

## YEMEKLİK YAĞLARDA YAĞ ASİTLERİ ESTERLEŞTİRME\* YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

### COMPARISON OF FATTY ACID ESTERIFICATION METHODS IN EDIBLE OILS

Leman ÖZTEKİN<sup>1</sup>, Fikri BAŞOĞLU<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Gıda Teknolojisi Araştırma Enstitüsü Müdürü, BURSA

<sup>2</sup>Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, BURSA

**ÖZET:** Yemeklik yağlarda, yağ asitleri esterleştirme yöntemlerinin karşılaştırılması amacıyla, BF<sub>3</sub>-metanol (Bor Triflorür Metanol), ampulde direkt metilasyon, TMSH (trimethylsulphonium hydroxide) ve Na-metoksit (Sodyum Metoksit, CH<sub>3</sub>NaO) yöntemi olmak üzere dört farklı esterleştirme yöntemi ele alınmıştır. Zeytinyağı, ayçiçekyağı, margarin örnekleri ve saf yağ asitleri analitik standart karışımlarına bu yöntemler uygulanmıştır. Zeytinyağı, ayçiçekyağı ve margarin örneklerinde analiz sonucu bulunan palmitik, stearik, oleik ve linoleik asit miktarları, istatistiksel yöntemlerden tesadüf parsellerinde iki faktörlü deneme desenine göre her uygulamada beş tekerrürlü olarak analiz edilmiştir. Yağ asitleri analitik standart karışımları ile yapılan çalışmada palmitik, stearik, oleik ve linoleik asit tesadüf parselleri deneme desenine göre her bir uygulamada üç tekerrürlü olarak analiz edilmiştir (DÜZGÜNEŞ, 1975, TURAN 1991).

Varyans analizi sonucunda önemli bulunanalara Duncan testi (p=0.05) uygulanarak gruplandırılmalar yapılmıştır.

**ABSTRACT:** In edible oil, in order to compare of fatty acid esterification methods, BF<sub>3</sub>-methanol (Bor Triflorür Methanol), sealed tube direct methylation, transesterification with TMSH (trimethylsulphoniumhydroxide) and Na-methoxide (Natrium Methoxide, CH<sub>3</sub>NaO) methods were taken up. These methods were applied to olive oil, sunflower oil, margarine samples and mixed pure fatty acid analytic standards. Palmitic, stearic, oleic and linoleic acid amount which were found at the end of analysis in olive oil, sunflower oil and margarine samples were analysed statistically, according to two factorial experimental design in randomized plots and each treatment consist of five replicates. In the study of mixed pure fatty acid analytic standards, palmitic, stearic, oleic and linoleic acid were analyzed statistically according to experimental design in randomized plots and each treatment consist of three replicates (DÜZGÜNEŞ, 1975, TURAN 1991).

The values that were found important to variance analysis were grouped according to Duncan test (0=05).

### GİRİŞ ve KAYNAK ARAŞTIRMASI

Yağlar, hayvansal ve bitkisel kaynaklı olmak üzere ikiye ayrılır (YAZICIOĞLU ve KARAALİ 1983).

Yağlar, yüksek moleküllü yağ asitlerinin, üç değerli bir alkol olan gliserinle meydana getirdikleri esterlerdir, yani trigliseritlerdir (DEMİRCİ ve ALPASLAN 1993).

Doğada 40'dan fazla yağ asiti vardır (AKTAŞ 1987). Yağ asitlerinin kantitatif analizi için, yağ örneğinin sabunlaştırılarak yağın trigliseritler dışındaki ve sabunlaşmayan maddelerden oluşan kısmı ayırt edilir. Sabunlaşan kısımdan yağ asitleri ayrıştırılır. Yağ asitleri analiz için metilester veya etilester şekline çevrilir. Fiziksel veya kimyasal özelliklerinin iyi bilinmesi ve kaynama noktasının düşük olması nedeniyle metilester şekli tercih edilir ve gaz kromatografisi ile analizleri yapılır (METİN 1979).

Yağ asitleri metil esterlerinin hazırlanmasında çok sayıda esterleştirme metodu vardır. Fakat bu metodlardan hangisinin en hassas sonuçları verdiği, en iyi sonuca ulaşırken harcanan zamanın ve maliyetin ne olduğu bilinmemektedir. Bu çalışmada dört esterleştirme metodu kullanılarak bunlar arasında hangisinin en kolay uygulanabilen, en kısa sürede, en az maliyetle, en hassas sonucu verdiğini bulmak amaçlanmıştır.

SONNTAG (1979), 1922-1961 yılları arasında üretilen ayçiçekyağının yağ asitleri bileşiminin ve değişim sınırının şöyle olduğunu belirtmiştir: Palmitik asit: %3.00-6.00, stearik asit: %1.00-3.00, araşidik asit: %0.60-4.00, behenik asit: % iz-0.80, lignoserik asit: %iz-0.40, oleik asit: %14.00-43.00, linoleik asit: %44.00-75.00.

Codex standardında, zeytinyağının yağ asitleri bileşimleri şu şekilde verilmektedir: Oleik asit: %56.00-83.00, palmitik asit: %7.50-20.00, linoleik asit: %3.50-20.00, stearik asit: %0.50-3.50, palmitoleik asit: %0.30-3.50, linolenik asit: %0.00-1.50, miristik asit: %0.00-0.05, araşidik asit, behenik asit, godeleik asit, lignoserik asit çok düşük miktarlarda; erusik ve lorik asit de iz miktarlarda bulunmaktadır (ERSOY 1985).

\* Bu çalışma U.Ü. Gıda Mühendisliği Bölümünde tamamlanan Leman ÖZTEKİN'in Yüksek Lisans tezinden hazırlanmıştır. Tarım ve Köyşeri Bakanlığı tarafından TAGEM/GY96/07/01/005 numaralı proje ile mali destek sağlanmıştır.

