

YEMEKLİK YAĞLARDAKİ SERBEST YAĞ ASİDİ DÜZEYİNİN STANDART METOTLARA ALTERNATİF GELİŞTİRİLEN AKIŞ ENJEKSİYON ANALİZ METODUYLA BELİRLENMESİ

Hamide Filiz Ayyıldız *, Hüseyin Kara

Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Konya-TÜRKİYE
e-mail: hfayildiz@selcuk.edu.tr

(Geliş: 26 Mart 2015; Düzeltme: 07 Nisan 2015; Kabul: 15 Nisan 2015)

Özet: Sunulan bu çalışmanın amacı; yemeklik yağlardaki serbest yağ asidi (%FFA) düzeylerinin belirlenmesi için -standart metotlara alternatif olacağı düşünülen- yeni bir akış enjeksiyon analiz (FIA) metodunun geliştirilmesidir. Çalışmada FIA analizörü olarak yönlendirme valfleri ve uygun reaksiyon hücrelerinin adaptasyonu ile modifiye edilen bir HPLC sistemi kullanılmış, numune ve reaktif miktarlarının mikrolitre seviyesinde tutulduğu tayinlerde, yağ numuneleri herhangi bir ön işleme tabi tutulmaksızın direk olarak enjekte edilmiştir. % FFA tayini için geliştirilen FIA metodu birçok parametre dikkate alınarak valide edilmiş, bu çalışmalar sonucunda metodun yüksek doğruluk, kesinlik, sağlamlık ve hassasiyete sahip olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca; geliştirilen FIA metodu, %FFA tayininde standart metot olarak kullanılan AOCS Ca-5a-40 metodu ile istatistiksel F ve t testleri kullanılarak karşılaştırılmış, %95 güven seviyesinde metotlar arasında anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir. Bu çalışma ile elde edilen sonuçlar; önerilen FIA metodunun, çevre açısından potansiyel tehlike oluşturabilecek çözücülerin kullanımını azaltması, düşük maliyetle hızlı analizlerin gerçekleştirilmesine olanak sağlaması gibi üstün özellikleri sebebiyle “iyileştirme ve ilerleme” sağlamaya yönelik bir metot olduğunu ve yağ sanayi sektöründe kolaylıkla uygulanabileceğini ortaya koymuştur.

Anahtar kelimeler: Akış Enjeksiyon Analiz (FIA), Metot Validasyonu, Serbest Yağ Asidi (FFA), Yemeklik Yağlar

DETERMINATION OF FREE FATTY ACID LEVELS IN EDIBLE OILS BY DEVELOPED FLOW INJECTION ANALYSIS METHOD AS AN ALTERNATIVE TO THE STANDARD METHOD

Abstract: The purpose of this study was to develop a new flow injection analysis (FIA) method- expected to be an alternative to standard methods- for free fatty acid (FFA) determination in edible oils. The analyses were carried out on HPLC system modified for FIA analysis by adding selection valves and appropriate reaction coils. Quantities of sample and reagents used in the analysis are kept at the microliter level and the oil samples were directly injected into the system. Validation studies for new developed FIA method were performed by using various validation parameter sand, as a result of these studies, it was found that the proposed method have high accuracy, precision, and strength. Besides, the developed FIA method was compared with AOCS Ca-5a-40 standard method by using F and t tests and, it was determined that two methods were not statistically significant in 95% confidence level. Obtained results revealed that the proposed FIA method developed for %FFA determination in edible oils is considered to be a good method of ensuring the “improvement and progress” due to their superior properties such as reducing the use of solvents potential danger for the environment, allowing the realization of rapid analysis with low cost and thus it is hoped that the method can be easily applied in oil industry.

Keywords: Edible Oils, Flow Injection Analysis (FIA), Free Fatty Acid (FFA), Method Validation

1. Giriş

Serbest yağ asidi (FFA) içeriği; yemeklik yağlarının üretimi, depolanması ve satışa sunulması sürecinde yağın kalitesinin belirlenmesi amacıyla sıklıkla kullanılan kontrol indislerinden biri olup, yağlardaki yüksek FFA içeriği yağ kalitesinin düşük olduğunu göstermektedir (Saad ve ark., 2007). Yağlarda FFA oluşumu, hidroliz neticesinde ana trigliserit molekülündeki ester bağından yağ asitlerinin koparılmasından kaynaklanır (Korkut ve ark., 2007). Hidrolitikransidite de denilen bu reaksiyon, enzim ve kataliz yardımıyla sulu ortamda gerçekleşmektedir. Oluşan serbest yağ asitlerinin ileri derecede çeşitli reaksiyonlara uğraması, yağın acıması ve tüketilemez duruma gelmesine neden olur. Bu reaksiyon sonucu meydana gelen uzun zincirli yağ asitleri (C16-C20) belirli bir sınırı aşmadıkça yağın koku ve tadında önemli bir değişiklik meydana gelmez, ancak; bütirik, hekzanoik, oktanoik ve dekanoik asitler gibi kısa zincirli yağ asitleri tatta çok önemli değişiklikler meydana getirmekte ve yağın acılaşmasına neden olmaktadır (Ayyıldız 2010).

Yağlarda bulunması istenmeyen serbest yağ asitlerinin uzaklaştırılması, yağların rafinasyonu sırasında, nötralizasyon basamağında gerçekleştirilmektedir. Nötralizasyon işlemi; kimyasal rafinasyon prosesinde, serbest yağ asitlerinin NaOH veya diğer alkalilerle sabunlaştırılarak yağdan uzaklaştırılmasını içerirken (Bernardini 1973), fiziksel rafinasyon prosesinde serbest yağ asitleri, su buharı destilasyonu ile yüksek sıcaklık ve vakum altında istenmeyen tat ve koku maddeleri ile birlikte ortamdan alınmaktadır (Saygın 1988).

Yemeklik yağların FFA içeriği, yağ içeren materyalin kalitesi, ham yağın safsızlık derecesi ve işleme koşulları ve özellikle de elde edilen yağın depolanma şartlarına bağlı olarak değişmektedir (Osawa ve ark., 2007). FFA miktarı çoğunlukla % oleik asit cinsinden hesaplanmakla birlikte, yağın yapısında bulunan baskın yağ asidi cinsinden de hesaplama yapılabilmektedir. Örneğin, palm yağında FFA miktarı % palmitik asit cinsinden hesaplanmaktadır.

Şimdiye kadar, yağlardaki %FFA içeriğinin belirlenmesi için birçok analitik metot önerilmiştir. Birçok ülkede standart metot olarak kabul edilen bu yöntemlerden en çok bilinenleri ve kullanılanları American Oil Chemists Society (AOCS 2004), the European Commission of Standardisation (EC 1991) gibi kuruluşlar tarafından önerilenlerdir. Bu metotlar; nötralize edilmiş bir çözücüde seyreltilen yağ numunesinin, fenolftaleyn indikatörü varlığında, standardize edilmiş bir baz çözeltisiyle titrasyonu esasına dayanmaktadır.

