



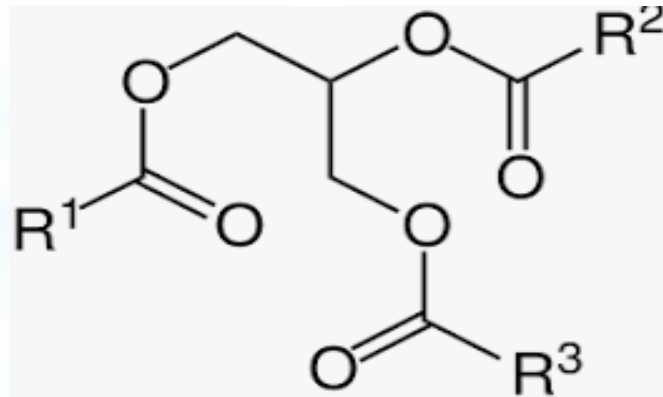
Gaz Kromatografisi (GC) ile Yağ Asitlerinin Belirlenmesi

Prof. Dr. Aziz TEKİN
Dr. Öğr. Üyesi Cansu Ekin GÜMÜŞ
Arş. Gör. Merve Sılanur YILMAZ

1. GİRİŞ

- * Kimyasal olarak tüm yağlar gliserolün yağ asidi esterlerinden oluşur.
- * Her yağın kendine has yağ asidi dağılımı ve trigliserit yapısı vardır.
- * Yağ asitlerinin çeşiti
- * Miktarı
- * Trigliseritteki yerleşim yerleri

Yağların fiziksel ve kimyasal özellikleri ile oksidatif stabilite üzerine etkilidir.



2. İlke

- * Yağların bir alkali çözeltisi ile sabunlaştırılarak metil esteri formuna dönüştürülmesi ve bunun GC'de gaz formuna geçmesi ve taşıyıcı bir gaz ile kolonda molekül ağırlıklarına göre ayrılması
- * 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, 0.1 N HCl çözeltisi

