



## Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi

<https://dergipark.org.tr/tr/pub/yyufbed>



Araştırma Makalesi

### Katı Faz Mikroekstraksiyon-Gaz Kromatografisi Metodu ile Malonaldehit ve Hegzanal Tayini

Tahir YÜCEL, İsa CAVİDOĞLU\*

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, 65080, Van, Türkiye  
Tahir YÜCEL, ORCID No: 0000-0003-0688-9499, İsa CAVİDOĞLU, ORCID No: 0000-0001-7896-5871  
\*Sorumlu yazar e-posta: isacavidoglu@yyu.edu.tr

#### Makale Bilgileri

Geliş: 07.12.2022  
Kabul: 10.03.2023  
Online Ağustos 2023

DOI:10.53433/yyufbed.1215854

#### Anahtar Kelimeler

Ekstraksiyon,  
Hegzanal,  
Katı faz mikroekstraksiyon,  
Malonaldehit

**Öz:** Bu çalışmada, ayçiçeği yağında Katı faz mikroekstraksiyon (SPME) tekniği ile ekstraksiyon süresi (20, 30 ve 40 dakika) ve sıcaklığının (40, 50 ve 60 °C) hegzanal (HE) ve malonaldehit (MA) ekstraksiyonu üzerindeki etkileri araştırılmıştır. HE ve MA'nın kantitatif analizi için İç Standart (IS) olarak 5-Metil 2-hegzanon (500 ppb) kullanılmıştır. HE ve MA'nın IS ile aralarındaki ilişkinin düzeyini belirlemek için ayçiçeği yağına farklı oranlarda HE ve MA (5 ppb, 10 ppb, 50 ppb, 100 ppb, 0.5 ppm, 1 ppm, 5 ppm ve 10 ppm) ve IS (500 ppb) eklenmiştir. Değişkenler arasındaki ilişki, regresyon denklemi ( $y = mx + n$ ) ve değişkenler ( $x = HE$  veya  $MA$ 'nın derişimi/ $IS$ 'nin derişimi;  $y = HE$  veya  $MA$ 'nın alanı/ $IS$ 'nin alanı) arasındaki regresyon katsayılarının ( $R^2$ ) belirlenmesi ile değerlendirilmiştir.  $MA$  polar ve reaktif olduğu için  $MA$  ile  $IS$  arasındaki  $R^2$  değeri ( $0.015 < R^2 < 0.606$ ) oldukça düşük bulunmuş ve  $MA$ 'nın nicel analizi için bu yöntemin uygun olmadığı tespit edilmiştir.  $HE$  ile  $IS$  arasındaki  $R^2$  göz önüne alındığında  $HE$ 'nin analizi için en uygun ekstraksiyon sıcaklığı ve süresinin 60 °C ve 20 dakika olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak, hızlı ve çözücü gerektirmeyen bir yöntem olan SPME'nin,  $HE$ 'in ayçiçeği yağında tespitinde kullanılabilirken,  $MA$ 'nın tespit edilebilmesi için SPME yöntemi ile saptanabileceği türevlerine dönüştürülmesi gerektiği saptanmıştır.

### Quantification of Malonaldehyde and Hexanal by Solid Phase Microextraction-Gas Chromatography Method

#### Article Info

Received: 07.12.2022  
Accepted: 10.03.2023  
Online August 2023

DOI:10.53433/yyufbed.1215854

#### Keywords

Extraction,  
Hexanal,  
Malonaldehyde,  
Solid phase microextraction

**Abstract:** In the present study, the effects of extraction time (20, 30 and 40 minutes) and temperature (40, 50 and 60 °C) on the extraction of hexanal (HE) and malonaldehyde (MA) in sunflower oil with Solid Phase Micro-extraction technique (SPME) were investigated. For the quantification of HE and MA, 5-Methyl 2-hexanone (500 ppb) was added as Internal Standard (IS). In order to determine the level of relationship between HE and MA with IS, different ratios of HE and MA (5 ppb, 10 ppb, 50 ppb, 100 ppb, 0.5 ppm, 1 ppm, 5 ppm and 10 ppm) and IS (500 ppb) were added to sunflower oil. The relationship between the variables was evaluated by the regression equation ( $y = mx + n$ ) and the determination of the correlation coefficients ( $R^2$ ) between the variables ( $x=HE$  or  $MA$  concentration/ $IS$  concentration;  $y = HE$  or  $MA$  area/ $IS$  area). Because of the high reactivity and polarity of  $MA$ , the correlation between  $MA$  and  $IS$  was not sufficient ( $0.015 < R^2 < 0.606$ ) to explain the linearity between  $MA$  and  $IS$  in the sunflower oil. Considering the  $R^2$  values between  $HE$  and  $IS$ , it was determined that the optimum extraction temperature and time for the analysis of  $HE$  was 60 °C and 20 minutes. As a result, SPME which is a fast and solvent-free technique, can be used in the determination of  $HE$  in sunflower oil, while for determination of  $MA$ , it must be derivatized for analysis by SPME.

## 1. Giriş

Gıdalardaki oksidasyon süreci; ısı ve ışık gibi bir enerji kaynağı, yağ asidi bileşimi, oksijen çeşidi, metal, pigment, fosfolipid, antioksidan vb. minör bileşenler gibi unsurların varlığında meydana gelen kompleks bir olaydır. Oksidasyon başlangıç, ilerleme ve sonlanma olmak üzere üç basamaktan oluşur ve süreç sonunda hidroperoksitler ve uçucu bileşenler meydana gelmektedir (Choe & Min, 2006).

Hidroperoksitlerin parçalanması sonucunda önemli oranda aldehitler oluşmaktadır. Aldehitler gıdada hoşta gitmeyen tat ve kokuların oluşmasından sorumludurlar. HE (hegzanal), MA (malonaldehit), pentanal, propanal ve 4-hidroksi nonenal yaygın olarak oluşan aldehitlerdir. HE ve propanal, gıdalarda lipid oksidasyonunun bir göstergesi olarak kullanılmaktadırlar. HE ve propanal çift bağ içermemelerinden dolayı doymamış aldehitlere göre daha stabildirler. Özellikle HE başta olmak üzere oksidatif stabilitenin ve tadın kabul edilebilirliğinin bir göstergesi olarak ve ayrıca gıdalardaki yağ oksidasyonunun düzeyini belirlemek için kullanılmaktadır (Mariutti ve ark., 2009; Pignoli ve ark., 2009; Bak ve ark., 2020).

MA, omega-3 ve omega-6 yağ asitlerinin oksidasyonu sonucu oluşan karakteristik bir aldehittir (Vandemoortele ve ark., 2021). MA lipid oksidasyonunun ve özellikle et ve et ürünleri gibi çeşitli gıdalardaki acılaşmanın bir göstergesi olarak kullanılmaktadır. Elverişsiz depolama koşulları altında uzun depolama sürecinde ransit tat ve kokular oluşabilmektedir (Fan, 2002; Shin, 2009; Shin & Jung, 2009; Ruan ve ark., 2014).

Gıdalardaki oksidasyon durumunu tespit etmek için peroksit, anisidin, konjuge-dien ve -trien, toplam oksidasyon ve 2-tiyobarbütirik asit reaktif maddeler (TBARS) değerleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunların arasında TBARS diğer yöntemlere göre kısmen kolay ve hızlı bir yöntemdir. Ancak TBARS değeri spesifik ve duyarlı bir analiz olmadığı için geniş ölçekte tartışılmaktadır. TBARS analizinde diğer oksidasyon ürünleri veya lipid oksidasyonu ile ilişkili olmayan bileşenler tiyobarbütirik asit ile reaksiyona girebildiklerinden dolayı lipid oksidasyonunun düzeyi olması gereken değerden daha fazla çıkabilmektedir (Ma ve ark., 2014). HE, ayçiçeği yağının başlıca yağ asidi olan linoleik asidin oksidasyonu sonucu oluşan bir aldehittir (Camiletti ve ark., 2023). HE yağların oksidasyonu sonucu oluşan esas uçucu bileşenlerden biridir. Lipit oksidasyon sürecini ve pişmiş gıdalardaki istenmeyen lezzet bileşenlerinin oluşumunu gözlemlemek için son zamanlarda sıkça kullanılmaktadır (Brunton ve ark., 2000; Panseri ve ark., 2011; Ma ve ark., 2014; Xu ve ark., 2023).