Ankara piyasasından toplanan 17 adet değişik margarinin yağ asitleri kompozisyonları incelendiğinde yağ asitleri dağılımlarının şu sınırlar arasında olduğu görülmüştür: kaprilik asit: %0.00-2.37, kaprik asit: %0.00-0.32, laurik asit: %0.003-3.99, miristik asit: %0.00-1.58, palmitik asit: %12.28-31.04, palmitoleik asit: %0.00-0.44, stearik asit: %4.65-10.33, oleik asit (trans): %0.00-34.52, oleik asit (Cis) %24.13-37.34, linoleik asit: %7.37-35.15, linolenik asit: %0.00-2.10, araşidik asit: %0.00-1.52, toplam doymuş: %18.72-40.48, toplam doymamış: %59.97-79.94'dir (KAYAHAN ve TEKİN 1994). Margarinlerin birleşimindeki yağ asitleri üretimde kullanılan hammaddenin cinsine ve bünyesindeki yağ asitlerinin durumuna göre farklılıklar gösterir.

Uluslararası Standardizasyon Örgütü (ISO) ve Uluslararası Teorik ve Uygulamalı Kimya Birliği'ni (IUPAC) standart metilasyon işlemleri aynıdır ve katalizör olarak metoksitten ziyade potasyum hidroksit kullanılır. Bor triflorür ( $BF_3$ ) kullanımını içermeyen alternatif metotlar olarak verilen üç değişken vardır. İlk değişken 2'den daha az asit değerli nötral hayvansal yağlar içindir ve 0.01 N olan bir baz konsantrasyonu kullanılır. İkinci değişken asit hayvansal ve bitkisel yağlar içindir ve önemli farkı serbest yağ asitleri tarafından çok fazla katalizör tüketilebileceği için daha fazla (yaklaşık 0.5 N) baz kullanılmasıdır. Her iki metotta da geri soğutucu vardır ve oluşan esterler heptan içine ekstrakte edilir. Üçüncü değişken kısa zincirli yağ asitleri içeren tereyağı gibi hayvansal yağlar içindir ve oda sıcaklığında yapılır (BONNON ve ark. 1982a).

GLC ile hayvansal ve bitkisel yağların kompozisyonlarının belirlenmesi genellikle BOR triflorür metanol ( $BF_3$ -metanol) metoduyla yapılır. Hızlı bir metot olan  $BF_3$ -metanol metodu 1961 yılında tanıtılmasına rağmen bir metilasyon metodu olarak ilk defa 1966 yılında yazılmıştır. 1969 yılında American Oil Chemist Society (AOCS) tarafından resmi metot olarak onaylanmıştır. Buna karşılık baz katalizörlüğündeki metanolizis olarak isimlendirilen metotlar, GLC analizlerinde 1956'nın başlarından beri kullanılmalarına rağmen 1978 ve 1979'un sonlarında resmi metot olmuştur. Bu metodun resmileşmesinin yavaş olmasının sebebi pek çok araştırmacının tepkisine yol açan reaksiyon şartlarının çok esnek olmasındandır. Bu metotlarda solventler petrol eterinde yaklaşık %5 metanolden %100 metanole doğru değişen polaritede, baz konsantrasyonu 0.002 N'den 1 N'e, reaksiyon sıcaklığı oda sıcaklığından  $90^\circ C$ 'ta, reaksiyon zamanı yaklaşık 30 saniyeden, 48 saate değişmektedir. 1980-81 yağ asiti analizleri için AOCS Smalley GLC kontrol programlarından alınan 472 analiz örneğine ait bilgiler incelendiğinde şu sonuçlar elde edilmiştir:  $BF_3$ -metanol ile metilasyon %57.00, Sodyum metoksit ( $CH_3NaO$ ) ile metilasyon %32.00, diğer solventler ile metilasyon yöntemleri %11.00 oranında kullanılmıştır. Yani ester hazırlanmasında baz katalizlendirme metilasyon yöntemini kullanma oranı 1/3'tür. Yapılan bir çalışmada nötral hayvansal ve bitkisel yağların metoksit katalizörlüğündeki hızlı metanolizisi için literatürlerdeki pekçok metodun en iyi yönleriyle birlikte, uygun teorik düşünceleri kullanılıp halen tanımlanmış uluslararası işlemlerden daha hızlı ve basit olan bir metot geliştirilmiştir. Hindistan cevizi yağının karmaşık yapısına benzeyen trigliserit primer standartında mükemmel kantitatif sonuçlar elde edilmiş ve soya fasulyesi örneklerinden elde edilen sonuçların,  $BF_3$ -metanol ile metilasyondan elde edilenlerle aynı olduğu görülmüştür. Tanımlanan şartlar altında, reaksiyonun yaklaşık 30 sn geri soğutucu altındaki geri akışından sonra tamam olduğu kanıtlanmıştır. Bu metot uluslararası prosedürde var olan metotlardan daha hızlı ve basittir ve ester solüsyonu 2 dakikada kromatografa enjeksiyon için hazır olur. Hayvansal ve bitkisel yağ sanayiinde rutin kullanım için özellikle uygundur. Metot, metoksit kullanılan herhangi bir işlemde muhakkak bulunması gerektiğine inanılan bir sulu ekstraksiyon aşamasını içermektedir (BANNON ve ark. 1982a).

$BF_3$ 'ün zehirli olması nedeniyle metanol ve  $BF_3$ 'den metanollü  $-BF_3$  çözeltisinin laboratuvarında hazırlanması tavsiye edilmez (ANONYMOUS 1985a). Genellikle mukoz membranlar ve respiratorik sistem için son derece toksiktir. Toksik etkiler florin ve borun reaksiyona girmesinden meydana gelir (KYRIAKIDIS ve DIONYSOPOULUS 1983).