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

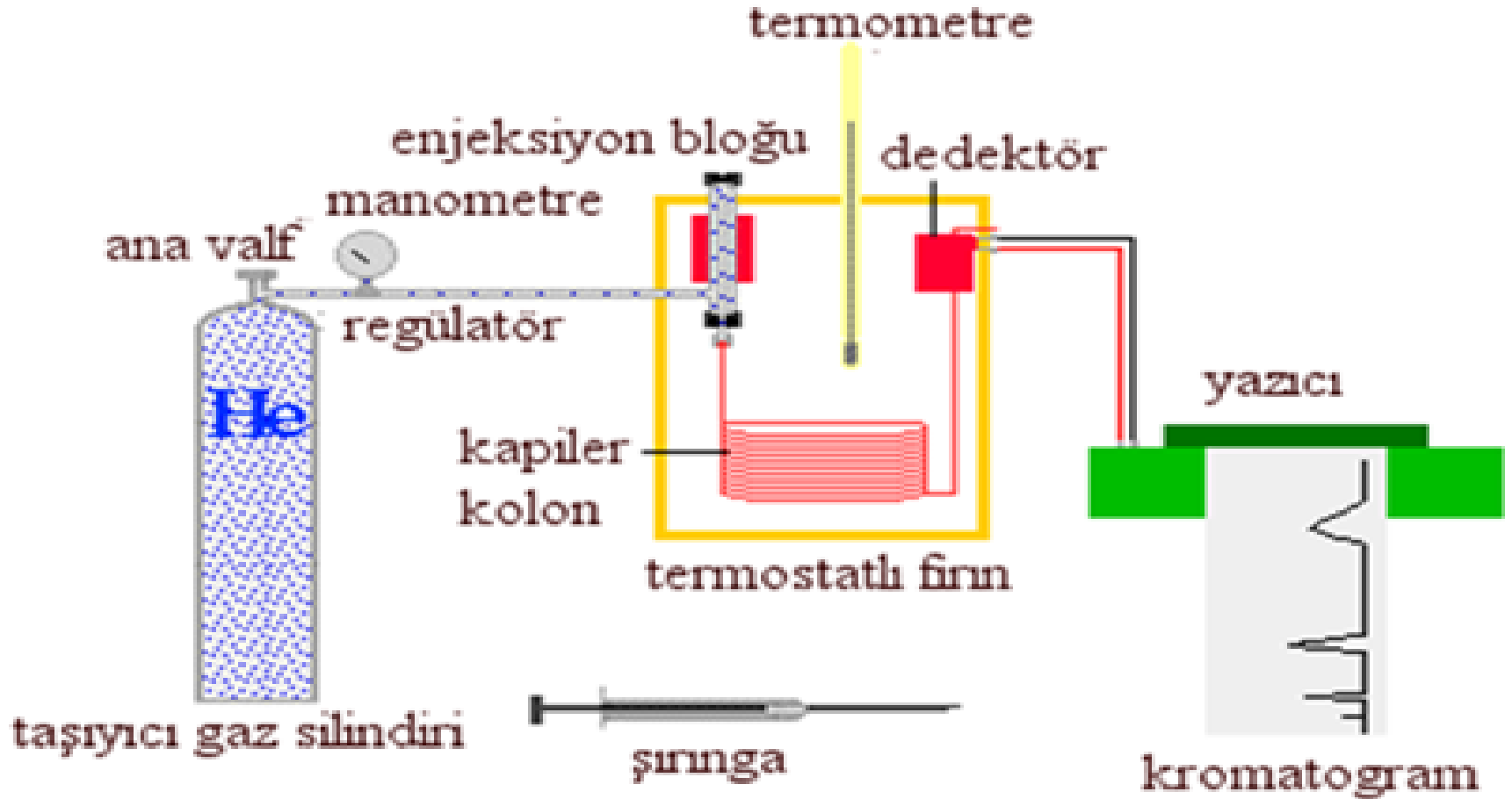
1. Yaklaşık 400 mg yağ örneği erlene tartılır. Üzerine 4 mL isooktan ilave edilerek yağ çözülür.
2. Sonra 2 N metanollü KOH'dan 0.2 mL ilave edilir ve 30 saniye kuvvetli şekilde çalkalanır.
3. 6 dakika karanlık bir yerde bekletilir.
4. Bu süre sonunda 1-2 damla metil oranj ve ardından HCl çözeltisinden 0.45 mL ilave edilerek yatay bir konumda fazların ayrılması için beklenir.
5. Daha sonra berrak faz küçük şişelere (viallere) alınır.
6. Bu şişelerden alınan mikrolitre düzeyindeki örnek GC'ye verilir.



5.2 Hazırlanan Metil Esterlerin Cihaza (GC) Enjeksiyonu ve Tanımlanması

1. Esterleştirilen numuneden kaç mikrolitre alınacağına göre enjektöre çekilir ve silisli kauçuktan yapılmış septum denilen kısımdan bir odacığa enjeksiyon yapılır.
2. Buranın sıcaklığı yaklaşık 250°C olup örneğinki ise yaklaşık 20-25 °C'dir.
3. Bu nedenle örnek bu sıcaklıkta hızla buharlaşır. Taşıyıcı gazın sürüklemesiyle oluşan buharlar kolona doğru sürüklenir.
4. Enjeksiyon bloğundan kolona gelen gaz fazındaki numune karbon zinciri uzunluğu ve polaritesine göre kolonda tutulur.
5. Yağ asitleri analizinde, molekül kütlesi fazla olan yağ asitleri kolonda daha uzun süre tutulur. Örneğin 12 karbonlu laurik asit kolonda az tutulurken, veya daha hızlı kolonu terk ederken, 18 karbonlu oleik asit daha çok tutulur, yani kolonu daha yavaş terk eder veya daha uzun zaman kolonda kalır.