Yağlardaki %FFA içeriğinin tespiti amacıyla kullanılan birçok enstrümental yöntem de bulunmaktadır. Bunlar arasında gaz kromatografisi (GC) (Kanya ve ark., 2007, Tan ve ark., 2009), yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) (Toyo'oka 2002, Li ve ark., 2011), kapilarelektroforez (CE) (Klampfl ve ark., 2000) ve Fourier-transforminfrared (FT-IR) spektroskopisi (Che Man ve Setiowaty 1999, Armenta ve ark., 2007) yöntemleri sayılabilir. Bu yöntemlerden bazıları oldukça hassas, hızlı ve tekrar üretilebilir özellikte olmakla birlikte, sıvı-sıvı ekstraksiyonu, katı faz ekstraksiyonu ya da türevlendirme gibi ön işlemler gerektirdiğinden rutin analizler için tercih edilir özellikte değildirler (Ayyıldız 2010).

Son yıllarda oldukça tercih edilen bir yöntem haline gelen akış enjeksiyon analiz (FIA) yöntemi ise, yemeklik yağ analizlerini de kapsayan birçok alanda rutin analizler için geniş bir uygulama alanı bulmuştur (Thomaidis ve Georgiou 1999, Pinto ve ark., 2006). Basitlik, hızlilik, çok yönlülük ve düşük maliyet gibi birçok avantaja sahip olması sebebiyle, organik ortamdaki analizlerin gerçekleşmesine de olanak sağlayan bu teknik, yemeklik yağ analizleri için mükemmel bir seçim haline getirmiştir (Saad ve ark., 2007). Literatürde, yemeklik yağlardaki polifenoller (Mesa ve ark., 1990, Cañizares ve ark., 1996), steroller (Ballesteros ve ark., 1995), hidroperoksitler (Pérez-Ruiz ve ark., 1993), serbest yağ asitleri (Nouros ve ark., 1997, Mariotti ve Mascini 2001), peroksit sayısı (Pineiro Avila ve de la Guardia 1997, Nouros ve ark., 1999), anisidin sayısı (Labrinea ve ark., 2001), iyot sayısı (Thomaidis ve Georgiou 2000) tayinleri için önerilen birçok akış enjeksiyon metodolojisi mevcuttur. Fakat bu metodolojilerin birçoğu, oldukça fazla reaktif ve numune sarfiyatı içermekte, analizlerin gerçekleşmesi için uzun zaman

gerektirmekte ve enjekte edilecek numunenin uygun çözücü ya da çözücü karışımları ile ön seyreltme veya homojenizasyonuna ihtiyaç duymaktadır (Ekstrom 1981, Velasco-Arjona ve Luque de Castro 1998). Bu nedenlerden dolayı, hem standart metotlara alternatif olabilecek, hem de literatürde yer alan çalışmaların eksik yönlerini kapatabilecek çevre dostu yeni metotların geliştirilmesi ve uygulamaya geçirilmesi gerekmektedir.

Bu çalışmada; ayçiçeği, soya, kanola, yer fıstığı gibi yemeklik yağlardaki %FFA tayini için -standart metotlara alternatif olacağı düşünülen- basit, hızlı, düşük maliyetli ve yüksek tekrarlanabilirliğe sahip yeni bir akış enjeksiyon analiz (FIA) metodunun geliştirilmesi amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Metot

2.1. Reaktif ve Çözeltiler

Analizlerde kullanılan kimyasal maddeler ve çözücüler kromatografik saflıkta olup, Merck (Darmstadt, Almanya) ve Sigma (St. Louis, ABD) firmalarından temin edilmiştir. Standart metot (AOCS Ca-5a-40) analizlerinde; %95 etil alkol (C₂H₅OH) içinde çözülerek hazırlanan 0,10 ve 0,25 mol L⁻¹ KOH çözeltileri potasyum asit ftalat (C₈H₅KO₄) primer standart maddesine karşı ayarlandıktan sonra titrant olarak, 1 g fenolftaleynin (PHP) 100 mL, %95'lik etil alkol içinde çözülmesiyle hazırlanan %1'lik (w/v) PHP çözeltisi ise indikatör olarak kullanılmıştır. FIA analizlerinde ise; n-propanol taşıyıcı faz olarak, n-propanolde çözülmüş farklı konsantrasyonlardaki KOH ve PHP çözeltileri reaktif olarak kullanılmıştır.

2.2. Çalışma Referans Materyalleri (WRMs) ve Yağ Numuneleri

FIA analizlerinde çalışma referans materyali (WRM) olarak kullanılan farklı %FFA içeriklerine sahip yağ numuneleri, Helvacızade Bitkisel Yağ Rafinasyon Tesisleri'nden (Konya, Türkiye) temin edilmiştir. Deneylerde kullanılan yağ numunelerinin seçiminde; Türkiye'de üretim ve tüketimi oldukça yaygın olan ve/veya olmaya başlayan ayçiçeği, soya, kanola, yer fıstığı gibi bitkisel yağlar tercih edilmiş ve nihai ürün-rafine yağ ve ara ürünlerden oluşan yağ numunelerinin temini, Helvacızade Bitkisel Yağ Rafinasyon Tesisleri'nden ve piyasadan sağlanmıştır. Çalışma referans materyalleri ve yağ numuneleri, analizlerde kullanılıncaya kadar kahverengi cam şişelerde, + 4°C'de ve karanlıkta muhafaza edilmiştir.

2.3. Standart Metot ile %FFA Tayinleri

Standart AOCS Ca-5a-40 metodu kullanılarak gerçekleştirilen tayinler, susuz ortam titrasyonlarına dayanmaktadır. Yağ numunelerinin tartımı ve tayinlerde kullanılan kimyasalların özellikleri, içerdikleri tahmini %FFA değerlerine bağlı olarak yapılmış (**Tablo 1**), yağlarda bulunan serbest yağ asitlerinin miktarı % oleik asit cinsinden hesaplanmıştır. Hem WRMs hem de analiz edilen yağ numuneleri üzerinde gerçekleştirilen tayinlerde; 1 g yağ numunesi hassasiyetle tartılmış ve 15 mL etil alkol ilave edilerek kuvvetlice çalkalanmıştır. 2-3 damla fenolftaleyn indikatörü damlatılmış ve 0.1 ve 0.25 N NaOH çözeltisi ile pembe renk oluşuncaya kadar titre edilmiştir. Harcanan NaOH sarfiyatı okunarak, **Eşitlik 1.**'de yer alan formülden gerekli hesaplama yapılmıştır.

$$\%FFA = \frac{V \times N \times M}{G \times 10} \quad (\text{oleik asit cinsinden}) \text{Eşitlik 1.}$$

V: titrasyonda harcanan NaOH miktarı (mL)