Genel olarak analiz yöntemleri örnek alma (örneğin toplanması), örnek hazırlama, ayırma, saptama ve data analizi gibi işlemleri içermektedir (Vas & Vekely, 2004; Jalili ve ark., 2020). Yapılan araştırmalarda analiz süresinin önemli bir bölümünü örnek toplama ve örnek hazırlamaya ayırmak gerekmektedir. Enstrümantal cihazların örnek matriksinden doğrudan analiz yapamamasından dolayı bu süre gereklidir. Günümüzde çözücü kullanılarak yapılan örnek hazırlama işlemleri (sıvı-sıvı ekstraksiyon teknikleri) zaman alıcı, yoğun emek ve çok aşamalı işlemleri gerektirmektedir. Ancak analiz aşamaların artması, hata ve kayıplara neden olur. Sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi yüksek oranda çözücü kullanılmasını gerektirmektedir. Atık çözücülerin imhası analiz maliyetini arttırmakla beraber çevreyi kirletmekte ve laboratuvarında çalışanlar için sağlık riskleri teşkil etmektedir. Katı faz ekstraksiyon kartuşu kullanmak klasik sıvı-sıvı ekstraksiyon yönteminin yol açtığı kısıtlamaları azaltmaktadır. Kartuş kullanılarak uygulanan katı faz ekstraksiyonunda daha az çözücüye gereksinim duyulmasına rağmen sıvı-sıvı ekstraksiyonda olduğu gibi zaman alıcı ve çok aşamalı işlemleri gerektirmekte ve yoğunlaştırma aşamasında uçucu bileşenlerde kayıp söz konusu olmaktadır (Vas & Vekely, 2004).

Günümüzde örnek hazırlamada pratik bir metot olan SPME yöntemi sıkça uygulanmaktadır. SPME tekniği, sıvı-sıvı ekstraksiyonu ve katı faz ekstraksiyonunun dezavantajlarını gidermek üzere tasarlanmıştır. SPME; çözücü kullanmadan örnekleme, ekstraksiyon ve yoğunlaştırma gibi birçok adımı birleştirmektedir. Örnek içindeki analitler doğrudan fiber ile ekstrakte edilip yoğunlaşması sağlanmaktadır. Bu yöntem, örnek hazırlamada zamandan ve atıkların bertaraf edilmesi maliyetinden tasarruf sağlamaktadır. SPME genellikle Gaz Kromatografisi (GC) ve GC/Kütle Spektroskopisi (MS) ile kombinasyon olarak kullanılmaktadır. Özellikle çevresel, biyolojik ve gıda örneklerindeki uçucu ve yarı uçucu bileşenlerin ekstraksiyonunda kullanılabilirliktedir. SPME ayrıca uçuculuğu düşük olan ve

termal olarak bozulan bileşenleri analiz etmek için Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile kombine olarak kullanılmaktadır (Vas & Vekely, 2004; Pawliszyn, 2012; Jalili ve ark., 2020).

SPME tekniği; kullanılan fiber kaplamanın çeşidi, fiber kaplamanın kalınlığı, ekstraksiyon süre ve sıcaklığı, örnek hacmi, karıştırma, tuz ekleme ve pH gibi pek çok faktörden etkilenmektedir (Prosen & Kralj, 1999; Spietelun ve ark., 2013; Dadalı & Elmacı, 2019). Ekstraksiyonun süre ve sıcaklığı, işlemin etkinliğini belirleyen temel parametrelerdir. Sıcaklık, ekstraksiyona iki şekilde etkilemektedir. Sıcaklığın artışıyla fazlar arasındaki kütle transferi hızlanırken aynı zamanda dağılım katsayısı da düşmektedir. Dolayısıyla sıcaklık değişimi en çok tepe boşluğu ekstraksiyon tekniğinde uygulanmaktadır. Çünkü sıcaklığın artmasıyla birlikte bileşenlerin örnekte tepe boşluğuna aktarım hızı artmaktadır (Prosen & Kralj, 1999; Pawliszyn, 2012; Spietelun ve ark., 2013). Ekstraksiyon süresi; sıcaklık, bileşenin dağılım katsayısı ve karıştırma gibi birkaç faktöre bağlı olarak değişmektedir. Bileşenler maksimum sorbsiyona ulaştığında dengeye ulaşılmaktadır. Dengeye ulaşmak için gereken süre genellikle uzundur ve şiddetli karıştırma ile bu süre kısaltılmaktadır. Karıştırma doğrudan ekstraksiyon yönteminde önemli bir parametredir (Prosen & Kralj, 1999; Spietelun ve ark., 2013).

Fan (2002),  $\gamma$ -ışımına maruz kalmış elma suyundaki MA miktarını GC-MS kullanarak tespit edip, bu yöntemi TBARS testi ile karşılaştırmıştır. GC-MS ile kıyaslandığında TBARS testi ile ölçülen MA miktarı daha yüksek bulunmuştur. Bu durum GC-MS yönteminin TBARS yöntemine kıyasla daha hassas olduğunu göstermiştir. Nzekoue ve ark. (2019) peynirdeki serbest yağ asitleri ve HE'yi tespit etmek için SPME-GC-MS yöntemini uygulamışlardır. Geliştirilen bu yöntemin gıda endüstrisindeki raf ömrü ve kalite kontrolü çalışmalarına katkı sunabileceğini belirtmişlerdir. Maher ve ark. (2015) konvansiyonel sprey kurutucu kullanarak hazırlanan emülsiyon ve nano-emülsiyondaki lipit oksidasyon derecesinin göstergesi olan pentanal ve HE miktarını tespit etmek için SPME-GC yöntemini uygulamışlardır. Ma ve ark. (2014), SPME-GC yöntemi ile yerfıstığı, soya ve zeytin yağı örneklerindeki HE miktarını tespit etmişlerdir.

Bu çalışmada, yağların oksidasyon düzeyinin göstergesi olarak değerlendirilen HE ve MA'nın miktarı hızlı ve çözücü kullanılmadan uçucu bileşenlerin ekstraksiyonunu sağlayan SPME yöntemi ile saptanması araştırılmıştır. Çalışmada, ayçiçeği yağına farklı oranlarda HE ve MA konularak, IS (5-metil 2-hegzanon) varlığında 3 fazlı SPME fiberin bu bileşenleri ekstrakte etme etkinliği araştırılmıştır. Böylece 3 fazlı SPME fiberi ve GC ile farklı sıcaklık ve süre koşullarında HE ve MA'nın tespit edilebileceği düzeyler araştırılırken, aynı zamanda bu iki bileşenin iç standart olarak kullanılan 5-metil 2-hegzanon ile ilişki düzeyini gösteren denklem ve ilişki katsayıları hesaplanmıştır.

## 2. Materyal ve Yöntem

### 2.1. Materyal

Yapılan çalışmada Van ili piyasasından temin edilen ayçiçeği yağı kullanılmıştır. Ayçiçeği yağı oksidatif stabilize çalışmalarında sıkça kullanılan bir yağ olduğundan dolayı bu çalışmada kullanılmıştır. Çalışmada, yüksek saflıkta ve nitelikte HE (Merck, Germany), MA (Acros Organics, New Jersey, USA) ve IS (Merck, Germany) kullanılmıştır.

### 2.2. Yöntem

Çalışmada HE ve MA'nın kantitatif analizi için iç standart olarak kullanılan 5-metil 2-hegzanon ile ilişkilerini gösteren regresyon denklemi ve regresyon katsayısı belirlenmiştir. Bunun için, ayçiçeği yağına metanolde hazırlanan stok HE ve MA çözeltilerinden daha önce belirlenen derişimler (5 ppb, 10 ppb, 50 ppb, 100 ppb, 500 ppb, 1 ppm, 5 ppm ve 10 ppm) hazırlanarak örneğe konulmuştur. 3 faz DVB/CAR/PDMS (Supelco Co., Bellefonte, PA, USA) SPME fiberi kullanılarak her bir örneğe 3 farklı sıcaklık ve süre uygulanarak SPME fiberinin yapısına alabileceği HE ve MA miktarları saptanmıştır. Çalışmada analiz parametreleri olarak 3 farklı sıcaklık (40, 50 ve 60 °C), 3 farklı süre (20, 30 ve 40 dk) ve 8 farklı derişime 2 tekerrürlü SPME ekstraksiyonu uygulanmıştır.