Yağ asiti bileşimlerini değerlendirmek için bitkisel yağlar genellikle Na-metoksit kullanarak baz katalize transesterleştirme ile veya asit katalize esterleştirme tarafından takip edilen sabunlaştırma işlemi ile yağ asiti metil esterlerine çevrilir. Trimetil (m-triflorotolil) amonyum hidroksit (TMTFTAH) ya da tetrametilamonyum hidroksit (TMAH) gibi dördü amonyum hidroksitler son zamanlarda trigliseritler için transesterleştirme katalistleri olarak kullanılmıştır. Trigliseritlere ilaveten örnekte mevcut olabilen serbest yağ asitleri, daha sonra pirolitik (pyrolysis: sıcak tesiriyle erime) olarak yerini tutan metil esterlere alkile olan dördü amonyum tuzlarına çevrilir. Trimetilsülfonyum hidroksitin (TMSH) daha da güçlü bir pirolitik alkilasyon reaktifi olduğu söylenmiştir. TMSH

metodunun avantajları: oda sıcaklığında transesterleştirme, ekstraksiyon gibi ilave işlemlerin olmaması ve düşük enjeksiyon blok sıcaklığıdır (BUTTE 1983). TMSH'nin düzgün temel çizgi (baseline) ve temiz bir kromatogram verdiği, yayınlanmış eserlerden açıkça anlaşılmaktadır (HAMDY ve CHRISTIE 1993).

ÇOLAKOĞLU'na (1969) göre yüksek asitli yağların (asit değeri > 2) metil esterlerinin hazırlanmasında ampulde direkt metilasyon yöntemi iyi sonuç vermiştir.

CRASKE (1993) tarafından bildirildiğine göre, GLC'nin düşük ağırlıklı yağ asitlerinin ayrılmasında teknik olarak kullanılmaya başlamasından hemen sonra Cropper ve Heywood bunun daha uzun zincirli yağ asiti metil esterlerine uygulanabileceğini göstermiştir. O zamandan bugüne; yağ asitlerinin ve lipid esterlerinin metil esterlere çevirilmesiyle ilgili pek çok yayın yapılmıştır. Metilasyon üzerine bu kadar çalışma olmasına rağmen bu yayınlanmış metodların pek çok faydaları ve dezavantajları konusunda deneyimli analistler arasında bile pek çok fikir ayrılığı var olduğu belirtilmiştir.

## MATERYAL ve YÖNTEM

### Materyal

Araştırmada kullanılan ayçiçekyağı A Fabrikası'ndan (Teneke kutu içerisinde 5 kg.'lık bir ambalaj), zeytinyağı B Fabrikası'ndan (Teneke kutu içerisinde 1 kg.'lık bir ambalaj), yemeklik margarin C Fabrikası'ndan (Teneke kutu içerisinde 5 kg.'lık bir ambalaj temin edilmiştir. Palmitik, stearik, oleik ve linoleik asit anhidrit analitik standartları Sigma firmasından, yağ asiti metilester karışım standardı (YAME) Alltech firmasından, kullanılan TMSH,  $\text{CH}_3\text{NaO}$ ,  $\text{BF}_3$ -metanol kompleksi Merck firmasından sağlanmıştır. Uygulanan yöntemlerin hepsinde kromatografik saflıktaki maddeler kullanılmıştır.

### Yöntemler

#### $\text{BF}_3$ -Metanol (Bor triflorür metanol) Yöntemi

Yaklaşık 350 mg yağ örneği 50 ml'lik yuvarlak dipli balona tartılmış, üzerine 6 ml 0.5N sodyum hidroksit (NaOH) (2 g. NaOH tartılarak metanolla 100 ml.'ye tamamlanır) çözeltisi ve birkaç kaynama taşı konulmuştur.

Geri soğutucu altında yağ damlacıkları kayboluncaya kadar 10 dakika kaynatılmıştır. Sabunlaşma işlemi tamamlandıktan sonra 7 ml. metanoldeki  $\text{BF}_3$  çözeltisi pipet ile geri soğutucunun tepesinden kaynayan sıvıya ilave edilmiştir.

Eğer örneğin tamamı yağ asitlerinden oluşuyorsa sabunlaştırma işlemi yapılmayarak yağ asiti örneği balona konulmuş, pipet ile metanollü  $\text{BF}_3$  çözeltisi ilave edilmiş, geri soğutucu balona takılıp kaynatılmıştır.

$\text{BF}_3$  ilavesinden sonra örnek iki dakika kaynatılmış, 5 ml. heptan kaynamakta olan karışıma geri soğutucunun tepesinden ilave edilmiş ve 1 dakika daha kaynatılmıştır. Isıtma işlemi durdurularak balon, oda sıcaklığına kadar soğutulmuş, sonra balon geri soğutucudan çıkarılmıştır. Az miktarda doymuş sodyum klorür (NaCl) çözeltisi ilave edilmiş ve balon birkaç kere yavaşça döndürülerek karıştırılmıştır. Sıvı seviyesinin balonun boynuna gelmesi için daha fazla doymuş NaCl çözeltisi ilave edilmiştir.

Üstteki yaklaşık 1 ml'lik heptan fazı deney tüpüne aktarılmış ve susuz sodyum sülfat ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) ilave edilerek çözeltide kalmış olan eser miktardaki su alınmış ve GLC kolonuna doğrudan enjekte edilmiştir (ANONYMOUS 1985a).