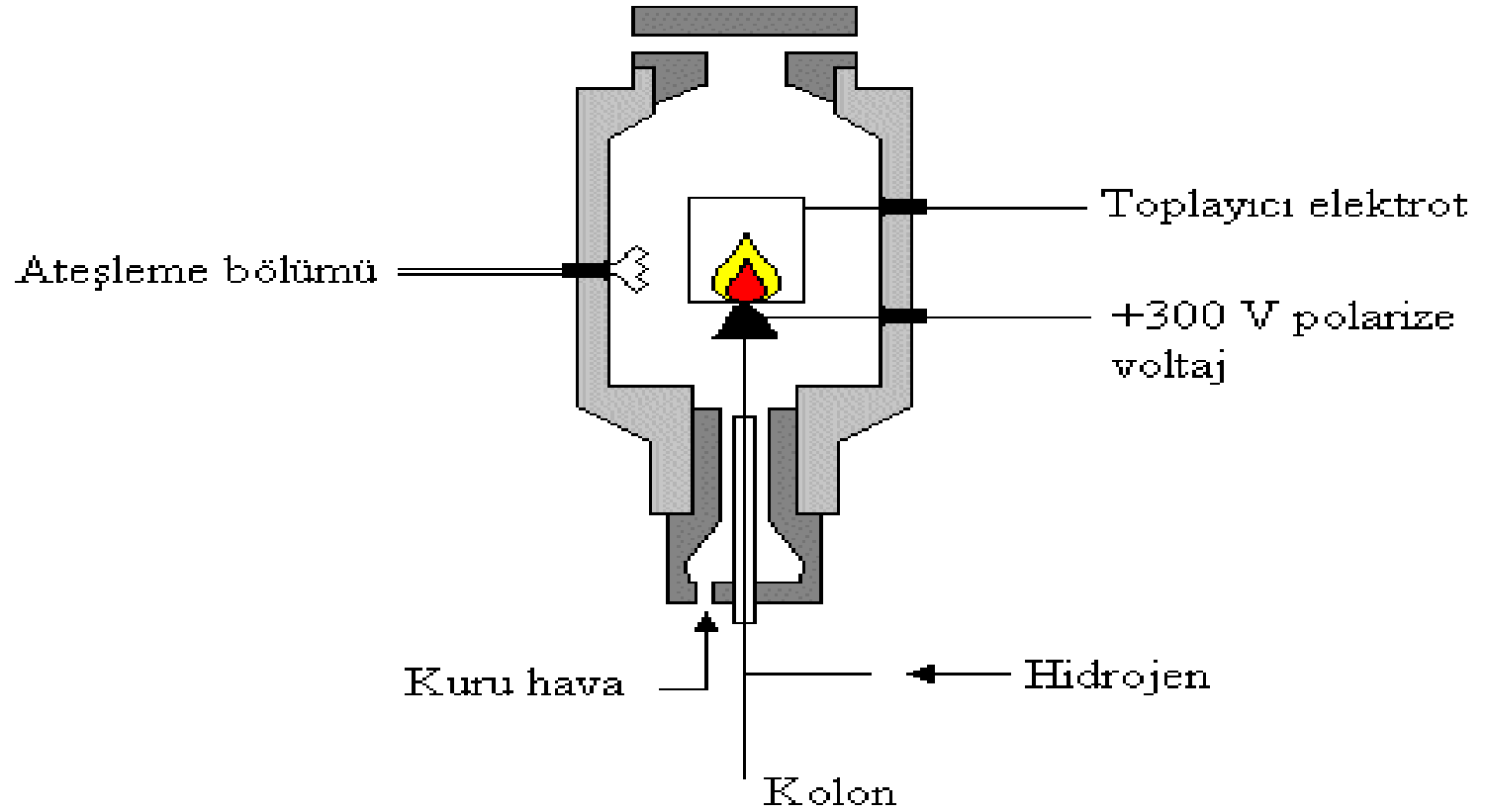
Gaz kromatografi



Şekil 1 Gaz kromatografi cihazının kısımları ve genel görünümü

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

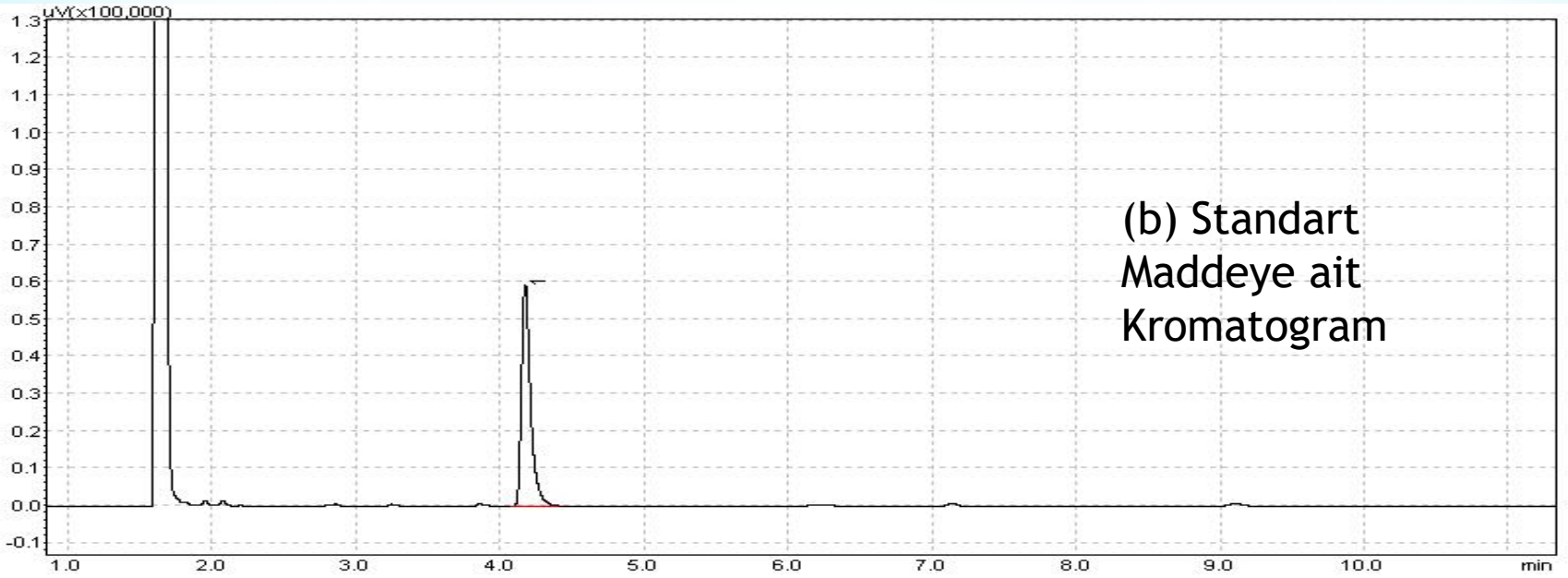
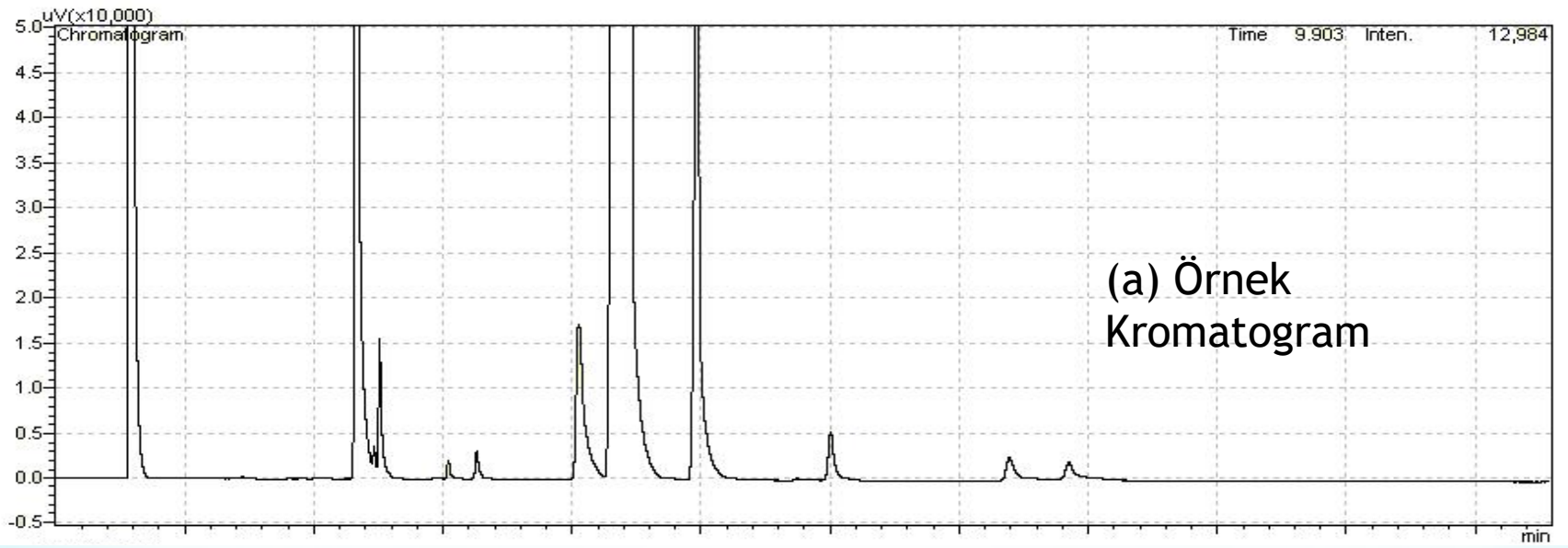
- * Yağ asitlerinin belirlenmesinde en yaygın kullanılan dedektör alev iyonlaştırmalı dedektördür (FID, Flame Ionization dedector).
- * Bu dedektörde hidrojen ve kuru hava belirli oranda (genelde 1:10) karışarak yanar. Kolondan gelen yağ asitleri bu alevde yanar, bu yanma ile iyonlar açığa çıkar ve kollektörde 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 2 Alev iyonlaştırmalı dedektörün genel yapısı