#### 2.2.1. Hegzanal ve malonaldehit analizi

HE ve MA analizi için 3 fazlı SPME fiberi, ekstraksiyondan önce 1 saat boyunca 250 °C'de GC cihazının enjeksiyon bloğunda koşullandırılmıştır. 2 g yağ örneği 30 ml'lik cam bir vialde tartılmış

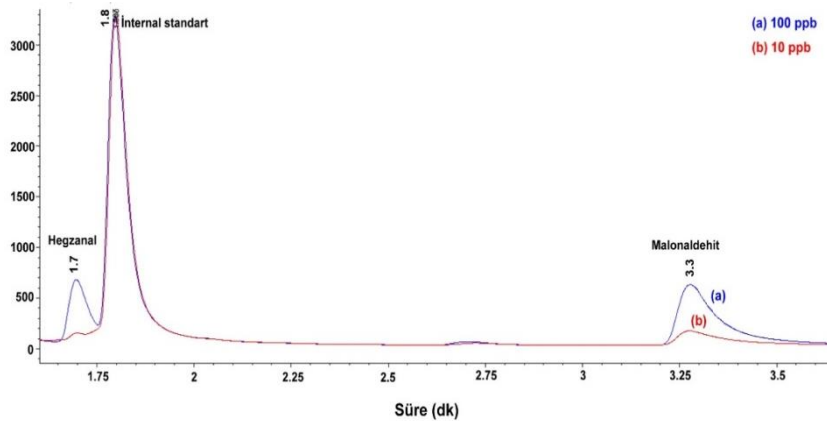
ve örneklere belirlenen oranda HE ve MA ve IS olarak bütün örnekler için sabit miktarda 500 ppb düzeyinde 5-metil-2-hegzanon eklendikten sonra vial dijital olarak sıcaklığı ayarlanabilen bir manyetik karıştırıcıda istenilen sıcaklığa gelmesi için 5 dk boyunca bekletilmiştir. Böylece ortam sıcaklığının istenen değere ulaşması sağlanmıştır. Sonrasında SPME fiberi vialin tepe boşluğuna daldırılarak daha önce belirlenen sıcaklık ve süreyle HE ve MA'nın örnekten tepe boşluğuna oradan da fibere geçmesi sağlanmıştır. Ekstraksiyon sonunda SPME fiberi, dedektör olarak Alev İyonizasyon Dedektörü (FID) bulduran GC cihazına absorbe olan örneklerin desorbe olması için doğrudan enjekte edilmiştir. Bu çalışmada Agilent firmasının 6890N model GC cihazı kullanılmış olup kolon olarak 30m x 0.25mm x 0.25µm boyutlarında HP-INNOWAX seçilmiştir. Gazların akış hızı helyum, hidrojen ve kuru hava için sırasıyla, 40 ml/dk, 40 ml/dk ve 450 ml/dk olarak belirlenmiştir. Enjektör, kolon ve dedektörün sıcaklıkları ise sırasıyla, 200 °C, 140 °C ve 260 °C seçilmiştir. GC ile elde edilen alanlar kullanılarak veriler değerlendirilmiştir. Bunun için MA'nın derişiminin IS'nin derişimine oranı ile MA'nın alanının IS'nin alanına oranı bir grafiğe aktarılarak grafiğin regresyon denklemi ve R<sup>2</sup> değeri her sıcaklık ve süre için hesaplanmıştır. Aynı şekilde HE ve IS arasındaki ilişki de bu şekilde belirlenmiştir. Böylece farklı ekstraksiyon sıcaklığı ve süreleri için elde edilen denklemlerle bilinmeyen bir yağ örneğindeki HE ve MA miktarlarını saptamaya yarayan denklemler türetilmiştir.

### 2.3. Veri analizi

Verilerin analizinde; regresyon denklemleri ve R<sup>2</sup> değerlerini hesaplamak için Microsoft Excel 2010 paket programı kullanılmıştır. R<sup>2</sup>, bağımlı ve bağımsız değişken arasındaki ilişkinin derecesini ve yönünü gösteren katsayıdır. Bu katsayı, (-1) ile (+1) arasında bir değer almaktadır. Eğer; R<sup>2</sup> = 1 ise iki değişken arasında pozitif tam bir ilişki vardır. Korelasyon katsayısı (R<sup>2</sup>) = -1 ise iki değişken arasında negatif tam bir ilişki vardır (Kayaalp & Çankaya, 2008). Verilerin değerlendirilmesinde her bir sıcaklık ve süre parametresi için y = mx + n gibi doğrusal regresyon denklemi türetilmiştir. Burada x bağımsız değişken olup HE veya MA derişiminin IS derişimine oranı olarak ifade edilirken, y bağımlı değişken olup HE veya MA'nın pik alanının IS pik alanına bölünmesi ile hesaplanmıştır. Böylece uygulanan sıcaklık ve sürelerde ayçiçeği yağında HE ve MA'nın miktarlarını belirlemeye yarayan regresyon denklemleri yukarıda belirtilen parametrelerden (x ve y) yararlanarak türetilmiştir (Javidipour & Qian, 2008).

### 3. Bulgular ve Tartışma

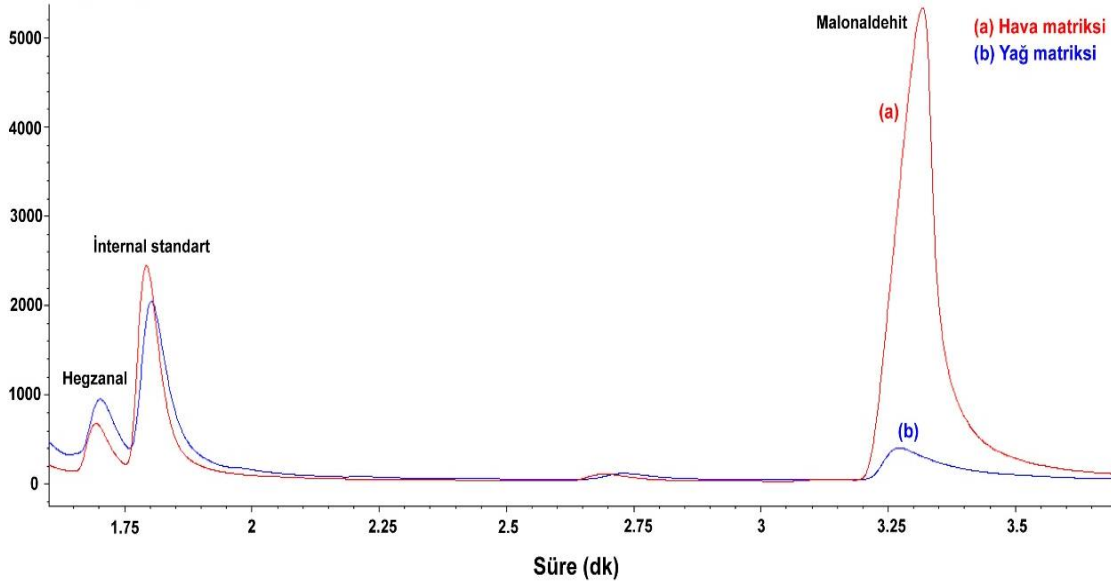
Bu çalışmada oksidasyonunun göstergesi olarak değerlendirilen HE ve MA'yı SPME ile ekstrakte ederken sıcaklığın ve sürenin SPME performansı üzerine etkisi araştırılmıştır. Belirlenen parametrelerin SPME performansı üzerine olan etkisini araştırmadan önce HE, MA ve IS'nin geliş sürelerini belirlemek için iki farklı vial kullanılmıştır. Birinci vialde 100 ppb HE, 100 ppb MA ve 500 ppb IS ilave edilirken; ikinci vialde 10 ppb HE, 10 ppb MA ve yine 500 ppb IS ilave edilmiştir. 40 °C'de 30 dk ekstraksiyondan sonra GC'de yapılan analiz sonucunda Şekil 1'deki kromatogramlar elde edilmiştir.



Şekil 1. İki farklı derişimde HE ve MA ile 500 ppb IS ilave edilen örneğe 40 °C'de 30 dk ekstraksiyondan sonra elde edilen GC kromatogramı.

Kromatogramda görüldüğü üzere HE, IS ve MA'nın geliş süreleri sırasıyla, 1.7, 1.8 ve 3.3 dk olarak belirlenmiştir. Kromatograma bakıldığında IS sabit miktarda ilave edildiği için her iki pik de aynı yükseklikte olduğu görülmektedir. HE ve MA'nın derişimlerinin artması ile ilgili piklerin alanında da artış saptanmıştır.

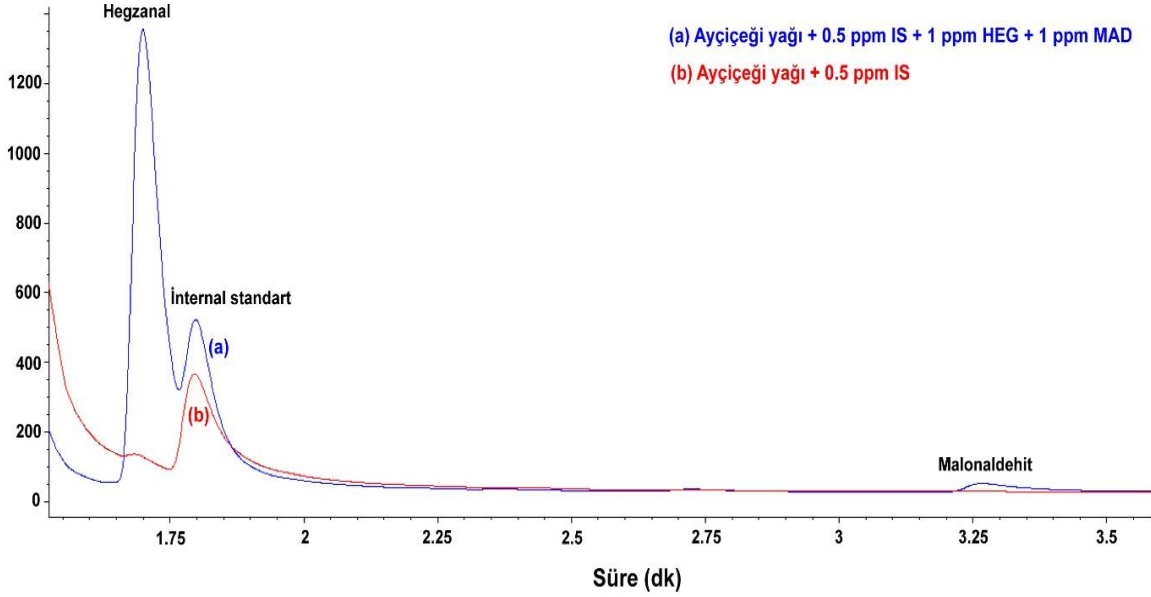
Matriks etkisini araştırmak amacıyla hiçbir madde konulmadan boş vial ve ayçiçeği yağı matriks olarak seçilmiştir. Bu iki ortamda belirlenen derişimlerde farklı süre ve sıcaklıklarda SPME'nin performansı araştırılmıştır. Belirlenen örnek matrikslerine 500 ppb HE, IS ve MA konulmuştur. 40 °C'de 30 dk ekstraksiyondan sonra GC'de Şekil 2'de görülen kromatogram elde edilmiştir.



