

## **C2. Gaz Kromatografisi (GC) ile Yağ Asitlerinin Belirlenmesi**

### **1. Genel Bilgi**

Her yağ kendine özgü yağ asitlerinden oluşmaktadır. Yağlar yağ asitleri bileşimi ile teşhis edilir. Bu analizin yapılmasını gerektiren diğer bir neden ise yağlara yapılan taşışın belirlenmesidir.

Bu yöntem, bütün bitkisel ve hayvansal yağlara uygulanabilir. Bu işlem, epoksi, hidroperoksi, sikloprofenil, siklopropil ve olası hidroksil ve asetilenik yağ asitlerine kısmen veya tamamen zarar verdiği için bu grupların esterleştirilmesi için uygun bir yöntem değildir. Bu yöntem asit sayısı 2'den düşük yağlar için uygulanır.

### **2. İlke**

Yağların kalevi çözeltisi ile sabunlaştırılarak metil esteri formuna dönüştürülmesi ve bunun GC'de gaz formuna geçmesi ve taşıyıcı bir gaz ile kolonda molekül ağırlıklarına göre ayrılması ve dedektör yardımı ile içerisinde yer alan yağ asitlerinin kalitatif ve kantitatif olarak belirlenmesidir.

### **3. Kimyasallar**

Hekzan, isooktan veya heptan — Metanollü KOH çözeltisi, 2 N — metil oranj — HCl çözeltisi, 0.1 N

### **4. Gereçler**

Erlenmayer, 50 mL'lik veya santrifüj tüpü, hekzan ve alkaliye dayanıklı — pipet 1 mL ve 10 mL'lik 0.1 mL taksimatlı) veya mikropipet — vial (küçük şişe) — analitik terazi — kronometre — gaz kromatografi cihazı — kapiler kolon

### **5. İşlem**

#### **5.1. Esterleştirme**

Yaklaşık 400 mg yağ örneği erlene tartılır. Üzerine 4 mL isooktan ilave edilerek yağ çözülür. Sonra 2 N metanollü KOH'dan 0.2 mL ilave edilir ve 30 saniye kuvvetli şekilde çalkalanır. 6 dakika karanlık bir yerde bekletilir. Bu süre sonunda 1–2 damla metil oranj ve ardından HCl çözeltisinden 0.45 mL ilave edilerek yatay bir konumda fazların ayrılması için beklenir. Daha sonra berrak faz küçük şişelere (viallere) alınır. Bu şişelerden alınan mikrolitre düzeyindeki örnek GC'ye verilir.

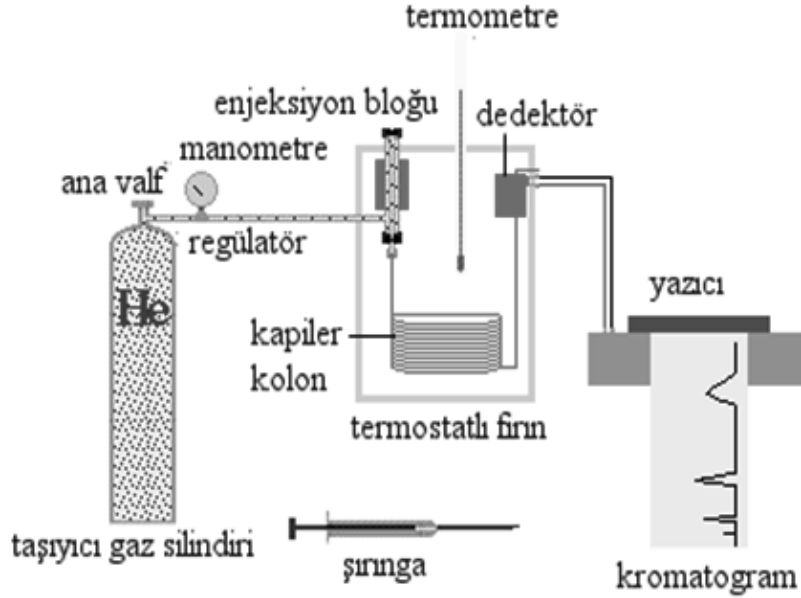
#### **5.2. Hazırlanan Metil Esterlerin Cihaza (GC) Enjeksiyonu ve Tanımlanması**

Gaz kromatografisi Şekil 1'de görüldüğü gibi; Gaz ünitesi, Enjeksiyon bloğu, Fırın veya kolon bloğu, Dedektör bloğu, Yazıcı ve integratörden oluşmaktadır.