6. Hesaplama

- * Yazıcıdan alınan kromatogramda Şekil 3'te görüleceği üzere apiste yağ asitlerinin kolonda tutulma (alikonma) zamanları (dakika) yer alır. Bu kromatogramdan piklerin alanları hesaplanarak o yağ asidinin yüzdesi bulunur.
- * Piklerin tanımlanması için, yağ asitlerinin saf haldeki metil esterleri (referans standart) tek tek cihaza (enjekte) verilir ve bunların da alikonma süreleri belirlenir.
- * 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 palmitik asit pikidir.



Şekil 3 Örnek kromatogram (a) ve standart maddeye ait kromatogram (b)

Piklerin tanımlanmasından sonra hesaplama yapılır. 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.

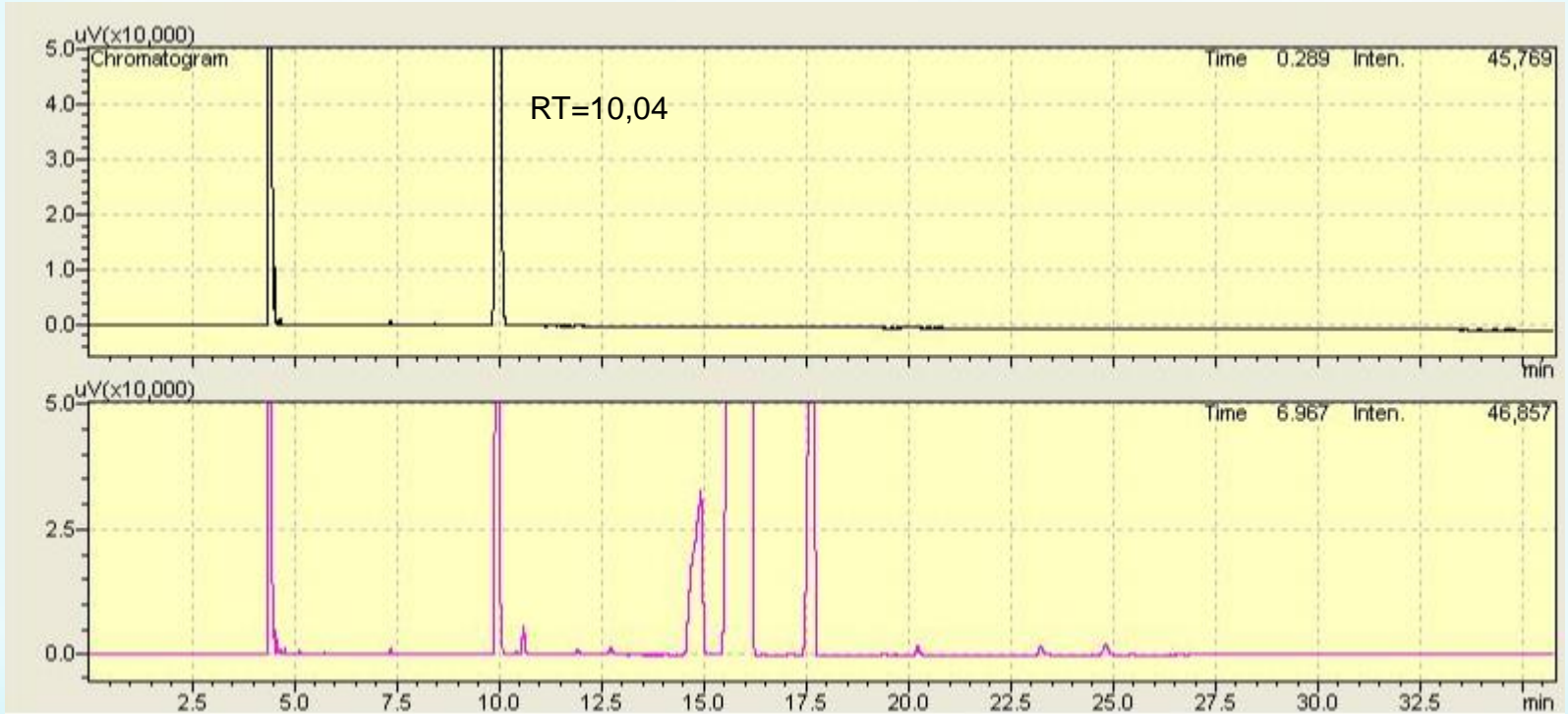
Peak#	Ret.Time	Area	Height	Conc.
1	2.857	1010.6	484.2	0.00705
2	3.909	1846948.3	480648.0	12.87948
3	4.162	120299.0	27768.3	0.83889
4	4.686	13454.5	2908.0	0.09382
5	5.013	25396.2	4978.3	0.17710
6	5.792	304328.3	34517.5	2.12220
7	6.357	9644052.6	1030535.7	67.25168
8	6.764	3754.8	731.1	0.02618
9	7.022	2192013.0	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