Şekil 2. 500 ppb HE, IS ve MA ilave edilmiş hava ve yağ matrikslerinde 40 °C ve 30 dk ekstraksiyon sonrasına ait GC kromatogramı.

Şekil 2'deki kromatograma bakıldığında her iki ortamda da IS ve HE'nin pikleri birbirine benzerken, yağ örneğinde MA'nın pikinde çarpıcı biçimde bir düşüş olduğu görülmektedir. Hava ortamında (boş vialde) MA'ya ait pik alanı keskin ve belirgin iken, yağ ortamında MA'nın piki HE ve IS'ye ait piklerden çok daha düşük olduğu saptanmıştır. Bu durum, yağ ortamında bulunan MA'nın 3 faz SPME fiberi tarafından hava ortamı ile karşılaştırıldığında aynı düzeyde ekstrakte edilmediğini ortaya koymaktadır. MA'ya ait pikin hava ve yağ matriksinde benzer davranış göstermemesinin nedeni MA'nın oldukça reaktif ve polar bir bileşen olmasından kaynaklanmaktadır. Bu yüzden yapılan çalışmaların çoğunda öncelikle MA'nın stabil türevleri oluşturulmuştur. Daha sonra oluşan bu türevler GC ve HPLC gibi kromatografik teknikleri ile analiz edilmiştir. [Fujioka & Shibamoto \(2005\)](#), antioksidan aktivite ölçümü için geliştirmiş oldukları bir çalışmada MA tayininde türevlendirme yapmışlardır. Bunun için MA'yı N-metil hidrazin ile reaksiyona tabi tutmuşlardır. Oluşan 1-metilpirazol türevini SPME ile ekstrakte edip, GC ile MA miktarını saptamışlardır. [Fan \(2002\)](#), elma suyundaki MA miktarını belirlemek için MA'yı pentaflorofenil hidrazin ile türevlendirmiştir. Yine aynı şekilde [Shin \(2009\)](#), insan kanındaki MA miktarını belirlemek için 2,2,2-trifloroetilhidrazin ile MA'yı 50 °C'de 40 dk boyunca türevlendirmiştir.

SPME'nin ayçiçeği yağı matriksindeki performansı araştırılmadan önce ayçiçeği yağının HE ve MA içerip içermediği araştırılmıştır. Diğer bir deyişle ayçiçeği yağının içerisinde dışarıdan eklenen HE ve MA dışında bozulmadan dolayı HE ve MA oluşup oluşmadığı araştırılmıştır. Bunun için bir vialde 2 g yağ ve 500 ppb IS; diğer bir vialde 2 g yağ, 500 ppb IS, 1ppm HE ve 1 ppm MA ilave edilmiştir. 60 °C'de 40 dk boyunca ekstraksiyon yapıldıktan sonra Şekil 3'teki kromatogram elde edilmiştir.



Şekil 3. 60 °C ve 40 dk ekstraksiyon sonucu kontrol örneği ve dışarıdan HE, MA ve IS ilave edilmiş örneklere ait GC kromatogramı.

Şekil 3 incelendiğinde kontrol örneğinde HE ve MA'nın geliş sürelerinin olduğu yerde keskin ve belirgin herhangi bir pik tespit edilmemiştir. Bu da seçilen matrisin HE ve MA içermediğini göstermektedir. SPME ekstraksiyonu sırasında tespit edilecek maddenin miktarında artış olmaması gerekmektedir. Çünkü sıcaklığın ve sürenin etkisiyle aranan madde miktarında artış olursa bu durumda örneğin daha önce bozulduğu yani taze olmadığı anlamına gelir. Bu çalışmada uygulanan azami sıcaklık (60 °C) ve sürelerde (40 dk) HE ve MA bulgusuna rastlanmamıştır (Şekil 3).

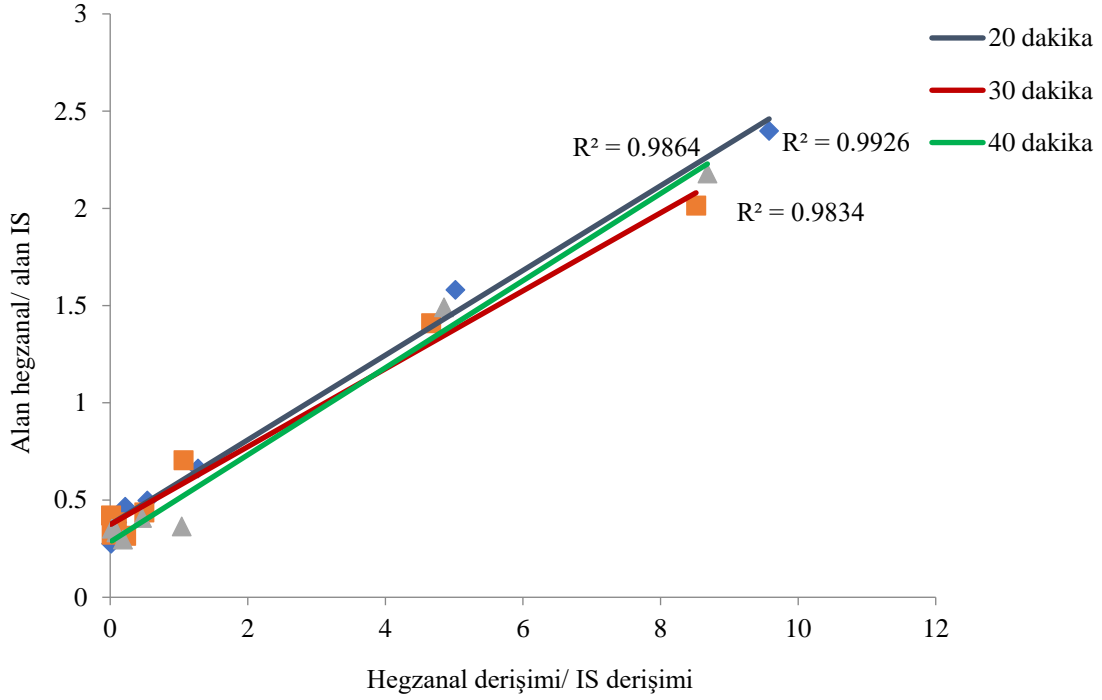
Sonraki aşamada ayçiçeği yağında çeşitli sıcaklık ve sürelerde SPME'nin performansı araştırılarak bu farklı süre ve sıcaklıklarda HE ve MA'nın IS ile olan ilişkilerini gösteren denklemler türetilmiştir. 40 °C'de 20, 30 ve 40 dk boyunca ekstraksiyon uygulandığında HE'nin IS ile olan ilişkisi, regresyon denklemleri ve korelasyon katsayıları Çizelge 1 ve Şekil 4'te verilmiştir. 40 °C'de 20, 30 ve 40 dk boyunca ekstraksiyon uygulandığında elde edilen korelasyon katsayıları sırasıyla 0.992, 0.983 ve 0.986 bulunmuştur. Çizelge 1'deki ve Şekil 4'teki  $R^2$  değerleri incelendiğinde 40°C için en uygun sürenin sırasıyla, 20, 40 ve 30 dk olduğu görülmektedir.

40 °C'de 20, 30 ve 40 dk boyunca ekstraksiyon uygulandığında MA'nın IS ile olan ilişkisini gösteren regresyon denklemleri ve  $R^2$  değerleri Çizelge 1 ve Şekil 5'te gösterilmiştir.