Esterleştirilen numunedan kaç mikrolitre alınacağına göre enjektöre çekilir ve silisli kauçuktan yapılmış septum denilen kısımdan bir odacığa enjeksiyon yapılır. Buranın sıcaklığı

yaklaşık 250 °C olup örneğinki ise yaklaşık 20°–25 °C'dir. Bu nedenle örnek bu sıcaklıkta hızla buharlaşır. Taşıyıcı gazın sürüklemesiyle oluşan buharlar kolona doğru sürüklenir.

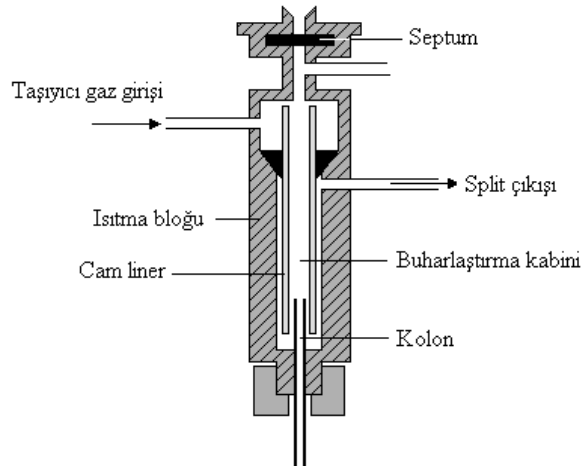
## Gaz kromatografi



Şekil 1 Gaz kromatografi cihazının kısımları ve genel görünümü

Enjeksiyon blokları enjeksiyon tiplerine göre tasarlanır, bunlar numunenin bir kısmını dışarı atan bölünmeli (split) tip, diğeri ise numunenin tümünü kolona gönderen bölünmesiz (splitless) tipdir.

Numune, aranan bileşenler açısından oldukça düşük konsantrasyona sahip ise bölünmesiz mod seçilerek örneğin tümü kolona verilir. Eğer aranan bileşenlerin oranı yüksek ise bölünmeli enjeksiyon tercih edilir. Örneğin split oranı 1:100 şeklinde olması demek numuneyi 100 birim kabul edip sadece 1 birimini kolona enjekte etmek demektir.

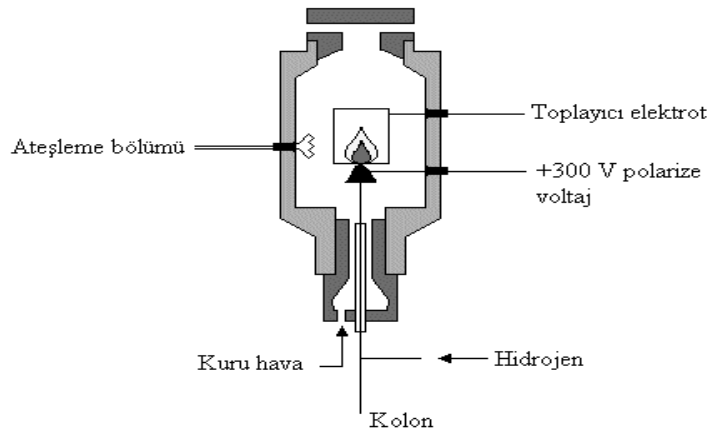


Şekil 2 Enjeksiyon bloğunun yapısı ve genel görünümü

Enjeksiyon bloğundan kolona gelen gaz fazındaki numune karbon zinciri uzunluğuna göre bileşenler kolonda tutulur. Molekül kütlesi fazla olan yağ asitleri kolonda daha uzun süre tutulur. Örneğin 12 karbonlu laurik asit kolonda az tutulurken, yani daha hızlı kolonu terk ederken, 18 karbonlu oleik asit daha çok tutulur, yani kolonu daha yavaş terk eder veya daha uzun zaman kolonda kalır. Bu olaylar absorpsiyon ve adsorpsiyon olayları ile ilgilidir.