N: titrasyonda kullanılan NaOH normalitesi (yağlardaki tahmini %FFA içeriğine göre seçilmiştir)

M: serbest yağ asitlerinin molekül ağırlığı (282 g/formül-g)

G: numune ağırlığı (yağlardaki tahmini %FFA içeriğine göre seçilmiştir)

Tablo 1.AOCS Ca-5a-40 Metodu ile %FFA Tayininde Kullanılan Kimyasalların Özellikleri

%FFA Aralığı	Numune Miktarı (g)	Etanol Miktarı (mL)	Baz Derişimi
0.0-0.2	56.4 ± 0.2	50	0.1
0.2-1.0	28.2 ± 0.2	50	0.1
1.0-30	7.05 ± 0.05	75	0.25
30-50	7.05 ± 0.05	100	0.25 veya 1.0
50-100	3.525 ± 0.001	100	1.0

2.4. FIA Sistem Dizaynının Oluşturulması

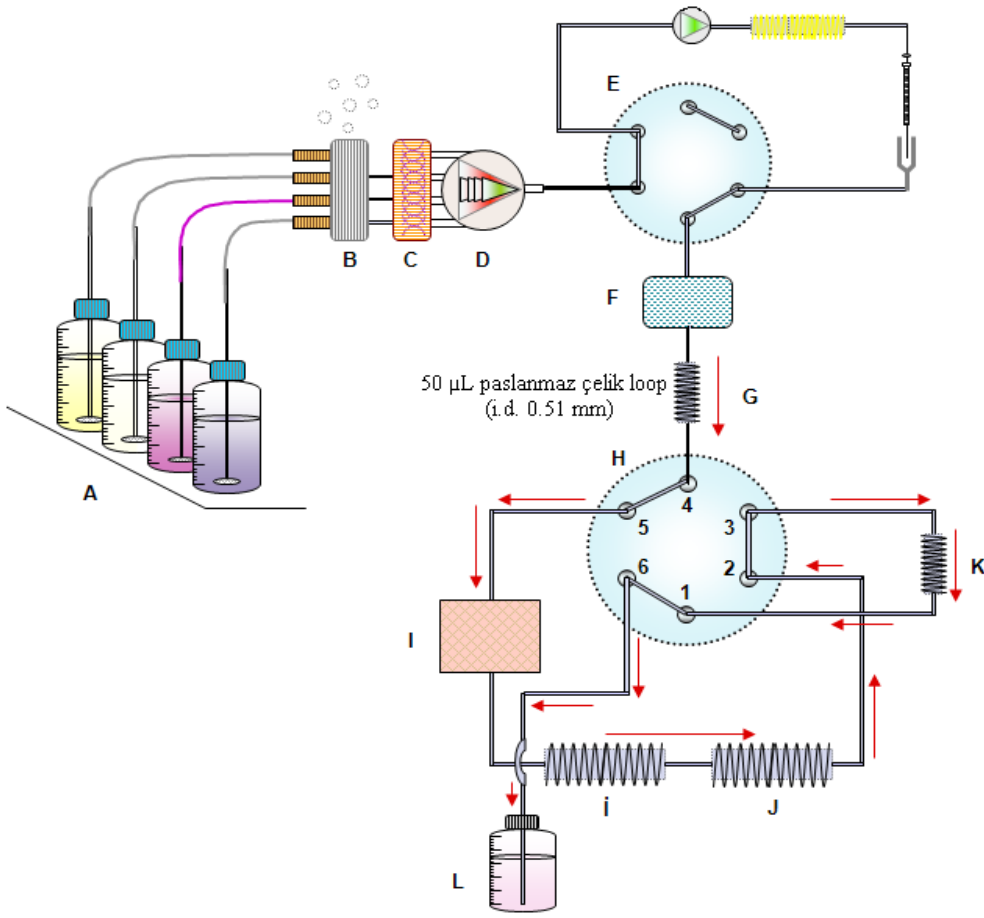
Yemeklik yağ numunelerinin %FFA içeriğini tespit amacıyla oluşturulan tek yollu FIA sistem monifoldu ve akış diyagramı **Şekil 1.**'de, numune enjeksiyonunun gerçekleştirildiği otomatik enjeksiyon bloğunun numune yükleme ve numune enjeksiyonu sırasındaki konumları da **Şekil 2**'de yer almaktadır. **Şekil 1.**'den görüleceği gibi; HPLC sistemi, çeşitli reaksiyon hücreleri ve bir yönlendirme valfi ile etkinleştirilerek FIA analizleri uygun bir hale getirilmiştir. Otomatik numune verici (**E**) ile sisteme enjekte edilen yağ numunesi hareketli faz yardımıyla sırasıyla termostatlı fırından (**F**) ve numune-reaktif karışım oranını artırmak için sisteme adapte edilen ticari reaksiyon hücresinden (**G**) geçirilerek istenilen reaksiyonun oluşması sağlanmıştır. %FFA tayinleri sırasında gerçekleşmesi istenilen reaksiyon oluşumu hızlı bir şekilde meydana geldiği için, oluşan reaksiyon karışımı ve analit miktarıyla orantılı bir sinyal elde edebilmek için direk dedektöre(**I**) gönderilmiştir. Şematize FIA sisteminde **I-J** ile belirtilen reaksiyon hücreleri,reaksiyon oluşumu yavaş gerçekleşen farklı yağ analizleri için kullanılmak üzere, (**K**) harfi ile gösterilen 50 µL paslanmaz çelik loop ise sistem bağlantılarını sağlamak ve sistemin HPLC olarak kullanılması istenildiğinde, analitik kolonu yerleştirmek amacıyla sisteme yerleştirilmiş ekipmanlardır.