#### Ampulde Direkt Metilasyon Yöntemi

20 mg yağ bir ampul içersine tartılarak üzerine %2 derişik sülfürik asit ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) ve %0,1 benzol içeren (absolüt) metanolden 2 ml konulmuştur. Ampulün ağı kapatılarak 70°C'lik kurutma dolabında ertesi güne kadar tutulmuştur. Esterleştirmenin çabuklaştırılması için yağın metanol ile temasını sağlamak üzere zaman zaman şiddetlice çalkalamak gerekmiştir. Ampul içersinde yağ damlacıkları kaybolarak berrak bir sıvı meydana geldiği zaman ampul açılmış ve üzerine 2 ml su katılarak küçük bir ayırma hunisine aktarılmıştır. 2'şer ml'lik 30°C-50°C'de kaynayan petrol eteri ile 3 defa çalkalanmıştır. Eterli faz bir defa 1 ml. su ile yıkanmıştır.  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 'la kurutulmuş ve petrol eteri uçurularak GLC'de analiz edilmiştir (ÇOLAKOĞLU 1969).

### Trimethylsulphonium Hydroxide (TMSH) ile Transesterifikasyon Yöntemi

0.2 M TMSH solusyonu, metanolde TMSH ile gümüş oksidin ( $Ag_2O$ ) oda sıcaklığındaki reaksiyonuna göre hazırlanmıştır. Reaksiyon solüsyonunda hiç iyodür kalmayınca kadar reaksiyonun ilerlemesine izin verilmiştir. Bu solüsyonun hazırlanması sırasında 4 g TMSH, 8 g  $Ag_2O$  ve 100 ml metanol ile birlikte bir erlenmayere konulmuş, ağzı pamuk ile kapatılarak, manyetik karıştırıcı üzerinde yaklaşık 24 saat karıştırılmıştır. Reaksiyonun tamamlanıp tamamlanmadığı gümüş nitrat ( $AgNO_3$ ) ile kontrol edilmiş ve eğer reaksiyon tamamlanmamışsa (TMSH ve  $Ag_2O$ 'ün metanoldeki karışımından 1 damla alınmış, üzerine 1 damla  $AgNO_3$  damlatılmıştır. Eğer renk koyu kahverengi ve süt kesigi görünümünde ise reaksiyon tamamlanmamıştır. Renk açık kahve ise ve peltemsi görünüm yok ise reaksiyon tamamlanmıştır.) biraz daha  $Ag_2O$  ilave edilmiş, reaksiyon tamamlanana kadar manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırmaya devam edilmiştir.

10.00  $\mu$ l (10.00 mg) bitkisel sıvı yağa, 250  $\mu$ l TMSH solüsyonu ilave edilmiştir. Yaklaşık 10 mg margarine 0.5 ml. kloroform ilave edilip yağın çözünmesi sağlandıktan sonra 250  $\mu$ l TMSH solüsyonu ilave edilmiştir. Yağ damlacıklarının kaybolduğu andan yaklaşık 15 dakika sonra solusyon, GLC'de yağ asiti analizi için kullanılmıştır (BUTTE 1983).

### Sodyum Metoksit ( $CH_3NaO$ ) Yöntemi

14 damla veya yaklaşık 150 mg yağ numunesi 50 ml'lik kuru bir şişeye konmuştur. 1:1 oranında metanol-dietileterle hazırlanmış 5.00 ml 0.25 M  $CH_3NaO$ 'le (1.35 g.  $CH_3NaO$  tartılıp metanol-dietileter karışımıyla 100 ml'ye tamamlanmıştır), beraber geri soğutucu altında 30 saniye kaynatılmıştır. Balon ısı kaynağından alınmış, 3 ml isooktan ve 15 ml doymuş NaCl çözeltisi ilave edilmiş ve kuvvetlice çalkalanmıştır. Sıvı seviyesi biraz daha NaCl'le balonun boyun kısmına getirilmiş ve fazların ayrılması için bırakılmıştır. En üst tabakadan yaklaşık 0.10  $\mu$ l alınarak GLC'ye enjekte edilmiştir (BANNON ve ark. 1982a).

### Yağ Asitleri Anhidrit Analitik Standartlarının Analizleri

Palmitik, stearik, oleik ve linoleik asit anhidrit standartlarından her bir tekerrür için ayrı ayrı tartım yapılmış olup miktarları belli olan yağ asitleri bir balon içine tartılmıştır.

Bu tartımlarda sırasıyla palmitik, stearik, oleik ve linoleik asit oranlarının (2:1:2:1:) olmasına dikkat edilmiştir. Bu 4 yağ asitinin karışımlarına daha önce bahsedilen esterleştirme yöntemleri aynen uygulanmış fakat  $CH_3NaO$ 'nun kullanıldığı yöntemde NaCl'nin kullanıldığı aşamada, enjeksiyon için alacağımız üst fazda yeterli berraklık sağlanmadığından doymuş NaCl ilavesinden önce 5 ml heptan ilavesi yapılmıştır. TMSH ile transesterifikasyon yönteminde yağ asiti standart karışımlarının üzerine 1 ml. kloroform ilave edilerek, standartların çözünmesi sağlanmış ve daha sonra 250  $\mu$ l TMSH solüsyonu konulmuştur.

Analitik standartlarla yapılan çalışmalarda yapılan her bir tekerrürdeki yağ asitleri miktar olarak bilinmektedir. GLC analizinden sonra her bir yağ asitinin % alanlarında kromatogramlardan hesaplanmıştır. Yapılan her bir analizdeki yağ asitlerine birer M katsayısı bulunmuş bunlar istatistik değerlendirmede kullanılmıştır.

Yağ asitinin tartılan miktarı (mg)

$$M = \frac{\text{Yağ asitinin tartılan miktarı (mg)}}{\text{Analiz sonucu bulunan yağ asiti miktarı (\% Alan)}}$$

### Yağ Asidi Bileşimlerinin Gaz-Likit Kromatografide Saptanması

Esterleştirilen yağ örnekleri ve yağ asiti anhidrit analitik standart karışımları GLC cihazına enjektörle 0.10  $\mu$ l enjekte edilmiştir. Sonuçlar yazıcıdan yağ asitleri metil esterlerinin % alanı olarak alınmıştır (ANONYMOUS 1985b).