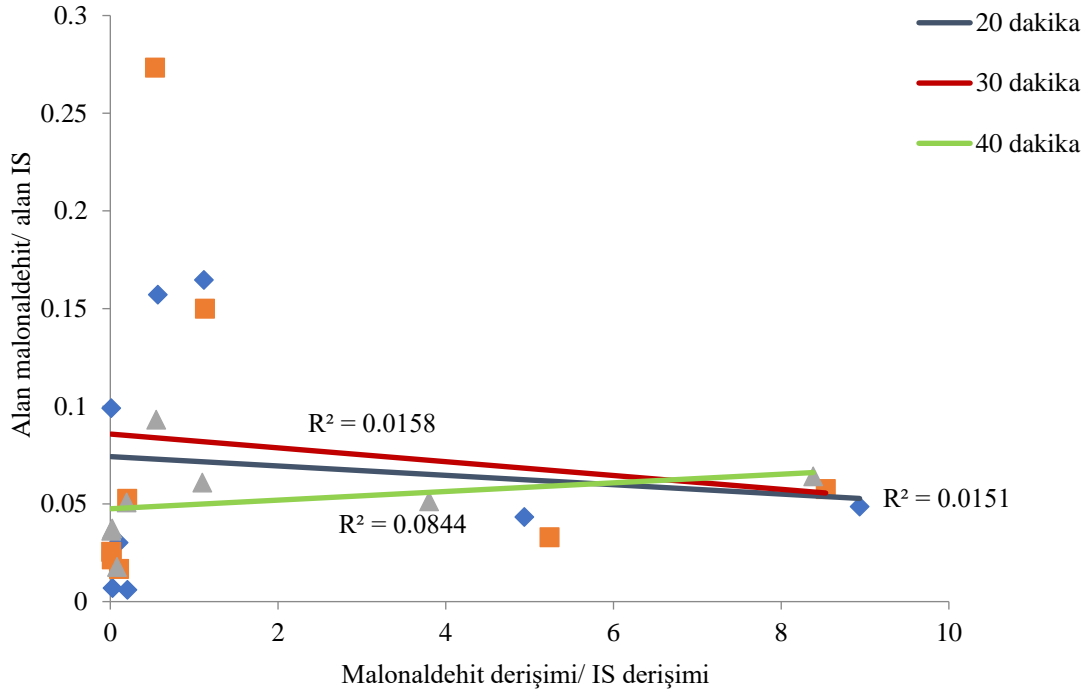
Çizelge 1. 40 °C'de farklı sürelerde ekstraksiyon uygulanmasıyla elde edilen regresyon denklemleri ve korelasyon katsayıları

Bileşen	Süre	Regresyon Denklemi	Korelasyon Katsayısı ( $R^2$ )
HE	20	$y = 0.217x + 0.373$	0.992
	30	$y = 0.200x + 0.373$	0.983
	40	$y = 0.224x + 0.284$	0.986
MA	20	$y = 0.200x + 0.0174$	0.015
	30	$y = 0.003x + 0.085$	0.015
	40	$y = 0.002x - 0.047$	0.084

HE: Hegzanal, MA: Malonaldehit, x: HE veya MA'nın derişimi/IS'nin derişimi; y: HE veya MA'nın alanı/IS'nin alanı



Şekil 4. Ayciçegi yağında 40 °C'de farklı sürelerde HE ile IS arasındaki derişim ve alan oranları ilişkisi.



Şekil 5. Ayciçegi yağında 40 °C'de farklı sürelerde MA ile IS arasındaki derişim ve alan oranları ilişkisi.

40 °C'de 20 dk boyunca ekstraksiyon uygulandığında elde edilen korelasyon katsayısı 0.015 olarak bulunmuştur. 30 dk boyunca ekstraksiyon uygulandığında elde edilen korelasyon katsayısı 0.015 olarak tespit edilirken; ekstraksiyon süresi 40 dk olduğunda korelasyon katsayısı 0.084 olarak saptanmıştır.  $R^2$  değerleri dikkate alındığında 40 °C'de üç farklı sürede de MA ve IS arasında doğrusal bir ilişki bulunamamıştır. Bunun nedeni MA'nın polaritesinin ve reaktivitesinin yüksek olmasından

kaynaklanmaktadır. MA'nın bu özelliğinden dolayı türevlendirilmesi gerekmektedir. Literatür bilgilerine bakıldığında yapılan çalışmaların çoğunda MA önce türevlerine dönüştürülmüş daha sonra SPME-GC uygulanarak tespit edilmiştir. [Umamo ve ark. \(1988\)](#), sığır yağı ve mısırözü yağındaki MA'yı tespit etmek için metilhidrazin kullanarak 1-metilpirazole türevlendirmişlerdir. Benzer bir çalışmada [Fujioka & Shibamoto \(2005\)](#), okside olmuş yağlarda MA'yı 1-metilpirazole dönüştürerek SPME-GC'de miktarını tespit etmişlerdir. [Ruan ve ark. \(2014\)](#), etteki MA miktarını tespit etmek için MA'yı pentaflorofenilhidrazin ile türevlendirmişlerdir.

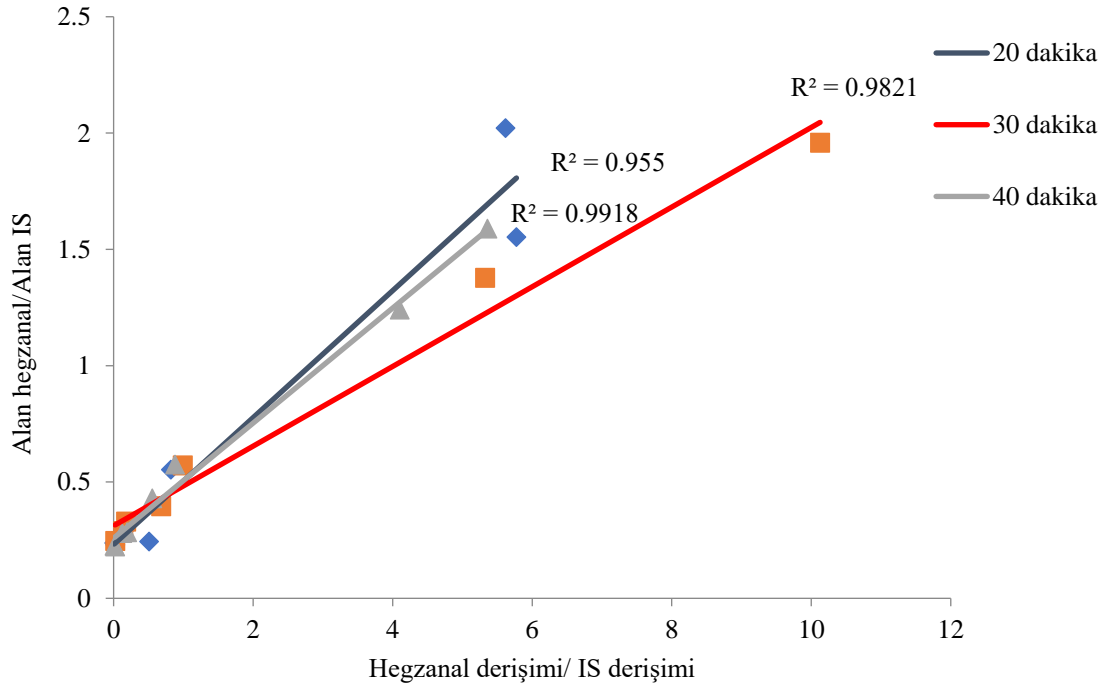
50 °C'de 20, 30 ve 40 dk boyunca ekstraksiyon uygulandığında HE ve IS arasındaki ilişkisini gösteren denklem ve korelasyon katsayıları Çizelge 2 ve Şekil 6'da verilmiştir.