2.4. Deneysel Şartlar

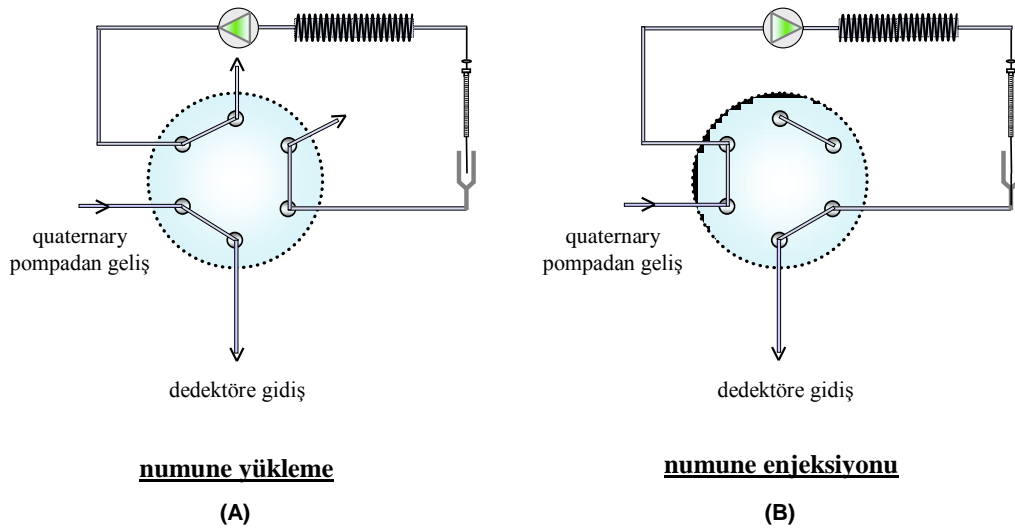
Yemeklik yağlardaki %FFA içeriğinin FIA yöntemi ile tespitini amaçlayan bu çalışma; %FFA içeriği 0.09-2.42 arasında değişen mısır yağı numuneleri kullanılarak taşıyıcı faz cinsi, taşıyıcı faz akış hızı (Ayyıldız ve ark., 2011), numune ve reaktif hacmi, reaksiyon hücresi (geometrisi ve iç hacmi), reaktif konsantrasyonu (KOH ve indikatör konsantrasyonu) ve sıcaklık (Ayyıldız ve Kara 2014)gibi birçok parametrenin optimize edildiği önceki çalışmalarımız sonucunda tespit edilen aşağıdaki şartlarda gerçekleştirilmiştir: taşıyıcı faz cinsi: n-propanol; taşıyıcı faz akış hızı: 2 mL dk⁻¹; numune ve reaktif hacmi: 30 µL reaktif // 1 µL numune // 30 µL reaktif; reaksiyon hücresi (geometrisi ve iç hacmi): sarmal, 50 µL; reaktif konsantrasyonu: 2.5x 10⁻³ M KOH + 25.0x 10⁻⁵ M PHP ve 7.5x 10⁻³ M KOH + 25.0x 10⁻⁵ M PHP (yer fıstığı yağı için), sıcaklık: 40°C. Görüldüğü üzere; optimize deney şartları, sadece yer fıstığı yağı için söz konusu küçük bir değişiklik dışında, çalışmada kullanılan tüm yağ numuneleri için kullanılabilir özelliktedir. Yer fıstığı yağının %FFA içeriğini tespit sırasında kullanılan reaktif konsantrasyonundaki bu farklılık, yer fıstığı yağının diğer yağlara kıyasla daha yüksek %FFA içeriğine sahip olmasından kaynaklanmaktadır. Deney sonuçlarının izlenmesinde DAD dedektör kullanılmış, etkin dalga boyu değeri olarak 580 nm seçilmiştir.

2.4. %FFA Tayini için Otomatikleştirilmiş FIA Prosedürü

n-propanolün taşıyıcı faz olarak kullanıldığı %FFA tayinlerinde; reaktif olarak, yine n-propanol içinde çözülerek hazırlanmış baz (KOH) ve indikatör (PHP) çözeltilerinin bir karışımı kullanılmıştır. Ayçiçeği, soya, kanola ve yer fıstığı yağı numuneleri ile gerçekleştirilen çalışmalarda, numune herhangi bir ön işleme tabi tutulmadan mikro litre düzeyinde direk olarak enjekte edilmiştir.



Şekil 1. Otomatik Enjeksiyonlu %FFA Tayininde Kullanılan Modifiye HPLC Sistemi **A:** taşıyıcı/çözücü tablası, **B:**degaz ünitesi, **C:** karıştırıcı, **D:**quaternary pompa, **E:** otomatik enjeksiyon portu, **F:** termostatlı kolon fırını, **G:** ticari 50 mL paslanmaz çelik loop (i.d. 0.51 mm), **H:** 2-pozisyon, 6-portlu valf, **I:** UV/DAD dedektör, **I-J:** 1 mL paslanmaz çelik loop (i.d. 0.76 mm), **K:** 50 µL paslanmaz çelik loop (i.d. 0.51 mm), **L:** Atık



Şekil 2. Otomatik Enjeksiyon Bloğunun (A) numune yükleme, (B) numune enjeksiyonu Sırasındaki Konumları

Ayrıca; kullanılan reaktif miktarını mikro seviyede tutmak ve oluşacak reaksiyonun istenilen düzeyde gerçekleşmesini sağlamak için de reaktif/numune/reaktif şeklinde bir enjeksiyon programı oluşturulmuştur. Sürekli akmakta olan taşıyıcı faz içinde belirli bir bölge (zone) oluşturan reaktif/numune/reaktif karışımı, gerek enjeksiyon programlaması gerekse sisteme adapte edilen reaksiyon hücresi sayesinde hızlı bir şekilde istenilen reaksiyonu oluşturmuş, bu sebeple düşük bir absorbansa sahip taşıyıcı faz (n-propanol) sinyalinde ani bir yükseliş gözlenmiştir. Sinyalde gözlenen bu yükselişin sebebi; yağ içindeki serbest yağ asitlerinin (FFA) reaktif çözeltisi içinde bulunan baz (KOH) ile meydana getirdiği reaksiyon sonucunda, kullanılan indikatörün sergilediği davranıştır (PHP indikatörü asidik ortamda renksiz, bazik ortamda pembe renklidir). Dedektörde gözlenen piklerin absorbans şiddeti; enjekte edilen yağ numunesinin hacmi, %FFA içeriği, reaktif konsantrasyonu ve reaktif hacmine bağlı olarak değişiklik göstermiştir. Yağ numunelerinin %FFA içerikleri tespit edilirken, elde edilen pozitif piklerin yükseklik (h), yarı pik genişliği (w) ve altında kalan alanlardan (A) faydalanılmıştır. Dedektörde gözlenen pikin şiddeti ve pik altında kalan alan, yağ numuneleri içerisinde bulunan %FFA miktarı ile ters orantılı olup; numune içindeki %FFA miktarı arttıkça gözlenen pikin absorbansı da o oranda azalmıştır.

2.5. Metod Validasyonu

%FFA tayini için geliştirilen/otomatikleştirilen FIA metodunun, belirlenen amaca uygunluğunu belirlemek amacıyla; *kesinlik, doğruluk, lineer bölge ve ölçüm aralığı, tayin limiti (LOD), ölçüm limiti (LOQ), seçicilik/spesifik olma ve sağlamlık* gibi validasyon parametreleri kullanılarak, önerilen metodun validasyonu sağlanmıştır. Validasyon çalışmalarında, belirli %FFA içeriğine sahip kanola yağı numuneleri kullanılmıştır.