Cihazın çalışma şartları aşağıda verilmiştir.

- Gaz-Likit Kromatografisi Marka ve Modeli : Perkin Elmer 8500
- Yazıcının Marka ve Modeli : Perkin Elmer GP-100
- Dedektör : FID (Alev İyonizasyon Dedektörü)

– Kolon	: Kapiler kolon, kolon materyali DB-23(%50 Cyanoproply silicone)
– Kolon uzunluğu	: 30 m
– Kolon iç çapı	: 0.53 mm
– Fırın sıcaklığı	: 185°C
– Enjektör Blok'u sıcaklığı	: 250°C
– Dedektör Blok'u sıcaklığı	: 270°C
– Taşıyıcı gaz akışı (N <sub>2</sub> )	: 8 ml/dak.
– Hidrojen gazı akışı	: 20 lbf/in <sup>2</sup>
– Kuru hava akışı	: 8 lbf/in <sup>2</sup>
– Make-up gaz akışı (N <sub>2</sub> )	: 18 ml/dak'dır.

### ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Yağ asitleri karışım standartlarıyla yapılan çalışmaların kromatogramları incelendiğinde; temel çizginin BF<sub>3</sub>-metanol, ampulde direkt metilasyon ve TMSH ile transesterifikasyon yönteminde Na-metoksit yöntemine göre iyi olduğu saptanmıştır.

Birbirlerine çok yakın olarak çıkan stearik ve oleik asit piklerinin ayrımı en iyi BF<sub>3</sub>-metanol ve TMSH ile transesterifikasyon yöntemlerinde olmuştur. Ampulde direkt metilasyon yönteminde ise oleik ve linoleik asit piklerinin yakınında istenmeyen küçük pikler görülmüştür. GLC'nin aynı çalışma şartlarında hazır olarak alınan YAME karışım standartının güzel bir kromatogramı elde edilmiştir. Bu nedenle yukarıda bahsettiğimiz kromatogram konusundaki olumsuzlukların uygulanan esterleştirme yöntemlerinden kaynaklandığını söyleyebiliriz.

Yağ asitleri anhidrit analitik standart karışımları ile yapılan çalışmada palmitik, stearik, oleik ve linoleik asit tesadüf parselleri deneme desenine göre her bir uygulamada üç tekerrürlü olarak analiz edilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda palmitik, stearik, oleik ve linoleik asite göre 4 yöntemin birbirinden farklı olmadığı görülmüştür.

Ayçiçekeyağı örneklerine uygulanan 4 değişik yöntemle ait kromatogramlar incelendiğinde, en iyi temel çizginin Na-metoksit yönteminde, en kötü temel çizginin ampulde direkt metilasyon yönteminde elde edildiği görülmüştür. Birbirlerine yakın çıktıkları için iyi ayrılması beklenen stearik ve oleik asit piklerinin ampulde direkt metilasyon yönteminde elde edildiği görülmüştür. Birbirlerine yakın çıktıkları için iyi ayrılması beklenen stearik ve oleik asit piklerinin ampulde direkt metilasyon yönteminde istenilen şekilde ayrıldığı görülmüştür.

Zeytinyağı örneklerine ait kromatogramlarda en iyi temel çizgiyi BF<sub>3</sub>-metanol yönteminin verdiği saptanmıştır. Stearik asit piki en güzel şekilde BF<sub>3</sub>-metanol yönteminde ayrılırken, en kötü ayırım ampulde direkt metilasyon yönteminde olmuştur.

Zeytinyağı örneklerinin GLC analizleri sonucu elde edilen kromatogramlarında palmitoleik asitin ayrılışı da dikkatimizi çekmiştir. Zeytinyağında (ERSOY 1985)'e göre %0.30-3.50 oranında olması gerektiği belirtilen palmitoleik asitin % oranları bu çalışmada hesaplanmamıştır. Fakat her bir metotta zeytinyağı örneğine beş tekerrür çalışıldığı dikkate alındığında ampulde direkt metilasyon yönteminde palmitoleik asitin bir tekerrürde, TMSH ile transesterifikasyonda 3 tekerrürde, BF<sub>3</sub>-metanol ve Na-metoksit yöntemlerinde her tekerrürde oransal olarak az olan bu yağ asitinin ayrılabilir olması o metotlar için avantajdır.

Margarin örneklerine uygulanan 4 değişik yöntemle ait kromatogramlar incelendiğinde temel çizgi konusunda kromatogramların birbirlerinden farklı olmadığı görülmüştür. Margarinde miktarları az bulunan palmitoleik asit ve stearik asite ait piklerin ayrımı en iyi TMSH ile transesterifikasyon yönteminde olmuştur. Diğer asitlere ait piklerin ayrımı konusunda kromatogramlar birbirlerinden farklı bulunmamışlardır. Palmitik, oleik ve linoleik asite ait olan piklerin ayrımının zeytinyağı ve ayçiçekeyağı kromatogramlarındaki kadar iyi olmadığı saptanmıştır.

Yağ örneklerine uygulanan farklı esterleştirme yöntemleri sonucunda elde edilen palmitik asit miktarlarının ortalamaları değerlendirildiğinde, ayçiçekyağında en yüksek değer %9.10, zeytinyağında %16.30 ile ampulde direkt metilasyon yönteminde bulunmuştur. Bu oran margarin örneklerinde en yüksek %27.86 değer ile BF<sub>3</sub>-metanol ve ampulde direkt metilasyon yönteminde saptanmıştır.