Yağ asitleri kolonda sırasıyla ayrılarak dedektöre gelirler. Dedektörde küçük bir pilot alev olduğu için burada bileşenler yanarlar ve iyonlaşırlar. Oluşan iyonlar yağ asitleri miktarına göre elektrik sinyali oluşturur. Oluşan bu akım kablolar yardımıyla kaydediciye (bilgisayar veya yazıcı) gönderilir. Böylece zamana karşı sinyal büyüklüğü (bileşen miktarı) grafik olarak çizilir ve buna kromatogram denir. Her pik bir bileşene aittir. Piklerin tümünün bir arada gösterildiği şekle de kromatogram denir.

Yağ asitlerinin belirlenmesinde en yaygın kullanılan dedektör alev iyonlaştırmalı dedektör (Şekil 3), yaygın adı FID olup, İngilizce baş harflerinin kısaltması (Flame Ionization dedector)'dir. Bu dedektörde hidrojen ve kuru hava belirli oranda (genelde 1:10) karışarak yanar. Kolondan gelen yağ asitleri bu alevde yanar, bu yanma ile iyonlar açığa çıkar ve kollektörde depolanır. İyonların alevden kollektöre doğru ilerlemesi düşük bir akım oluşturur. Bu akım dedektör tarafından sinyal olarak ölçülür. Miktarı fazla olan yağ asitleri daha büyük, az olanlar daha küçük pik oluşturur.



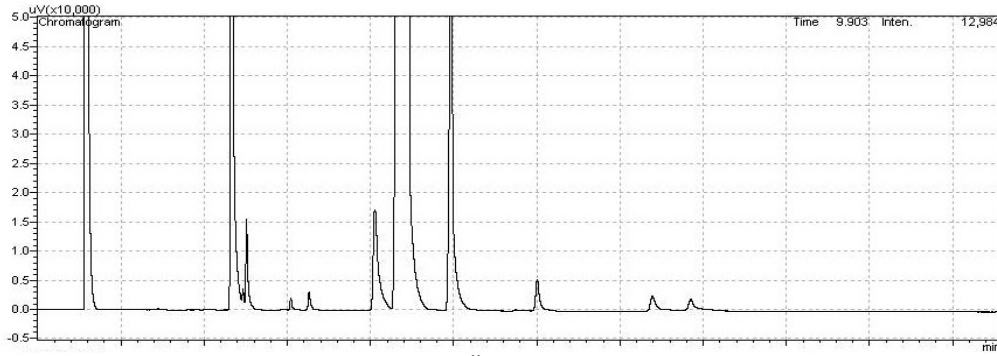
Şekil 3 Alev iyonlaştırmalı dedektörün genel yapısı

## 6. Hesaplama ve değerlendirme

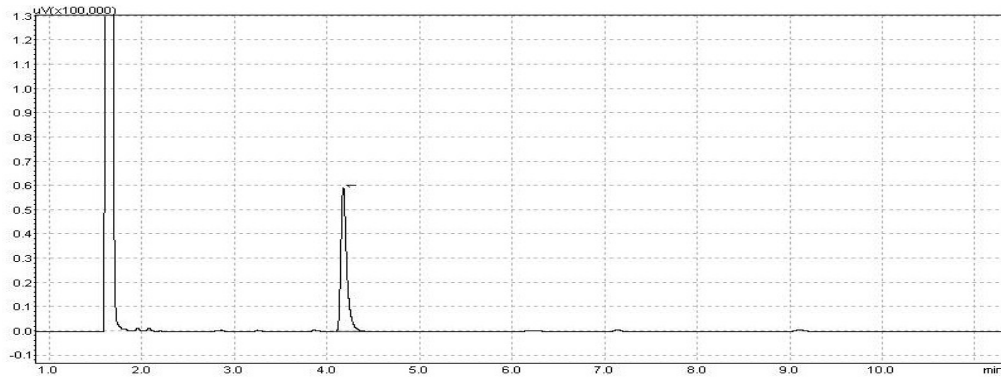
Yazıcıdan alınan kromatogramın şekli aşağıdaki gibidir. Şekil 1'de görüleceği üzere apsiste yağ asitlerinin kolonda tutulma (alınma) zamanları (dakika) yer alır. Bu kromatogramdan piklerin alanları hesaplanarak o yağ asidinin yüzdesi bulunur.