2.6. Geliştirilen FIA Metodunun Standart Metotlarla Karşılaştırılması

%FFA tayini için önerilen FIA metodunun performansını ve kullanılabilirliğini tam olarak kanıtlayabilmek amacıyla; FIA metodu ile %FFA tayinlerinden elde edilen veriler, standart metotlardan elde edilen verilerle karşılaştırılmıştır. Metotların karşılaştırılmasında; öncelikle verilerin normal dağılıma uygun olup olmadığını belirlemek amacıyla Kolmogorov-Smirnov Testi uygulanmış, ardından metotlardan elde edilen veri gruplarının ortalama değerlerini (\bar{x}) karşılaştırmak amacıyla t testi, veri gruplarının varyans değerlerini (s^2) karşılaştırmak amacıyla da F testleri gerçekleştirilmiştir. Null ve alternatif hipotezler doğrultusunda yapılan testler; %95 güven seviyesinde ($p=0.05$), çift taraflı olarak gerçekleştirilmiş, hesaplanan t ve F değerleri, kritik t ve F değerleri ile karşılaştırılmıştır.

3. Araştırma Sonuçları ve Tartışma

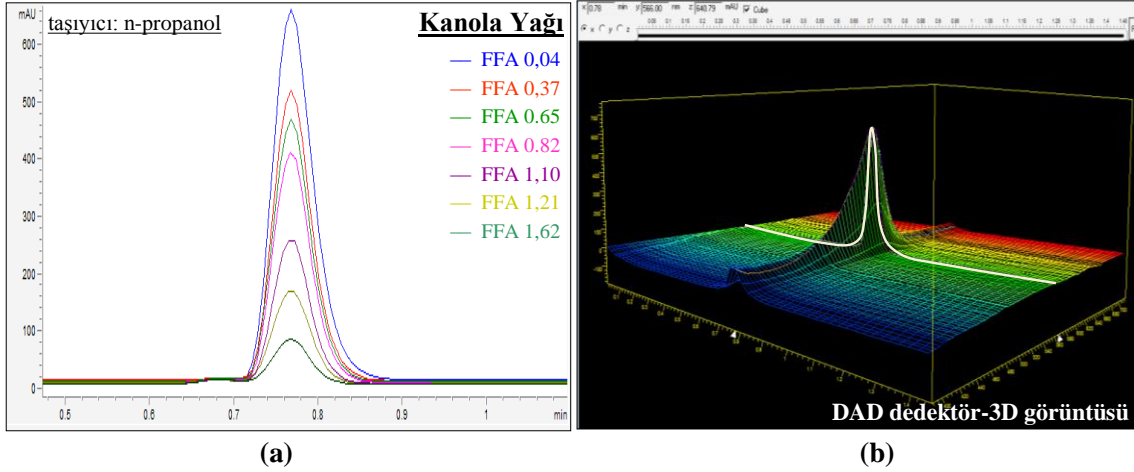
Standart metot ve FIA metodu kullanılmak suretiyle iki aşamalı olarak yürütülen %FFA tayinlerinde, standart metotlardan elde edilen veriler metot karşılaştırma çalışmalarında da kullanılmıştır. Standart AOCS Ca-5a-40 metodu ile, FIA deneylerinde WRMs niteliği taşıyan yağ numuneleri için tespit edilen %FFA miktarları **Tablo 2.**'de yer almaktadır.

Otomatik bir numune verici yardımıyla, yeni bir enjeksiyon tekniği kullanılarak yürütülen FIA çalışmalarında ise, **Tablo 2.**'de yer alan WRMs yağ numunelerini kullanarak her bir yağ türü için kalibrasyon grafiği oluşturulmuş, %FFA içeriği bilinmeyen yağ numunelerinin analizlerinde bu grafiklerin denklemlerinden faydalanılmıştır. Hem polinom hem de lineer denklemler kullanılarak çizilen kalibrasyon grafikleri yardımıyla, her bir yağ türü için lineer aralık değerleri de tespit edilmiştir.

Tablo 2. FIA Metodu ile %FFA Analizlerinde Çalışma Referans Materyali (WRMs) Olarak Kullanılan Yağ Numunelerinin %FFA Değerleri

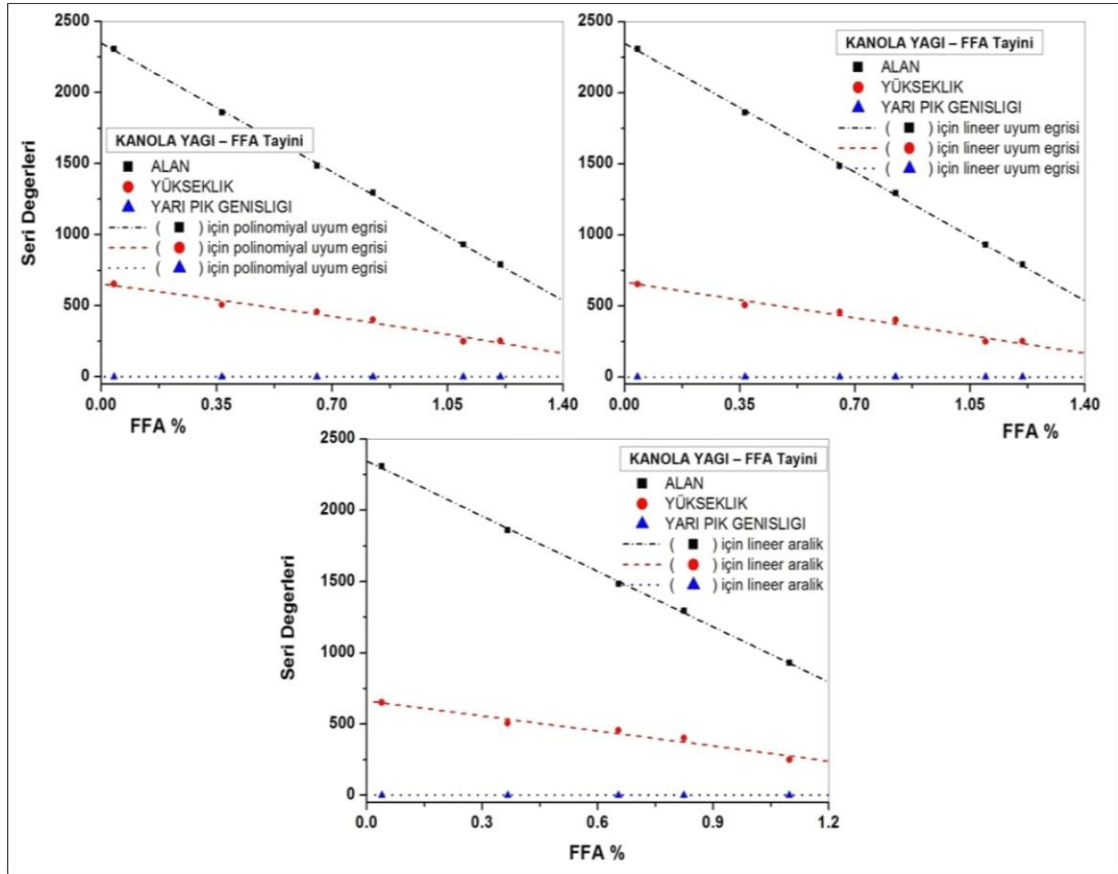
	Yağ Numuneleri			
	Soya	Ayçiçek	Kanola	Yer Fıstığı
%FFA Miktarı (% oleik asit)	$0.07 \pm 1.4 \times 10^{-3}$	$0.09 \pm 1.5 \times 10^{-2}$	$0.04 \pm 1.1 \times 10^{-3}$	$0.13 \pm 2.4 \times 10^{-3}$
	$0.29 \pm 4.9 \times 10^{-3}$	$0.49 \pm 2.7 \times 10^{-2}$	$0.37 \pm 2.3 \times 10^{-3}$	$1.13 \pm 4.5 \times 10^{-2}$
	$0.52 \pm 1.1 \times 10^{-2}$	$0.90 \pm 4.1 \times 10^{-2}$	$0.65 \pm 2.0 \times 10^{-3}$	$1.62 \pm 1.9 \times 10^{-2}$
	$0.75 \pm 1.6 \times 10^{-2}$	$1.30 \pm 4.1 \times 10^{-2}$	$0.82 \pm 5.1 \times 10^{-3}$	$2.51 \pm 1.2 \times 10^{-2}$
	$0.98 \pm 1.8 \times 10^{-2}$	$1.71 \pm 5.0 \times 10^{-2}$	$1.10 \pm 9.0 \times 10^{-3}$	$3.45 \pm 2.3 \times 10^{-2}$
	$1.21 \pm 2.1 \times 10^{-2}$	$2.11 \pm 5.8 \times 10^{-2}$	$1.21 \pm 1.3 \times 10^{-2}$	$4.95 \pm 3.0 \times 10^{-2}$
			$5.47 \pm 3.8 \times 10^{-2}$	