Yağ örneklerinin esterleştirilmesi sonucu beş tekerrüden elde edilen palmitik asit sonuçları Çizelge-1'de yer almaktadır.

Çizelge 1. Yağ örneklerine uygulanan farklı esterleştirme yöntemleri sonucunda elde edilen palmitik asit miktarları (% Alan)

Yöntemler*	Yağlar	1. Tekerrür	2. Tekerrür	3. Tekerrür	4. Tekerrür	5. Tekerrür	$\bar{x}$
1	Ayçiçekyağı	8.30	8.70	8.10	9.00	10.90	9.00
	Zeytinyağı	14.10	13.40	12.90	14.60	13.80	13.76
	Margarin	27.30	28.00	30.00	28.50	25.50	27.86
2	Ayçiçekyağı	7.90	11.50	8.70	7.90	9.50	9.10
	Zeytinyağı	14.10	16.00	17.20	16.80	17.40	16.30
	Margarin	30.90	24.30	23.70	35.70	24.70	27.86
3	Ayçiçekyağı	7.80	7.10	8.00	8.20	8.40	7.90
	Zeytinyağı	16.00	13.80	13.60	14.20	15.30	14.58
	Margarin	25.10	25.80	25.50	27.90	24.50	25.76
4	Ayçiçekyağı	7.20	7.90	8.70	7.10	7.70	7.72
	Zeytinyağı	13.90	13.80	13.00	13.60	13.40	13.54
	Margarin	26.20	24.90	25.70	28.70	28.30	26.76

\* 1=BF<sub>3</sub> metanol yöntemi

3=TMSH ile transesterifikasyon yöntemi

2=Ampulde direkt metilasyon yöntemi

4=Na-metoksit yöntemi

Yağ örneklerinden elde edilen stearik asit miktarlarının ortalamaları değerlendirildiğinde; ayçiçekyağında en yüksek değer %5.70, zeytinyağında %3.50 olarak ampulde direkt metilasyon yönteminde gözlenmiştir. Margarinde ise en yüksek değer TMSH ile transesterifikasyon yönteminde %6.14 olarak bulunmuştur.

Yağ örneklerinin esterleştirilmesi sonucu beş tekerrüden elde edilen stearik asit sonuçları Çizelge 2'de yer almaktadır.

Çizelge 2. Yağ örneklerine uygulanan farklı esterleştirme yöntemleri sonucunda elde edilen stearik asit miktarları (% Alan)

Yöntemler	Yağlar	1. Tekerrür	2. Tekerrür	3. Tekerrür	4. Tekerrür	5. Tekerrür	$\bar{x}$
1	Ayçiçekyağı	4.60	3.90	4.20	4.00	4.00	4.14
	Zeytinyağı	3.10	3.10	3.00	2.80	2.90	2.98
	Margarin	6.20	5.60	4.70	5.10	5.00	5.32
2	Ayçiçekyağı	7.90	5.90	5.50	4.00	5.20	5.70
	Zeytinyağı	4.10	3.40	3.70	3.40	2.90	3.50
	Margarin	4.80	6.80	5.80	4.50	5.90	5.56
3	Ayçiçekyağı	3.40	3.30	3.40	4.60	3.90	3.72
	Zeytinyağı	3.00	3.80	3.20	2.80	2.70	3.10
	Margarin	6.10	6.00	7.00	5.10	6.50	6.14
4	Ayçiçekyağı	4.00	3.80	4.10	4.10	3.80	3.96
	Zeytinyağı	2.80	2.90	2.90	2.90	2.90	2.88
	Margarin	6.00	4.90	5.40	5.40	5.80	5.50

Aynı değerlendirmeler oleik asit açısından yapıldığında; ayçiçekyağında en yüksek değer %26.20, zeytinyağında %72.90 ve margarinde %46.20 bulunmuştur. Bu değerleri sırasıyla ampulde direkt metilasyon, BF<sub>3</sub>-metanol ve TMSH ile transesterifikasyon yöntemleri vermiştir.

Yağ örneklerinin esterleştirilmesi sonucu beş tekerrürden elde edilen sonuçlar Çizelge 3'de yer almaktadır.

**Çizelge 3. Yağ örneklerine uygulanan farklı esterleştirme yöntemleri sonucunda elde edilen oleik asit miktarları (% Alan)**

Yöntemler	Yağlar	1. Tekerrür	2. Tekerrür	3. Tekerrür	4. Tekerrür	5. Tekerrür	$\bar{x}$
1	Ayçiçekyağı	26.00	23.40	24.70	23.80	23.50	24.28
	Zeytinyağı	72.30	73.60	73.70	72.00	72.90	72.90
	Margarin	45.00	45.10	45.30	45.10	47.00	45.50
2	Ayçiçekyağı	24.40	30.80	23.00	26.90	25.90	26.20
	Zeytinyağı	68.90	74.70	67.70	70.70	70.00	70.40
	Margarin	42.50	46.90	48.10	37.80	47.30	44.52
3	Ayçiçekyağı	22.40	22.20	21.90	23.90	23.90	22.86
	Zeytinyağı	70.60	68.30	69.70	71.20	70.10	69.98
	Margarin	47.40	45.70	45.80	45.80	46.50	46.20
4	Ayçiçekyağı	23.80	23.50	23.40	24.80	23.60	23.82
	Zeytinyağı	72.30	72.80	73.40	72.50	73.20	72.84
	Margarin	45.00	47.20	44.80	43.90	44.60	45.10

Yağ örneklerine uygulanan farklı esterleştirme yöntemleri sonucunda elde edilen linoleik asit miktarları ortalamaları değerlendirildiğinde ayçiçekyağında en yüksek değer %65.34, zeytinyağında %12.16 bulunmuş ve bu sonuçlar TMSH ile transesterifikasyon yönteminden elde edilmiştir. Margarinde en yüksek linoleik asiti %22.46 sonucu ile Na-metoksit yöntemi vermiştir.