* **Burada;**

- Öncelikle dedektör tüm piklere ait alanları toplar (area sütunu)
- İkinci olarak, bir pike ait alanı toplam alana bölüp 100 ile çarparak, piklerin yüzde oranlarını hesaplar.
- Aşağıdaki örnekte, toplam alan 13200'dür ve 1,2 ve 3 numaralı piklere ait konsantrasyon % olarak verilmiştir.

Pik	Alan	Konsantrasyon (%)
1	1000	7,57
2	9000	68,18
3	3200	24,24

ÖDEV



16 C'lu standart ve zeytin yağına ait kromotogram

Alikonma Zamanı(dk)	Konsantrasyon(%)
7.360	0.03
9.961	5.43
10.594	0.16
11.930	0.05
12.718	0.07
14.926	2.75
16.144	84.34
17.688	6.82
20.224	0.07
23.233	0.12
24.808	0.15
38.779	0.01

*Rapor Formatı

No:

Adı Soyadı:

Uygulama Adı:

1. Konu:
2. Amaç:
3. Materyal ve Yöntem:
4. Bulgular:
5. Sonucun yorumlanması:
6. Kaynaklar

NOT 1: Uygulama raporu **FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ TEZ YAZIM KILAVUZU** kurallarına uygun olarak yazılacaktır.

NOT 2: Uygulama raporu deney sunumu sisteme yüklendikten sonraki **1 hafta içinde sisteme yüklenecektir.**

NOT 3: Tüm uygulama raporları aynı formatta yazılacaktır.