Örnek olması açısından, % oleik asit cinsinden FFA içeriği 0.04-1.62 arasında değişen kanola yağı numunelerinin enjeksiyonundan elde edilen pikler ve %FFA değeri $0.04 \pm 1.46 \times 10^{-3}$ olan kanola yağı numunesine ait 3D dedektör görüntüsü **Şekil 3.**'de verilmiştir. **Şekil 4.**'de ise söz konusu kanola yağı numunelerinin enjeksiyonundan elde edilen piklerin alan, yükseklik ve yarı pik genişliği değerleri kullanılarak çizilen polinomial ve lineer kalibrasyon grafikleri ile lineer aralık grafikleri yer almaktadır. Kanola yağının yanı sıra ayçiçek, soya ve yer fıstığı yağı numuneleri için de benzer şekilde oluşturulan grafiklere ait denklemler **Tablo 3.**'de verilmiştir. Bu denklemler yardımıyla, çalışmada WRMs olarak kullanılan yağ numunelerine ait FIA metodu ile tespit edilen %FFA değerleri **Tablo 4.**'de özetlenmiştir. Tablodan da görüleceği gibi, FIA metodu kullanılarak hesaplanan %FFA değerleri, standart metottan elde edilenlerle oldukça iyi bir uyum sergilemektedir.

**Şekil 3.** FFA İçeriği 0.04-1.62 Arasında Değişen Standart Kanola Yağı Numuneleri ile Gerçekleştirilen (a) %FFA Çalışmalarından Elde Edilen Pikler (b) %FFA: $0.04 \pm 1.46 \times 10^{-3}$ Olan Kanola Yağı Numunesine Ait DAD Dedektör-3D Görüntüsü

3.1. %FFA tayini için FIA metodunun valide edilmesi

%FFA tayinleri için geliştirilen FIA metodunun kullanılabilirliğini ve performansını kanıtlamak amacıyla, kanola yağı numuneleri kullanılarak gerçekleştirilen validasyon çalışmalarından elde edilen sonuçlar aşağıda yer almaktadır.



Şekil 4. Kanola Yağı Numuneleri ile %FFA Tayininden Elde Edilen Alan-%FFA Grafikleri

Taşıyıcı: n-propanol

Reaktif: 2.5×10^{-3} M KOH + 25.0×10^{-5} M PHP (n-propanol içinde)

Reaksiyon Hücresi: 50 μ L loop. Akış Hızı: 2 mL/dk

Numune Enjeksiyonu: 30 μ L Reaktif // 1 μ L Numune // 30 μ L Reaktif

Sıcaklık: 40°C

3.1.1. FIA Metodunun Doğruluğu

%FFA tayini için FIA metodunun doğruluğunun test edilmesinde; kalibrasyon eğrisinin aralıklarını kapsayan ve %FFA değerleri (%oleik asit cinsinden) 0.04-0.64-0.82 olan üç kanola yağı numunesi kullanılmış, beş tekrarlı deneylerden elde edilen sonuçların ortalamaları (X_i) ve gerçek %FFA değerleri (X_t) baz alınarak hesaplanan bağıl hata (E_r) yardımıyla FIA metodunun doğruluğu tespit edilmeye çalışılmıştır.

- %FFA: $0.0400 \pm 1.46 \times 10^{-3}$ olan kanola yağı numuneleri ile gerçekleştirilen deneyler sonucunda; $X_i = 0.0401$ (N=5)

$$\text{Bağıl Hata } (E_r) : E_r = \frac{0.0401 - 0.0400}{0.0400} \times 100 \rightarrow E_r = 0.20$$

Tablo 3. Ayçiçek, Soya, Kanola ve Yer Fıstığı Yağları için %FFA Tayini Çalışmalarından Elde Edilen %FFA–Seri Değerleri Grafiklerine Ait Denklemler ve Korelasyon Katsayıları