Yağ örneklerinin esterleştirilmesi sonucu beş tekerrürden elde edilen sonuçlar Çizelge 4'de yer almaktadır.

**Çizelge 4. Yağ örneklerine uygulanan farklı esterleştirme yöntemleri sonucunda elde edilen linoleik asit miktarları (% Alan)**

Yöntemler	Yağlar	1. Tekerrür	2. Tekerrür	3. Tekerrür	4. Tekerrür	5. Tekerrür	$\bar{x}$
1	Ayçiçekyağı	60.90	63.80	62.80	63.10	61.50	62.42
	Zeytinyağı	10.30	9.70	10.30	10.50	10.20	10.20
	Margarin	21.30	21.20	19.70	21.20	22.40	21.16
2	Ayçiçekyağı	59.70	51.60	62.60	61.00	59.20	58.82
	Zeytinyağı	12.70	5.90	11.30	8.90	9.60	9.68
	Margarin	21.60	21.80	22.20	21.80	22.00	21.88
3	Ayçiçekyağı	66.20	67.20	66.50	63.10	63.70	65.34
	Zeytinyağı	10.30	13.90	13.30	11.60	11.70	12.16
	Margarin	21.30	22.30	21.50	21.00	22.30	21.66
4	Ayçiçekyağı	64.80	64.70	63.70	63.80	64.80	64.36
	Zeytinyağı	10.90	10.30	10.40	10.80	10.20	10.52
	Margarin	22.60	22.80	23.90	21.80	21.20	22.46

Zeytinyağı, ayçiçekyağı ve margarin örneklerinde analiz sonucu bulunan palmitik, stearik, oleik ve linoleik asit miktarları istatistiki yöntemlerden tesadüf parsellerinde, iki faktörlü deneme desenine göre her uygulamada beş tekerrürlü olarak analiz edilmiştir.

Örneklerden elde edilen oleik asit sonuçlarına varyans analizi uygulandığında; yöntemler arasında istatistiki anlamda fark olmadığı görülmüştür. Örneklerdeki palmitik, stearik ve linoleik asit değerleri için yapılan varyans analizi sonucunda yöntemler arasında fark olduğu saptanmış ve bunlara Duncan testi uygulanmıştır.

Örneklerdeki palmitik asit için, yöntemlere göre yapılan Duncan testi sonucunda ampulde direkt metilasyon yöntemi en yüksek değeri vermiştir. Stearik asit için de ampulde direkt metilasyon yöntemi en yüksek değeri vermiştir. Fakat diğer 3 yöntem de birbirinden farksız bulunmuştur. Linoleik asit için yöntemlere göre yapılan Duncan testi sonucunda TMSH ile transesterifikasyon yöntemi en yüksek değeri veriyor görünse de Na-metoksit ile metilasyonda TMSH ile transesterifikasyon grubuna girmektedir, ampulde direkt metilasyon yöntemi de en düşük değeri vermiştir.

BF<sub>3</sub>-metanol yöntemi ile analiz yapılacağı zaman kullanılacak olan Na-hidroksit ve doymuş NaCl reaktiflerinin hazırlanması çok kısa bir zaman almıştır. Bu analizde kullanılan BF<sub>3</sub>-metanol kompleksinin laboratuvarında hazırlanması, zehirli olması nedeniyle düşünülmemiştir. Reaktiflerin hazırlanması işleminden sonraki metilasyon işlemi de yaklaşık 15 dakikada tamamlanmıştır.

Ampulde direkt metilasyon yönteminde kullanılacak olan %2 derişik H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ve %0.10 benzolü içeren absöüt metanol reaktifinin hazırlanması da kolay olmuştur. Fakat esterleşmenin tamamlanması için ampulün 70°C'lik etüvde 24 saat beklemesi gerekmiştir. Bu bir analiz için çok uzun zaman dilimi olarak görülmüştür.

TMSH ile transesterifikasyon işleminde TMSH çözeltilsinin hazırlanması manyetik karıştırıcı eşliğinde yaklaşık 24 saatte tamamlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltili oda sıcaklığında yağ örneğinin üzerine konulmuş ve yağ damlacıklarının kaybolduğu andan yaklaşık 15 dakika sonra solüsyon GLC'de yağ asiti analizi için kullanılmıştır. (Eğer yağa önce kloroform gibi yağ çözücü bir solvent, sonra TMSH ilave edilirse esterifikasyon işlemi 1-2 dakika gibi kısa bir sürede tamamlanmaktadır).

Na-metoksit yönteminde kullanılan Na-metoksit reaktifinin hazırlanması da çok az zaman almış ve esterifikasyon işlemi de yaklaşık 2 dakikada tamamlanmıştır.

Bu çalışmada incelenen 4 esterleştirme yönteminde kullanılan reaktiflerden BF<sub>3</sub>-metanol kompleksi, Na-metoksit ve TMSH her zaman bir laboratuvarında bulunmayacak maddelerdir. Bu maddelerin kullanılmaya karar verildiği zaman ithalatı gerekmektedir. Bu da 45 gün gibi bir zaman almaktadır. Ampulde direkt metilasyon yönteminde kullanılan reaktiflerin hazırlanmasında böyle bir problem yoktur.