Çizelge 2. 50 °C'de farklı sürelerde ekstraksiyon uygulanmasıyla elde edilen regresyon denklemleri ve korelasyon katsayıları

Bileşen	Süre	Regresyon Denklemi	Korelasyon Katsayısı (R <sup>2</sup> )
HE	20	$y = 0.272x + 0.231$	0.955
	30	$y = 0.171x + 0.311$	0.982
	40	$y = 0.247x + 0.258$	0.991
MA	20	$y = 0.005x + 0.028$	0.562
	30	$y = 0.005x + 0.048$	0.606
	40	$y = 0.005x + 0.063$	0.134

HE :Hegzanal, MA: Malonaldehit, x: HE veya MA'nın derişimi/IS'nin derişimi; y: HE veya MA'nın alanı/IS'nin alanı

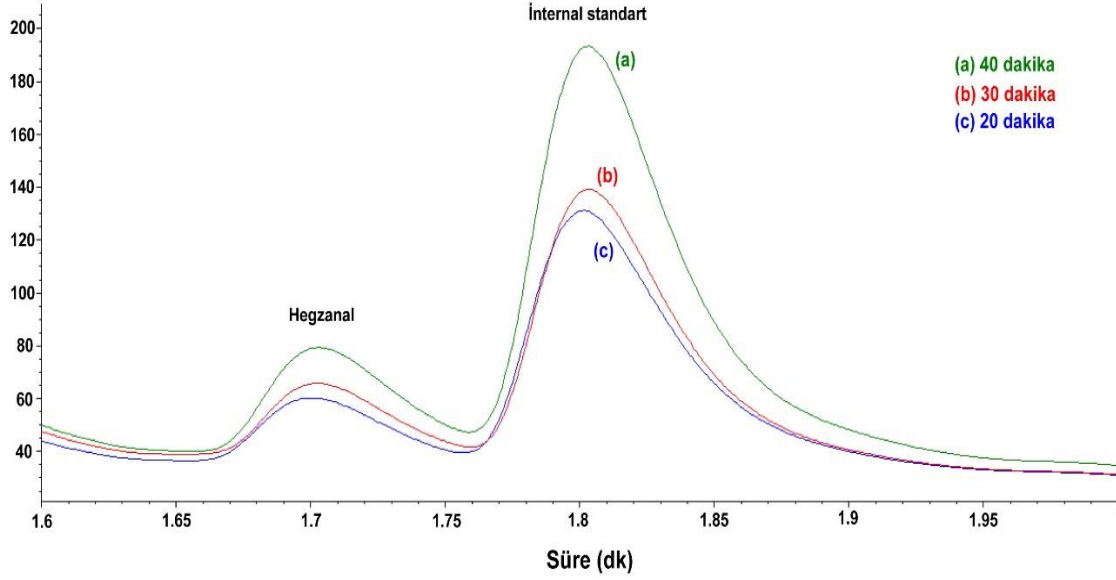
20 dk'lık bir ekstraksiyonla elde edilen R<sup>2</sup> değeri 0.955 olarak tespit edilmiştir. 30 dk boyunca ekstraksiyon uygulandığında elde edilen R<sup>2</sup> değeri 0.982 olarak bulunurken; ekstraksiyon süresi 40 dk olduğunda R<sup>2</sup> değeri 0.991 olarak saptanmıştır. R<sup>2</sup> değerleri incelendiğinde 50 °C için en uygun ekstraksiyon süresi 40 dk olduğu görülmektedir. Sürenin artmasına bağlı olarak R<sup>2</sup> değerlerinde artış gözlemlenmiştir.



Şekil 6. Ayçiçeği yağında 50 °C'de farklı sürelerde HE ile IS arasındaki derişim ve alan oranları ilişkisi.

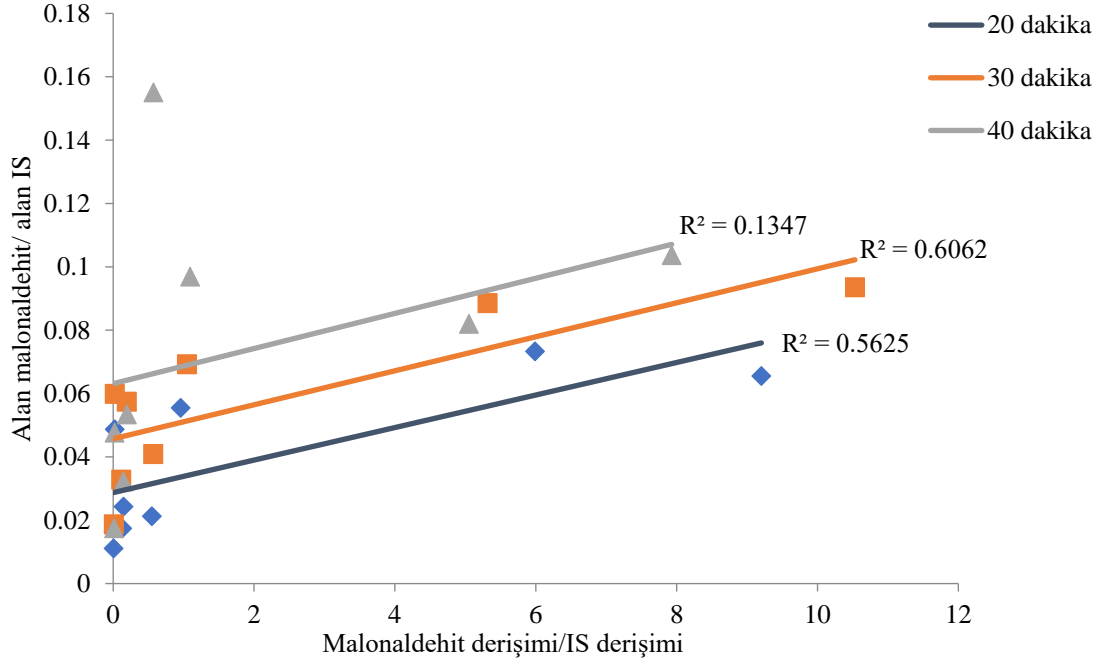


100 ppb HE ve 500 ppb IS ilave edilmiş ayçiçeği yağına 50 °C’de 20, 30 ve 40 dk boyunca yapılan ekstraksiyon sonucunda GC’den elde edilen kromatogram Şekil 7.’de gösterilmektedir. 50 °C’de yapılan ekstraksiyonda sürenin artmasına bağlı olarak pik alanlarında artış gözlemlenmiştir. R<sup>2</sup> değerleri göz önünde bulundurulduğunda bu sıcaklık için en uygun süre 40 dk olduğu görülmektedir.



Şekil 7. 100 ppb HE ilave edilmiş ayçiçeği yağında 50° C’de 20, 30 ve 40 dk ekstraksiyon sonrası meydana gelen GC kromatogramı.

50 °C’de 20, 30 ve 40 dk boyunca ekstraksiyon uygulandığında MA’nın IS ile olan ilişkini gösteren regresyon denklemi ve korelasyon katsayıları Çizelge 2 ve Şekil 8’de gösterilmiştir. 20 dk boyunca ekstraksiyon uygulandığında elde edilen R<sup>2</sup> değeri 0.562 iken 30 dk ekstraksiyon uygulandığında R<sup>2</sup> değeri 0.606 bulunmuştur. Son olarak 40 dk boyunca ekstraksiyon uygulandığında elde edilen R<sup>2</sup> değeri 0.134 olarak tespit edilmiştir. R<sup>2</sup> değerlerine bakıldığında 50 °C’de en yüksek korelasyon 30 dk’da elde edilmiştir. Ancak bulunan bu değer MA ve IS arasındaki doğrusal ilişkiyi göstermek için yeterli değildir. Başka bir deyimle MA ile IS arasındaki doğrusal ilişkinin düşük düzeyde olması MA’nın nicel analizinde doğru sonuç vermemesine yol açmaktadır.



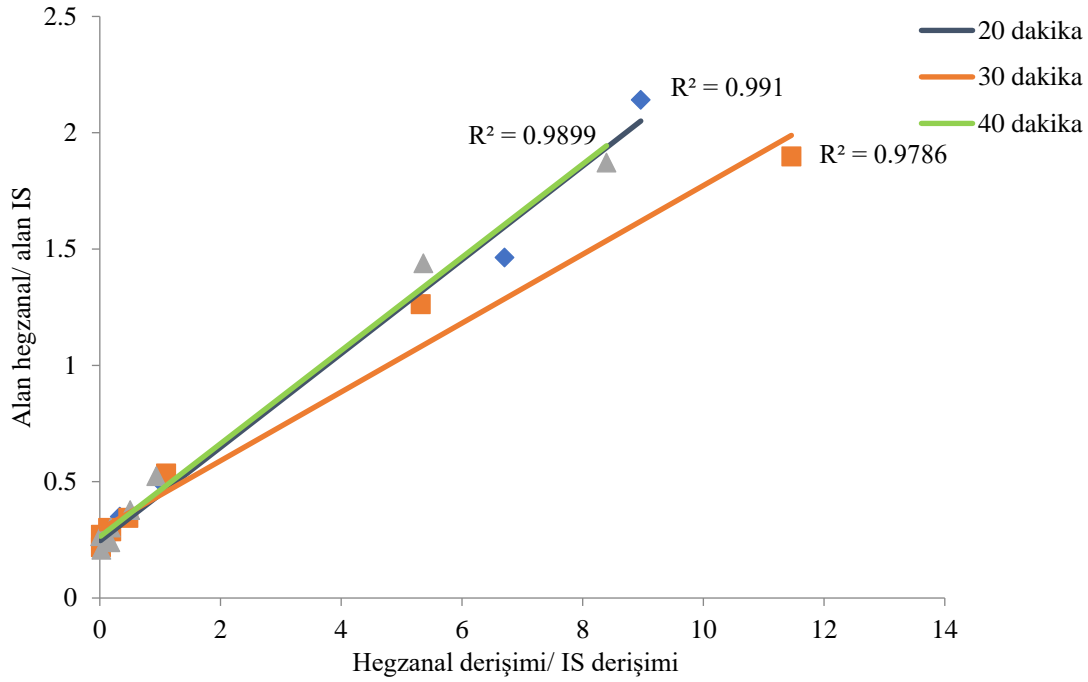
Şekil 8. Ayçiçeği yağında 50 °C’de farklı sürelerde MA ile IS arasındaki derişim ve alan oranları ilişkisi.