YAĞLAR	SERİLER	GRAFİK DENKLEMLERİ		
		lineer denklemi	polinom denklemi	lineer aralık denklemi (0.09-0.90 %FFA)
AYÇİÇEK	Alan	$y = -1192.8x + 2530.3$ $R^2 = 0.9131$	$y = -273.16x^2 - 591.83x + 2329.6$ $R^2 = 0.9297$	$y = -331.27x + 2191.8$ $R^2 = 0.7522$
	Yükseklik	$y = -359.82x + 759.29$ $R^2 = 0.9179$	$y = -87.554x^2 - 167.21x + 694.95$ $R^2 = 0.9368$	$y = -109.02x + 658.25$ $R^2 = 0.9091$
	Yarı pik genişliği	$y = 0.0085x + 0.0459$ $R^2 = 0.5431$	$y = 0.0115x^2 - 0.0168x + 0.0543$ $R^2 = 0.8925$	$y = 0.0006x + 0.0509$ $R^2 = 0.172$
SOYA	Alan	$y = -1527x + 2331.5$ $R^2 = 0.9586$	$y = 890.04x^2 - 2657.3x + 2555.5$ $R^2 = 0.9948$	$y = -2018.5x + 2489.6$ $R^2 = 0.9988$
	Yükseklik	$y = -465.55x + 716.84$ $R^2 = 0.9475$	$y = 299.85x^2 - 846.36x + 792.29$ $R^2 = 0.9911$	$y = -636.8x + 771.6$ $R^2 = 0.9989$
	Yarı pik genişliği	$y = -25.031x + 22.604$ $R^2 = 0.4286$	$y = 68.611x^2 - 112.17x + 39.867$ $R^2 = 0.7857$	$y = -52.561x + 31.431$ $R^2 = 0.5999$
KANOLA	Alan	$y = -1288.3x + 2345.3$ $R^2 = 0.9995$	$y = 50.842x^2 - 1352.9x + 2357.3$ $R^2 = 0.9997$	$y = -1288.3x + 2345.3$ $R^2 = 0.9995$
	Yükseklik	$y = -345.53x + 661.98$ $R^2 = 0.9744$	$y = -30.026x^2 - 307.37x + 654.9$ $R^2 = 0.9753$	$y = -345.53x + 661.98$ $R^2 = 0.9744$
	Yarı pik genişliği	$y = -0.0031x + 0.0534$ $R^2 = 0.4476$	$y = 0.0073x^2 - 0.0123x + 0.0551$ $R^2 = 0.7434$	$y = -0.0031x + 0.0534$ $R^2 = 0.4476$
YER FISTIĞI	Alan	$y = -644.71x + 7621$ $R^2 = 0.9483$	$y = -67.485x^2 + 30.135x + 6203.8$ $R^2 = 0.9795$	$y = -458.2x + 6986.9$ $R^2 = 0.9768$
	Yükseklik	$y = -124.84x + 1744.7$ $R^2 = 0.9137$	$y = -19.954x^2 + 74.696x + 1325.7$ $R^2 = 0.9837$	$y = -76.32x + 1578.3$ $R^2 = 0.9326$
	Yarı pik genişliği	$y = -0.002x + 0.0677$ $R^2 = 0.8936$	$y = -0.0003x^2 + 0.0011x + 0.0613$ $R^2 = 0.9564$	$y = -0.0013x + 0.0652$ $R^2 = 0.8309$

- %FFA: $0.6500 \pm 1.46 \times 10^{-3}$ olan kanola yağı numuneleri ile gerçekleştirilen deneyler sonucunda; $X_i = 0.6571$ (N=5)

$$\text{Bağlı Hata } (E_r) : E_r = \frac{0.6571 - 0.6500}{0.6500} \times 100 \rightarrow E_r = 1.09$$

- %FFA: $0.8200 \pm 1.46 \times 10^{-3}$ olan kanola yağı numuneleri ile gerçekleştirilen deneyler sonucunda; $X_i = 0.8173$ (N=5)

$$\text{Bağlı Hata } (E_r) : E_r = \frac{0.8173 - 0.8200}{0.8200} \times 100 \rightarrow E_r = 0.33$$

olarak bulunmuştur. Bir metodun doğruluğundan bahsedilmesi için, tekrarlı deneyler sonucunda ölçülen ortalama değer, gerçek değer \pm %5 sınırı içinde olması gerekmektedir (Tunca ve İmamoğlu 2012). Sonuç olarak; elde edilen veriler, %FFA tayinleri için geliştirilen FIA metodunun doğruluğunu kanıtlamaktadır.

Tablo 4.WRMs olarak kullanılan yağ numunelerinin %FFA Tayini için FIA ve Standart Metotlardan Elde Edilen Sonuçların

Yağ Numuneleri	%FFA Değerleri (% oleik asit)	
	FIA metodu ile (N=5)	Standart metot ile (N= 5)
Soya	$0.07 \pm 1.4 \times 10^{-3}$	$0.08 \pm 1.0 \times 10^{-2}$
	$0.29 \pm 4.9 \times 10^{-3}$	$0.33 \pm 2.3 \times 10^{-2}$
	$0.52 \pm 1.1 \times 10^{-2}$	$0.50 \pm 1.2 \times 10^{-2}$
	$0.75 \pm 1.6 \times 10^{-2}$	$0.78 \pm 2.5 \times 10^{-2}$
	$0.98 \pm 1.8 \times 10^{-2}$	$0.96 \pm 4.0 \times 10^{-2}$
Ayçiçek	$1.21 \pm 2.1 \times 10^{-2}$	$1.22 \pm 5.7 \times 10^{-2}$
	$0.09 \pm 1.5 \times 10^{-2}$	$0.09 \pm 2.1 \times 10^{-2}$
	$0.49 \pm 2.7 \times 10^{-2}$	$0.52 \pm 3.3 \times 10^{-2}$
	$0.90 \pm 4.1 \times 10^{-2}$	$0.93 \pm 5.5 \times 10^{-2}$
	$1.30 \pm 4.1 \times 10^{-2}$	$1.38 \pm 5.0 \times 10^{-2}$
Kanola	$1.71 \pm 5.0 \times 10^{-2}$	$1.76 \pm 6.2 \times 10^{-2}$
	$2.11 \pm 5.8 \times 10^{-2}$	$2.14 \pm 6.7 \times 10^{-2}$
	$0.04 \pm 1.1 \times 10^{-3}$	$0.03 \pm 1.2 \times 10^{-2}$
	$0.37 \pm 2.3 \times 10^{-3}$	$0.38 \pm 1.3 \times 10^{-2}$
	$0.65 \pm 2.0 \times 10^{-3}$	$0.64 \pm 1.4 \times 10^{-2}$
Yer Fıstığı	$0.82 \pm 5.1 \times 10^{-3}$	$0.85 \pm 2.6 \times 10^{-2}$
	$1.10 \pm 9.0 \times 10^{-3}$	$1.11 \pm 3.2 \times 10^{-2}$
	$1.21 \pm 1.3 \times 10^{-2}$	$1.22 \pm 5.3 \times 10^{-2}$
	$0.13 \pm 2.4 \times 10^{-3}$	$0.10 \pm 1.8 \times 10^{-2}$
	$1.13 \pm 4.5 \times 10^{-2}$	$1.16 \pm 3.1 \times 10^{-2}$
Yer Fıstığı	$1.62 \pm 1.9 \times 10^{-2}$	$1.65 \pm 3.9 \times 10^{-2}$
	$2.51 \pm 1.2 \times 10^{-2}$	$2.55 \pm 4.5 \times 10^{-2}$
	$3.45 \pm 2.3 \times 10^{-2}$	$3.46 \pm 4.7 \times 10^{-2}$
	$4.95 \pm 3.0 \times 10^{-2}$	$4.92 \pm 5.3 \times 10^{-2}$
	$5.47 \pm 3.8 \times 10^{-2}$	$5.45 \pm 6.0 \times 10^{-2}$

3.1.2. FIA Metodunun Kesinlik ve Tekrarlanabilirliği

%FFA tayini için FIA metodunun kesinliğini test etmek için %FFA değeri $0.04 \pm 1.46 \times 10^{-3}$ olan kanola yağı numunesi kullanılmış ve beş tekrarlı deneylerle ard arda üç gün boyunca analiz edilen numune için elde edilen sinyaller istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Kesinliğin ölçüsü olan tekrarlanabilirliğin hesaplanmasında; standart sapma (s), bağıl standart sapma (RSD), varyans (s^2) ve varyasyon katsayısı (CV) terimleri kullanılmış, ayrıca her bir seri değeri için güven aralıkları (p: 0.05) belirlenmiştir.