Bir analiz için kullanılan reaktiflerin ve harcanan elektriğin maliyeti, her bir yöntem için tek tek hesaplanmıştır. (Burada bahsedilen elektrik maliyeti etüv, geri soğutucu ve manyetik karıştırıcının harcadığı elektriktir). Hangi esterleştirme yöntemi kullanılırsa kullanılsın GLC'deki analiz aynı sürede tamamlandığı için ekonomik analiz yapılırken GLC'nin harcadığı elektrik maliyeti dikkate alınmamıştır. Bu duruma göre Na-metoksit yöntemi ile yapılan analiz en ucuzdur. Bunu ucuzdan pahalıya doğru sıralarsak; TMSH ile transesterifikasyon BF<sub>3</sub>-metanol ve ampulde direkt metilasyon yöntemleri takip etmektedir. 24 saat etüvün 70°C'da çalışması gerektiği için ampulde direkt metilasyon yönteminin bir analizi, diğer yöntemlerdeki maliyetten yaklaşık 10 kat fazla bulunmuştur.

BF<sub>3</sub>-metanol kullanımının sağlık açısından sakıncalı olduğu belirtilmiştir. Bu özelliğinden dolayı rutin çalışmalar için kullanımı tercih edilmemiştir.

İstatistiki değerlendirme sonuçlarını, yöntemlerin uygulama kolaylıklarını, elde edilen kromatogramların durumlarını zaman ve ekonomik açıdan yapılan değerlendirmeleri hep birlikte düşündüğümüz zaman kullanılan 4 yöntem içinde Na-metoksit yöntemi birinci, TMSH ile transesterifikasyon yöntemi ikinci, BF<sub>3</sub>-metanol yöntemi üçüncü ve ampulde direkt metilasyon yöntemi dördüncü sırada yer almıştır.



**KAYNAKLAR**

- AKTAŞ, S., 1987. Lipitler ve Kalp-Damar Sistemi Hastalıklarına Etkisi. TÜBİTAK Marmara Bilimsel ve Endüstriyel Araştırma Enstitüsü. Yayın No: 112, Gebze, 192 s.
- ANONYMOUS, 1985a. Bitkisel ve Hayvansal Katı ve Sıvı Yağlar-Yağ Asitleri Metil Esterlerinin Hazırlanması (TS 4504) Türk Standardları Enstitüsü, Ankara, 9 s.
- ANONYMOUS, 1985b. Hayvansal ve Bitkisel Katı ve Sıvı Yağlar-Yağ Asitleri Metil Esterlerinin Gaz-Sıvı Kromatografisiyle Analizi (TS 4664). Türk Standardları Enstitüsü, Ankara, 9 s.
- BANNON, C.D., G.J. BREEN., J.D. CRASKE., N.T.HAI., N.L.HARPER. and K. L. O'ROURKE. 1982a. Analysis of Fatty Acid Methyl Esters With High Accuracy and Reliability. III. Literature Review of and Investigations in to the Development of Rapid Procedures for the Methoxide-Catalysed Methanolysis of Fats and Oils. *Journal of Chromatography*, 247, 71-89.
- BUTTE, W. 1983. Rapid Method for the Determined of Fatty Acid Profiles From Fats and Oils Using Trimethylsulphonium Hydroxide for Transesterification. *Journal of Chromatography*, 261, 142-145.
- CRASKE, D.J. 1993. Separation of Instrumental and Chemical Error in the Analysis of Oils by Gas Chromatography-A Collaborative Evaluation. *JAOCs*, V.70(4): 325-334.
- ÇOLAKOĞLU, M. 1969. 1966-1967 Kampanyasında Elde Edilen Türk Zeytinyağlarının Analitik Karakterleri. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No: 138, Basım: İzmir-Bornova, 41 s.
- DEMİRCİ, M. ve M. ALPASLAN. 1993. Bitkisel Yağ Teknolojisi. Trakya Üniversitesi Tekirdağ Ziraat Fakültesi Yayınları No: 115, Tekirdağ, 126 s.
- DÜZGÜNEŞ, O. 1975. İstatistik Metodları. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No: 578, Ankara, 179 s.
- ERSOY, B. 1985. Zeytinyağlarının Bileşim Özellikleri (Çeviri). T.C. Tarım ve Köyüşleri Bakanlığı Zeytincilik Araşt. Enst. Yayınları No:34, Bornova-İzmir, 72 s.
- HAMDY, A.H. ve W.W.CHRISTIE. 1993. Preparation of Methyl of Fatty Acids with Trimethylsulphoniumhydroxide-An Appraisal. *J. Chromatography*, 630, 438-441.
- KAYAHAN, M. ve A. TEKİN. 1994. Türkiye'de Üretilen Bazı Margarinlerdeki Trans Yağ Asitleri ve Konjuge Yağ Asitleri Miktarları Üzerine Araştırma. *Gıda*, 19(3): 147-153.
- KYRIAKIDIS, N.B., and G. DIONYSOPOULOS. 1983. Preparation of Fatty Acid Methyl Esters from Olive Oil and Other Vegetable Oils using Aqueous Hydrochloride Acid-Methanol. *Analyst*, V. 108, 738-741.
- METİN, M. 1979. Yurdumuzda, Tereyağına Yemeklik Margarinler Karıştırmak Suretiyle Yapılan Hilelerin Tespiti Üzerinde Gaz-Kromatografisi Metodu ile Araştırmalar. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No: 704, 80 s.
- SONNTAG, N.O.V. 1979. "Composition and Chracteristic of Individual Fats and Oils". 289-477. Daniel Swern edited by Bailey's Industrial Oil and Fats Products. A Wiley-Interscience Publication. Fourth Edition. Volume 1.
- TURAN, Z.M. 1991. Araştırma ve Deneme Metodları. T.C. Tarım-Orman ve Köyüşleri Bakanlığı Gıda Teknolojisi Araştırma Enstitüsü, Bursa. 302 s.
- YAZICIOĞLU, T. ve A. KARAALİ, 1983. Türk Bitkisel Yağlarının Yağ Asitleri Bileşimleri. TÜBİTAK Marmara Bilimsel ve Endüstriyel Araştırma Enstitüsü Beslenme ve Gıda Tek. Bölümü Yayın No: 70, Gebze, 105 s.