60 °C’de 20, 30 ve 40 dk boyunca ekstraksiyon uygulandıında HE ve IS arasındaki ilişkini gösteren denklem ve korelasyon katsayıları Çizelge 3 ve Şekil 9’da verilmiştir. 20 dk’da ekstraksiyon sonucu elde edilen korelasyon katsayısı 0.991 olarak bulunurken; 30 dk boyunca ekstraksiyon uygulandıında elde edilen korelasyon katsayısı 0.978 olarak tespit edilmiştir. Ekstraksiyon süresi 40 dk olduında ise korelasyon katsayısı 0.989 olarak saptanmıştır. R<sup>2</sup> değerleri incelendiğinde 60 °C için en uygun ekstraksiyon süresinin 20 dk olduğı görülmektedir. Nzekoue ve ark. (2019) peynirde depolama süresince oluşun hegzanalı tespit etmek yapmış oldukları çalışmada ekstraksiyon koşullarını 60 °C ve 20 dk olarak belirlemişlerdir.

Çizelge 3. 60 °C’de farklı sürelerde ekstraksiyon uygulanmasıyla elde edilen regresyon denklemleri ve korelasyon katsayıları

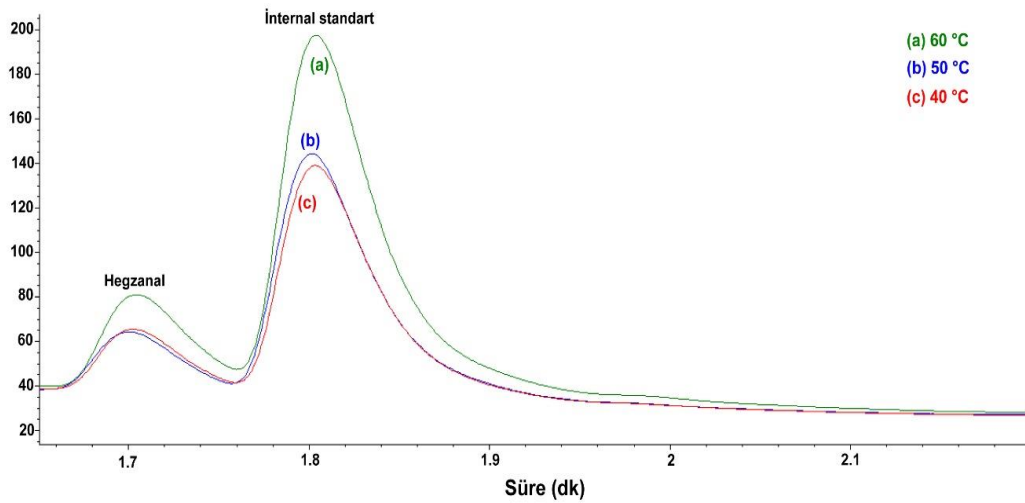
Bileşen	Süre	Regresyon Denklemi	Korelasyon Katsayısı (R <sup>2</sup> )
HE	20	y = 0.201x + 0.244	0.991
	30	y = 0.147x + 0.294	0.978
	40	y = 0.200x + 0.263	0.989
MA	20	y = 0.007x + 0.045	0.406
	30	y = 0.007x + 0.118	0.094
	40	y = 0.012x + 0.116	0.118

HE :Hegzanal, MA: Malonaldehit, x: HE veya MA’nın derişimi/IS’nin derişimi; y: HE veya MA’nın alanı/IS’nin alanı



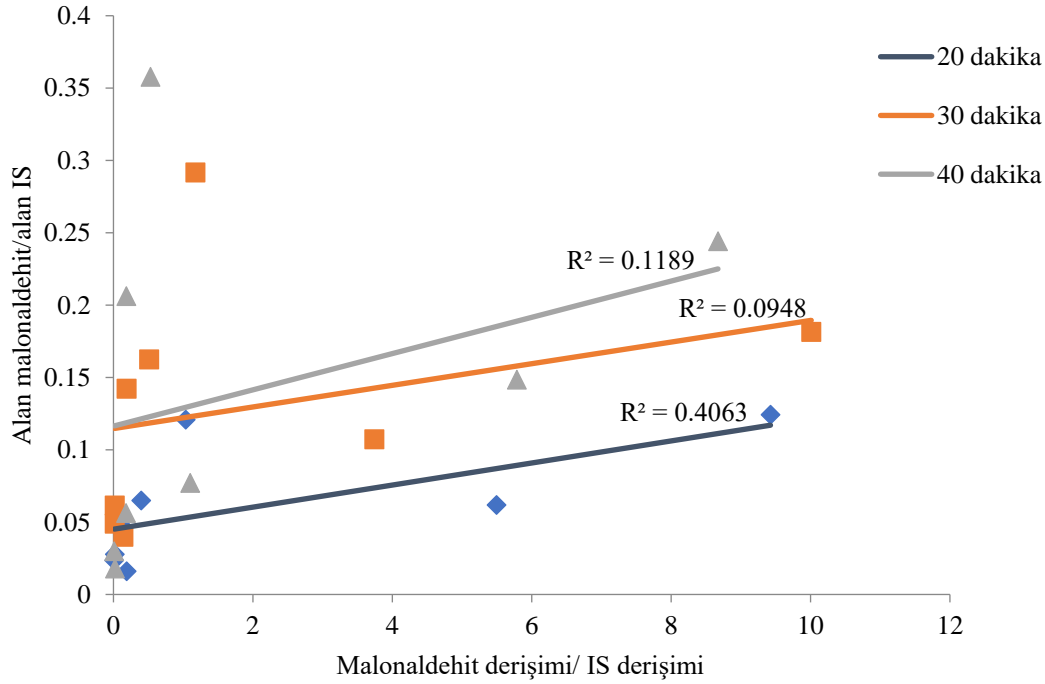
Şekil 9. Ayçiçeği yağında 60 °C'de farklı sürelerde HE ile IS arasındaki derişim ve alan oranları ilişkisi.

Ayçiçeği yağına 100 ppb HE ve 500 ppb IS ilave edilerek 30 dk boyunca 40, 50 ve 60 °C'de yapılan ekstraksiyon sonucu elde edilen kromatogram Şekil 10'da gösterilmiştir. Sıcaklık 40 ve 50 °C olduğunda piklerin özellikleri benzer davranış gösterirken, 60 °C'de daha keskin ve belirgin bir pik elde edilmiştir. GC'den elde edilen piklerin nicel analizde kullanılabilmesi için mümkün olduğunca keskin ve belirgin olması gerekmektedir. Keskin piklerin elde edilmesi ile bileşenler arasındaki ilişkiyi tespit etmek mümkündür. Ayçiçeği yağında kullanılan sıcaklık değerleri göz önünde bulundurulduğunda uygulanması gereken en uygun sıcaklık 60 °C olduğu tespit edilmiştir. 60 °C'de uygulanan süreler bakımından en uygun süre 20 dk ( $R^2 = 0.991$ ) olduğu saptanmıştır. Iglesias ve ark. (2007), balık yağı ile zenginleştirilmiş süt ve mayonezlerdeki oksidasyon sonucu oluşan bileşenleri tespit etmek için geliştirmiş oldukları yöntemde 60 °C'de 30 dk boyunca ekstraksiyon işlemi uygulamışlardır.



Şekil 10. 100 ppb HE ilave edilmiş ayçiçeği yağında 30 dk'da 40, 50 ve 60 °C'de ekstraksiyon sonrası elde edilen kromatogram.

60 °C’de 20, 30 ve 40 dk boyunca ekstraksiyon uygulandığında MA ve IS arasındaki ilişkiyi gösteren denklem ve korelasyon katsayıları Çizelge 3 ve Şekil 11’de gösterilmektedir.



Şekil 11. Ayrıççeği yağında 60 °C’de farklı sürelerde MA ile IS arasındaki derişim ve alan oranları ilişkisi.

20 dk ekstraksiyon uygulandığında elde edilen  $R^2$  değeri 0.045 olarak tespit edilirken 30 dk ekstraksiyon uygulandığında  $R^2$  değeri 0.094 ve 40 dk ekstraksiyon sonucu elde edilen  $R^2$  değeri 0.118 olarak saptanmıştır.  $R^2$  değerleri dikkate alındığında 60 °C’de en yüksek korelasyon 20 dk’lık ekstraksiyonda bulunmuştur. Ancak bulunan bu değer MA ve IS arasındaki doğrusal ilişkiyi göstermek için yeterli değildir.

