz edebildiği tespit edilmiş ve

Çizelge 1. Soya, ayçiçek, mısır ve zeytinyağlarına ait genel yağ asiti dağılımları (%)

YAĞ	YAĞ ASİTİ					Toplam Doymuş	Toplam Doymamış
	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3		
Soya	10.67	4.50	23.66	54.32	6.85	15.17	84.83
Ayçiçek	6.51	4.83	19.09	69.02	0.55	11.34	88.66
Mısır	10.92	2.02	26.70	59.24	1.11	12.94	87.05
Zeytin	13.16	3.02	72.41	10.59	0.31	16.08	83.31

Çizelge 2. Soya, ayçiçek, mısır ve zeytinyağlarına ait 2- yerleşimli yağ asiti dağılımları (%)

YAĞ	YAĞ ASİTİ					Toplam Doymuş	Toplam Doymamış
	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3		
Soya	0.34	0.75	22.82	70.13	5.95	1.09	98.90
Ayçiçek	0.31	-	15.35	84.34	-	0.31	99.69
Mısır	1.28	0.26	25.18	72.47	0.81	1.54	98.46
Zeytin	1.58	0.31	83.33	14.18	0.59	1.89	98.10

mamaktadır. Çünkü RP-HPLC ayrımlarında geliş zamanı üzerine çift bağ ve zincir uzunluğu aynı etkiyi yapmaktadır (HAMMOND; 1993). Bu nedenle Çizelge 3'ten de görüleceği gibi, LLL+LnLO, LLS+POL veya SOL+POL gibi pikleri ayırmak mümkün olmamıştır. Enzimatik yöntemde bu sayılan dezavantajlar yoktur, ancak FRANZKE ve ark. (1973)'ün da belirttiği gibi, duyarlı bir yöntem değildir. Bu nedenle, gliserit analizlerinde güvenilir sonuçlar elde edilebilmesi için, her iki yöntemin kombine edilerek çalışılması daha uygun olacaktır.

analiz sonucunda özellikle linoleik asit oranının arttığı ifade edilmiştir. (FRANZKE ve ark., 1973; KAYAHAN, 1981). Araştırmada da benzer sonuçlar bulunmuştur. Örnek olarak, soya ve zeytin yağlarında HPLC ile yapılan analizlerde sırasıyla %0.14 ve %0.15 oranlarında tespit edilen trilinolenin ve tripalmitine enzimatik denemelerde rastlanmamıştır. Ayrıca, bütün örneklerde, trioleinin HPLC ile tespit edilen oranları, enzimatik analizlerde bulunanlardan daima fazla çıkmıştır. Bunun dışında, doymuşluk oranı artan gliseritler enzimatik denemelerde daha yüksek oranlarda tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, HPLC ve enzimatik metotla yapılan gliserit analizlerinde çok farklı sonuçlar elde edilmemesine rağmen, her iki yöntemde de bazı avantaj ve dezavantajlar vardır. Kolay, hızlı ve pratik olmasına rağmen, HPLC teknikleriyle bazı piklerin ve izomerlerin teşhisi yapıla-

Çizelge 3. Soya, ayçiçek, mısır ve zeytinyağlarının HPLC ve enzimatik metotla belirlenen gliserit oranları (%)

TRİGLİSERİT	SOYA		AYÇİÇEK		MISIR		ZEYTİN	
	HPLC	Enzimatik	HPLC	Enzimatik	HPLC	Enzimatik	HPLC	Enzimatik
LnLnLn	0.14	-	-	-	-	-	-	-
LnLnL	0.99	0.77	-	-	-	-	-	-
LLLn	8.29	6.06	0.15	0.85	0.64	1.17	-	-
LnLnO		0.33	-	-	-	-	-	-
LLL	22.35	15.19	30.69	31.86	24.26	20.14	0.19	0.11
LnLO		5.34		0.44		1.06	-	-
LnLnP		0.14	-	-		0.42	-	-
PLLn	3.45	1.89	-	-	-	-	-	-
LLO	17.37	20.65	29.22	27.48	25.70	27.98	-	2.33
LLP	15.34	10.36	13.13	10.37	16.01	11.31	3.42	0.48
LnOO		1.14	-	-		0.23		0.42
LnOP		0.10	-	-		0.11	-	-
PPLn		0.15	-	-		-	-	-
SLLn		1.05	-	-		-	-	-
OOL	8.21	9.17	7.02	7.64	13.26	12.75	15.90	16.22
LLS	12.69	4.30	15.91	7.48	12.29	2.28	7.11	0.11
POL		8.74		5.27		10.19		6.55
PPL	1.70	1.79	0.16	0.81	0.81	3.58	0.37	0.55
SOLn		0.42	-	-	-	-	-	-
OOO	2.43	1.32	1.00	0.67	2.75	1.90	39.06	37.44
SOL	4.84	3.66	1.49	3.90	3.01	2.15	24.52	21.78
OOP		1.85		0.61		2.00		1.51
PSL	1.21	1.53	0.42	1.19	0.14	0.69	-	-
PPO		0.60		0.14	0.21	0.65	1.95	3.37
PPP	-	-	-	-	-	-	0.15	-
OOS	0.66	0.70	0.41	0.46	0.36	0.40	3.48	5.01
SLS	0.13	0.33	0.15	0.44	-	0.12	-	-
SOP	0.20	0.53	-	0.22	-	0.26	0.37	0.49
SOS	-	0.11	-	-	-	-	0.15	0.18