Piklerin tanımlanması için, yağ asitlerinin saf haldeki metil esterleri tek tek cihaza (enjekte) verilir ve bunların da alınma süreleri belirlenir (Şekil 2) ve daha önce enjekte edilen numunenin tutulma süreleri ile karşılaştırılarak (aynı zaman diliminde gelenler) o pikin hangi yağ asidine ait olduğu saptanır. Örneğin; cihaza saf standart olarak palmitik asit enjekte edilsin ve tutulma süresi 3 dakika olsun, sonra numune enjekte edilsin ve 3. dakikada bir pik gelsin, bu pik muhtemelen palmitik asit pikidir. Bu durum üç kez tekrar edilir ve aynı sonuç

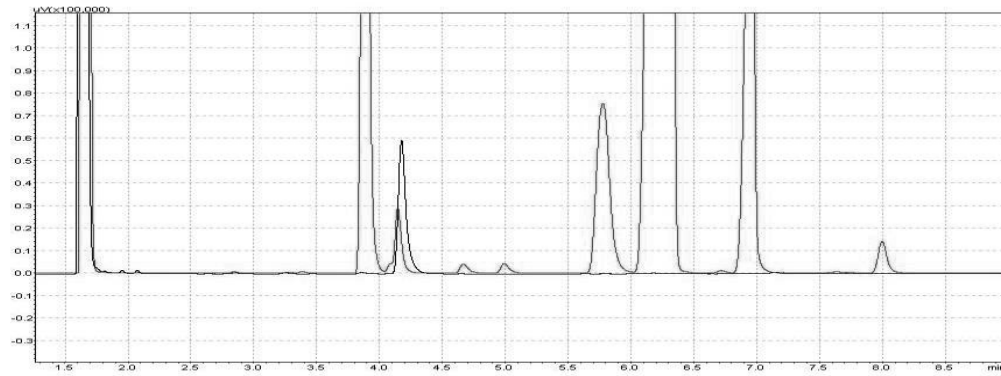
elde edilirse pik kesin olarak tanımlanmış olur. Şekil 3'te standart yağ asidi metil esteri verilmiş kromatogram ile örnek kromatogramı üst üste çakıştırılmıştır. Şekilden görüleceği üzere örnekteki o pikin hangi yağ asidi olduğu tanımlanmıştır.