#### 4. Sonuç

Yapılan bu çalışmada HE ve IS arasında doğrusal bir ilişki saptanırken, MA ve IS arasındaki ilişkinin doğrusallık düzeyi düşük bulunmuştur. MA ve IS arasındaki en yüksek  $R^2$  değeri ( $R^2 = 0.606$ ) 50 °C’de 30 dk’lık ekstraksiyonda görülmüştür. Ancak bu değer MA ve IS arasındaki doğrusal ilişkiyi açıklamak için yeterli değildir. MA’nın düşük korelasyon göstermesinin nedeni oldukça reaktif ve polar bir bileşen olmasından kaynaklanmaktadır. HE ve IS arasında yakın bir ilişki saptanmıştır ( $0.955 < R^2 < 0.992$ ). 60 °C sıcaklık uygulandığında oluşan pikler diğer sıcaklıklara göre daha keskin ve belirgin olduğu görülmüştür. Bundan dolayı en uygun ekstraksiyon sıcaklığı 60 °C ve en uygun süre 20 dk ( $R^2 = 0.991$ ) olarak saptanmıştır. Ekstraksiyon süre ve sıcaklığı prosesin etkinliğini belirleyen temel parametrelerdir.

Sonuç olarak, 3 fazlı SPME’nin doğrudan ayrıççeği yağından MA’nın ekstraksiyonu ve GC analizi için uygun olmadığı tespit edilmiştir. 3 faz SPME’nin HE’nin ekstraksiyonu ve nicel analizi için uygulanabileceği ve  $R^2$  değerine bakıldığında HE’nin ayrıççeği yağında tespit edilebileceği en uygun koşulun 60 °C’de 20 dk ( $R^2 = 0.991$ ) olduğu saptanmıştır. Bu verilerin doğrultusunda, uygulanan parametrelerle (süre ve sıcaklık) hazırlanan kalibrasyon eğrilerinden yararlanılarak elde edilen regresyon denklemlerinin HE miktarının hesaplanmasında kullanılabileceği düşünülmektedir.

## Kaynakça

- Bak, K. H., Rankin, S. A., & Richards, M. P. (2020). Hexanal as a marker of oxidation flavour in sliced and uncured deli turkey with and without phosphates using rosemary extracts. *International Journal of Food Science and Technology*, 55(9), 3104-3110. doi:10.1111/ijfs.14574
- Brunton, N. P., Cronin, D. A., Monahan, F. J., & Durcan, R. (2000). A comparison of solid-phase microextraction (SPME) fibres for measurement of hexanal and pentanal in cooked turkey. *Food Chemistry*, 68(3), 399-345. doi:10.1016/S0308-8146(99)00203-4
- Camiletti, O. F., Bergesse, A. E., Aleman, R., Riveros, C. G., & Grosso, N. R. (2023). Application of chickpea-based edible coating with chickpea husk polyphenols on the preservation of sunflower seeds. *Journal of Food Science*, 88(4), 1-16. doi:10.1111/1750-3841.16489
- Choe, E., & Min, D. B. (2006). Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 5(4), 169-186. doi:10.1111/j.1541-4337.2006.00009.x
- Dadalı, C., & Elmacı, Y. (2019). Optimization of Headspace-Solid Phase Microextraction (HSSPME) technique for the analysis of volatile compounds of margarine. *Journal of Food Science and Technology*, 56, 4834-4843. doi:10.1007/s13197-019-03945-w
- Fan, X. (2002). Measurement of malonaldehyde in apple juice using GC-MS and a comparison to the thiobarbituric acid assay. *Food Chemistry*, 77(3), 353-359. doi:10.1016/S0308-8146(02)00110-3
- Fujioka, K., & Shibamoto, T. (2005). Improved malonaldehyde assay using headspace solid-phase microextraction and its application to measurement of the antioxidant activity of phytochemicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4708-4713. doi:10.1021/jf050297q
- Iglesias, J., Lois, S., & Medina, I. (2007). Development of a solid-phase microextraction method for determination of volatile oxidation compounds in fish oil emulsions. *Journal of Chromatography A*, 1163, 277-287. doi:10.1016/j.chroma.2007.06.036
- Jalili, V., Barkhordari, A., & Ghiasvand, A. (2020). A comprehensive look at solid-phase microextraction technique: A review of reviews. *Microchemical Journal*, 152, 104319. doi:10.1016/j.microc.2019.104319
- Javidipour, I., & Qian, M. C. (2008). Volatile component change in whey protein concentrate during storage investigated by headspace solid-phase microextraction gas chromatography. *Dairy Science and Technology*, 88, 95-104. doi:10.1051/dst:2007010
- Kayaalp, G. T., & Çankaya, S. (2008). *İstatistik 5*. baskı. Adana: Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Yay. No: 258.
- Ma, C., Ji, J., Tan, C., Chen, D., Luo, F., Wang, Y., & Chen, X. (2014). Headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography for the analysis of aldehydes in edible oils. *Talanta*, 120, 94-99. doi:10.1016/j.talanta.2013.11.021
- Maher, P. G., Roos, Y. H., Kilcawley, K. N., Auty, M. A. E., & Fenelon, M. A. (2015). Levels of pentanal and hexanal in spray dried nanoemulsions. *LWT-Food Science and Technology*, 63(2), 1069-1075. doi:10.1016/j.lwt.2015.04.044
- Mariutti, L. R. B., Nogueira, G. C., & Bragagnolo, N. (2009). Solid phase microextraction-gas chromatography for evaluation of secondary lipid oxidation product during long-term storage. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 20(10), 1849-1855. doi:10.1590/S0103-50532009001000012
- Nzekoue, F. K., Caprioli, G., Fiorini, D., Torregiani, E., Vittori, S., & Sagratini, G. (2019). HS-SPME-GC-MS technique for FFA and hexanal analysis in different cheese packaging in the course of long-term storage. *Food Research International*, 121, 730-737. doi:10.1016/j.foodres.2018.12.048
- Panseri, S., Soncin, S., Chiesa, L. M., & Biondi, P. A. (2011). A headspace solid-phase microextraction gas-chromatographic mass-spectrometric method (HS-SPME-GC/MS) to quantify hexanal in butter during storage as marker of lipid oxidation. *Food Chemistry*, 127(2), 886-889. doi:10.1016/j.foodchem.2010.12.150
- Pawliszyn, J. (2012). Theory of Solid Phase Microextraction. In J. Pawliszyn (Ed.), *Handbook of Solid Phase Microextraction* (pp. 13-59). Amsterdam, Holland: Elsevier Press. doi:10.1093/chromsci/38.7.270

- Pignoli, G., Bou, R., Rodriguez-Estrada, M. T., & Decker, E. A. (2009). Suitability of saturated aldehydes as lipid oxidation markers in washed turkey meat. *Meat Science*, 83(3), 412-416. doi:10.1016/j.meatsci.2009.06.019
- Prosen, H., & Kralj, L.Z. (1999). Solid-phase microextraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 18(4), 272-282. doi:10.1016/S0165-9936(98)00109-5
- Ruan, E. D., Aalhus, J., & Juárez, M. (2014). A rapid, sensitive and solvent-less method for determination of malonaldehyde in meat by stir bar sorptive extraction coupled thermal desorption in situ derivatization. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 28(24), 2723-2728. doi:10.1002/rcm.7058
- Shin, H. S. (2009). Determination of malondialdehyde in human blood by headspace-solid phase micro-extraction gas chromatography-mass spectrometry after derivatization with 2,2,2-trifluoroethylhydrazine. *Journal of Chromatography B*, 77(29), 3707-3711. doi:10.1016/j.jchromb.2009.09.022
- Shin, H. S., & Jung, D. G. (2009). Sensitive analysis of malondialdehyde in human urine by derivatization with pentafluorophenylhydrazine then headspace GC-MS. *Chromatographia*, 70, 899-903. doi:10.1365/s10337-009-1235-4
- Spietelun, A., Kloskowski, A., Chrzanowski, W., & Namiesnik, J. (2013). Understanding solid-phase microextraction: Key factors influencing the extraction process and trends in improving the technique. *Chemical Reviews*, 113, 1667-1685. doi:10.1021/cr300148j
- Umano, K., Dennis, K. J., & Shibamoto, T. (1988). Analysis of free malondialdehyde in photo irradiated corn oil and beef fat via a pyrazole derivative. *Lipids*, 23, 811-814. doi:10.1007/BF02536226
- Vandemoortele, A., Heynderickx, P. M., Leloup, L., & Meulenaer, B. D. (2021). Kinetic modeling of malondialdehyde reactivity in oil to simulate actual malondialdehyde formation upon lipid oxidation. *Food Research International*, 140, 110063. doi:10.1016/j.foodres.2020.110063
- Vas, G., & Vékely, K. (2004). Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *Journal of Mass Spectrometry*, 39(3), 233-254. doi:10.1002/jms.606
- Xu, Y. H., Chen, X. W., Li, J., & Bi, Y. (2023). Approach to evaluate the sensory quality deterioration of chicken seasoning using characteristic oxidation indicators. *Food Chemistry: X*, 17, 100564. doi:10.1016/j.fochx.2023.100564