KAYNAKLAR

- ACKMAN, R.G. 1991. Application of Gas-Liquid Chromatography to Lipid Separation and Analysis: Qualitative and Quantitative Analysis, Analyses of Fats, Oils and Lipoproteins, Ed. Perkins, E.G., AOCS, Illinois, 270-300.
- ANONYMOUS, 1989. Individual Triglycerides in Oils and Fats by HPLC. AOCS Official method. Ce 5c-93.
- FRANZKE, C., HOLLSTEIN, E., KROLL, J., NOSKE, H.J., 1973. Studien zur Glyceridstruktur von Fetten. I. Vergleichende Untersuchungen an Modellsbstanzten über den einsatz von Pankreas Lipase und Methylmagnesium Bromid zur Struktur Spezifischen Triglyviridspaltung. Fette Seifen Anst. 75:365-369.
- HAMILTON, R.J., 1986. Thin Layer Chromatography and High Performance Liquid Chromatography. Analysis of Oils and Fats. Ed. Hamilton, R.J. ve Rossel, J.B., Elsevier Applied Science, London, 243-312.
- HAMMOND, E.W., 1993. Chromatography for the Analysis of Lipids. CRC Press. London. 113-153.
- HAMMOND, E.G. 1991. Organization of Rapid Analysis of Lipids in Many Individual Plants. Modern Methods of Plant Analysis. New Series. Vol:12. Essential Oils and Waxes. Ed. Linskens, H.F. ve Jackson, J.F., Springer Verlag, Berlin, 321-330.
- HILDITCH, T.P., 1965. Symposium on Analysis of Natural Fat Triglycerides. J. Amer. Oil Chem. Soc. 42: 745-747.
- KAYAHAN, M., 1981. Triglyceritlerdeki Asit Köklerinin Yerdeğişimi Tepkimelerinden Yararlanılarak Hayvansal Yağların Margarin Hammaddelerine İşlenebilmeleri Üzerine Bir Araştırma. Ege Üniv. Gıda Fak. Yay. No.2, İzmir, s.99.

- KUKSIS, A., 1994. GLC and HPLC of Neutral Glycerolipids. Lipid Chromatographic Analysis, Ed. Shibamoto, T., Marcel Decker, New York, 177-222.
- LITCHFIELD, C. 1972. Analysis of Triglycerides. Academic Press. London. 335 s.
- LUDDY, F.E., BARFORD, R.A., HERB, S.F., MAGIDMAN, P., REIMENSCHNEIDER, R.W., 1964. Pancreatic Lipase Hydrolysis of Triglycerides by a Semimicro Technique. J. Amer. Oil Chem. Soc. 41:693-696.
- PARRIS, N.A., 1978. J. Chromatography, 149:615-624.
- PEI, P.T.S., HENLY, R.S., RAMACHANDRAN, S., 1975. Lipids. 10:152-156.
- SHUKLA, V.K.S., 1991. Application of HPLC to Lipid Separation and Analysis. Neutral Lipids. Analysis of Fats, Oils and Lipoproteins. Ed. Perkins. E.G., AOCS, Illinois 210-213.

GIDA Dergisi 1998 Yılı Reklam Fiyatları aşağıdaki şekilde belirlenmiştir.

Fiyatlar bir sayı için olup KDV dahil değildir.

Trikrom ofset baskıya uygun filmlerin gönderilmesi gereklidir.

Arka Kapak : 30.000.000.-TL.

Kapak İçeri : 24.000.000.-TL.

İç Sayfa (1/1) : 16.000.000.-TL.

**Gıda Teknolojisi Derneği
Yönetim Kurulu**

GIDA Dergisi 1998 yılı dizgi ücreti abone olanlar için 4.000.000.-TL. abone olmayanlar için 6.000.000.-TL. olarak yeniden belirlenmiştir.

Ayrı basım; talep eden araştırmacılara 1000.000.-TL. ek ücret karşılığında verilecektir.

**Gıda Teknolojisi Derneği
Yönetim Kurulu**