Şekil 1 Örnek bir kromatogram

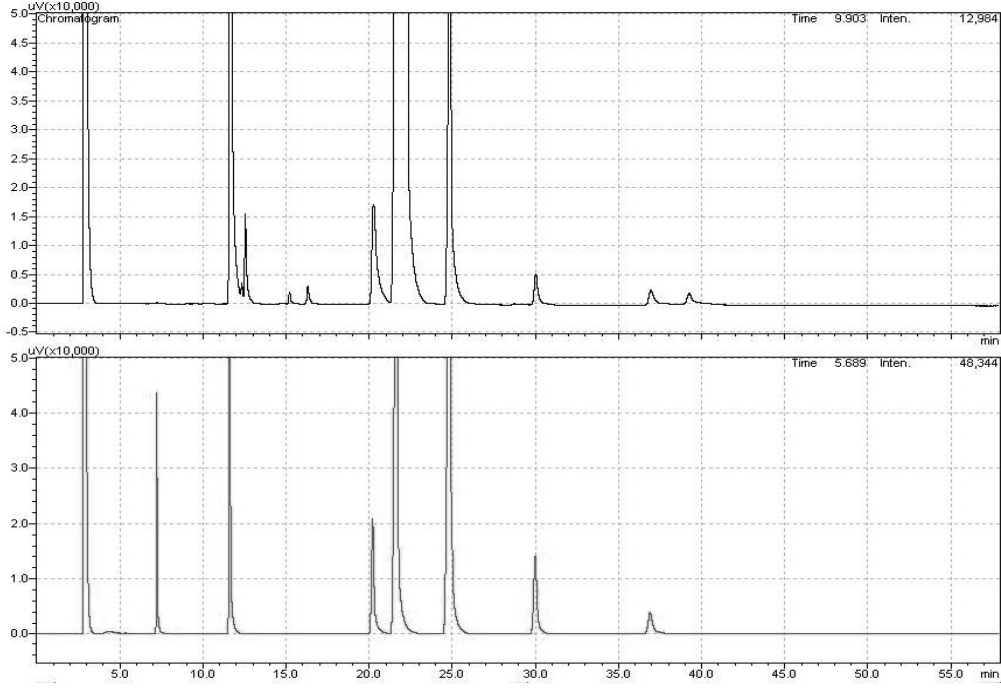


Şekil 2 Standart maddeye ait kromatogram



Şekil 3 Standart yağ asidi kromatogramı ile örnek kromatogramının karşılaştırılması

Diğer bir tanımlama şekli ise, yüzdeleri bilinen yağ asitleri karışımının cihaza verilerek elde edilen kromatogramın numune kromatogramı ile karşılaştırılmasıdır. Şekil 4'te görüleceği üzere standart yağ asitlerinden oluşan karışımın kromatogramı ile örnek kromatogramı çakıştırılmış ve örnekteki piklerin hangi yağ asitlerine ait olduğu belirlenmiştir. Bu yöntem tek tek standart vermeye nazaran daha kısa süre aldığı için tercih edilmektedir.



Şekil 4 Karışım standardı ile örnek standardının karşılaştırılması

Piklerin tanımlanmasından sonra hesaplamaya geçilir. Cihazın entegratörü pikin alanına göre her yağ asidinin bileşimini % olarak hesaplar. Aşağıdaki örnekte bir sonuç raporu verilmiştir. Burada birinci sütun pik numaralarını, ikinci sütun alıkonma sürelerini, üçüncü sütun pik alanını, dördüncü sütun pik yüksekliğini son sütun ise cihazın kendi programı ile hesapladığı derişim bazında madde yüzdelerini göstermektedir.

Peak#	Ret.Time	Area	Height	Conc.
1	2.857	1010.6	484.2	0.00705
2	3.909	1846948.3	480648.0	12.87948
3	4.162	120299.0	27768.3	0.83889
4	4.686	13454.5	2908.0	0.09382
5	5.013	25396.2	4978.3	0.17710
6	5.792	304328.3	34517.5	2.12220
7	6.357	9644052.6	1030535.7	67.25168
8	6.764	3754.8	731.1	0.02618
9	7.022	2192013.0	427189.7	15.28575
10	7.663	5022.5	572.0	0.03502
11	8.029	85879.2	17663.3	0.59887
12	9.132	45944.7	6166.9	0.32039
13	9.795	35240.5	4489.2	0.24575
14	15.177	11557.1	896.0	0.08059
15	25.939	5338.9	229.0	0.03723

## Kaynaklar

Gündüz, T. 2005. Enstrümental Analiz, Gazi Kitapevi, Ankara, 1357 s.

Holler, S. W. (Çeviri Editörleri:Prof. Dr. Esmâ KILIÇ, Prof. Dr. Fitnat KÖSEOĞLU) 1999. Analitik Kimya Temelleri Cilt 2. Bilim Yayıncılık, Ankara, 870 s.

Anonymous (1990) Fatty acids in oil and fats. In *AOAC Official Methods of Analysis*, 15<sup>th</sup> ed., Vol. II, Helrich, K. (ed.), pp 963-964, Virginia