Geliştirilen FIA metodu ile %FFA tayinleri için gün içi ve günler arası istatistiksel veriler **Tablo 5** de verilmiştir. Gün içi ve günler arası kesinlik çalışmaları sonucunda, özellikle %FFA hesaplamalarında dikkate alınan pik alanları için bulunan RSD değerleri ($RSD < \%1.0$), geliştirilen FIA metodunun ne kadar yüksek bir kesinliğe sahip olduğunu göstermektedir (Kırış ve Velioğlu 2013).

3.1.3. FIA Metodunun Tayin Limiti (LOD) ve Ölçüm Limiti (LOQ)

FIA yöntemi ile %FFA tayini için LOD ve LOQ değerleri hesaplanırken; %FFA çalışmalarında kullanılan her bir yağ numunesi için oluşturulan kalibrasyon grafikleri kullanılmış (Alan-%FFA) ve grafik denklemlerinin eğim ve kesim değerleri ile denklem için hesaplanan varyasyon katsayısı (CV) değerleri kullanılarak alanların ardından da %FFA değerlerinin standart sapmaları hesaplanmıştır. Hesaplanan standart sapma değerlerinin 3 katına tekabül eden %FFA değerleri LOD değeri ($3*s$), standart sapma değerlerinin 10 katına tekabül eden %FFA değerleri ise, LOQ değeri ($10*s$) olarak kabul edilmiştir. LOD ve LOQ değerlerinin tespitinde; her bir yağ türü için blank değerine (%FFA= 0) en yakın %FFA değerine sahip yağ numuneleri kullanılmış, numunelere ait %FFA değerleri aşağıda listelenmiştir:

- ayçiçek yağı ile %FFA tayini için → %FFA: $0.09 \pm 1.71 \times 10^{-3}$
- soya yağı ile %FFA tayini için → %FFA: $0.07 \pm 1.22 \times 10^{-3}$
- kanola yağı ile %FFA tayini için → %FFA: $0.04 \pm 1.46 \times 10^{-3}$
- yer fıstığı yağı ile %FFA tayini için → %FFA: $0.13 \pm 9.46 \times 10^{-3}$

Yukarıda belirtilen teknik kullanılarak, %FFA tayini için geliştirilen FIA yöntemi için “oleik asit cinsinden” hesaplanan LOD ve LOQ değerleri **Tablo 6.**'da yer almaktadır.

Tablo 6. Geliştirilen FIA Metodu ile %FFA Tayininde Yağ Numuneleri için Hesaplanan LOD ve LOQ Değerleri

Yağ Numuneleri	LOD	LOQ
Ayçiçek	5.60×10^{-3}	1.70×10^{-2}
Soya	4.03×10^{-3}	1.22×10^{-2}
Kanola	4.81×10^{-3}	1.46×10^{-2}
Yer Fıstığı	3.12×10^{-2}	9.46×10^{-2}

3.1.4. FIA Metodunun Seçiciliği/Spesifikliği

Bir metodun seçiciliğini artırmak, uygun çalışma koşullarının tespit edilmesi ile mümkündür (EURACHEM 1998). Bu amaçla doğrultusunda; geliştirilen FIA metodunun seçiciliğini artırmak için öncelikle uygun taşıyıcı faz bileşimi, akış hızı, sıcaklık, dalga boyu gibi deneysel şartlar belirlenmiş ve standart yağ numuneleri kullanılarak FIA yöntemi ile %FFA tayinleri için gerçekleştirilen çalışmalardan elde edilen piklerin alıkonma zamanları 0.625 ± 0.003 dk, olarak tespit edilmiştir. Daha sonraki safhalarda hazırlanıp, analiz edilen yağ ve/veya yağ karışımlarının analizlerinde de aynı alıkonma zamanları elde edilmiş ve bu alıkonma zamanlarında herhangi bir kirlilik veya yabancı pik gözlenmemiştir. Bu sebeple; %FFA tayini için FIA yöntemi özgünlük ve seçicilik kriterlerine uygun bulunmuştur.

Tablo 5. %FFA Tayinleri için Geliştirilen FIA Metodunun Kesinliğinin Tespiti Amacıyla %FFA: $0.04 \pm 1.46 \times 10^{-3}$ olan Kanola Yağı Kullanılarak Gerçekleştirilen Tekrarlanabilirlik Deneylerinden Elde Edilen Pikler ve İstatistiksel Değerler

Kanola Yağı %FFA Tayini için İstatistiksel Değerler %FFA: $0.04 \pm 1.46 \times 10^{-3}$	Gün İçi Kesinlik								
	1. gün (n=5)			2. gün (n=5)			3. gün (n=5)		
	Alan	Yükseklik	Yarı Pik Genişliği	Alan	Yükseklik	Yarı Pik Genişliği	Alan	Yükseklik	Yarı Pik Genişliği
Ortalama (\bar{x})	2311.98	655.72	0.06	2314.16	655.70	0.06	2314.02	649.24	0.06
Standart Sapma (s)	2.14	2.88	0.00	1.62	2.31	0.00	0.72	15.14	0.00
Bağıl Standart Sapma (RSD)	0.93	4.38	6.09	0.70	3.52	13.34	0.31	23.32	9.99
Standart Hata (SEM)	0.96	1.29	0.00	0.73	1.03	0.00	0.32	6.77	0.00
Varyans (s^2)	4.58	8.27	0.00	2.63	5.32	0.00	0.52	229.20	0.00
Varyasyon Katsayısı (CV)	0.09	0.44	0.61	0.07	0.35	1.33	0.03	2.33	1.00
Güven Aralığı (p: 0.05)	± 2.04	± 2.74	± 0.00	± 1.55	± 2.20	± 0.00	± 0.68	± 14.42	± 0.00

	Günler Arası Kesinlik		
	(n=15)		
	Alan	Yükseklik	Yarı Pik Genişliği
Ortalama (\bar{x})	2313.39	653.55	0.06
Standart Sapma (s)	1.81	8.91	0.00
% Bağıl Standart Sapma (RSD)	0.78	13.63	10.30
Standart Hata (SEM)	0.47	2.30	0.00
Varyans (s^2)	3.27	79.34	0.00
Varyasyon Katsayısı (CV)	0.08	1.36	1.03
Güven Aralığı (p: 0.05)	± 1.72	± 8.48	± 0.00

**PHP indikatörlü
Kanola Yağı – %FFA:0.04
günler arası tekrarlanabilirlik**

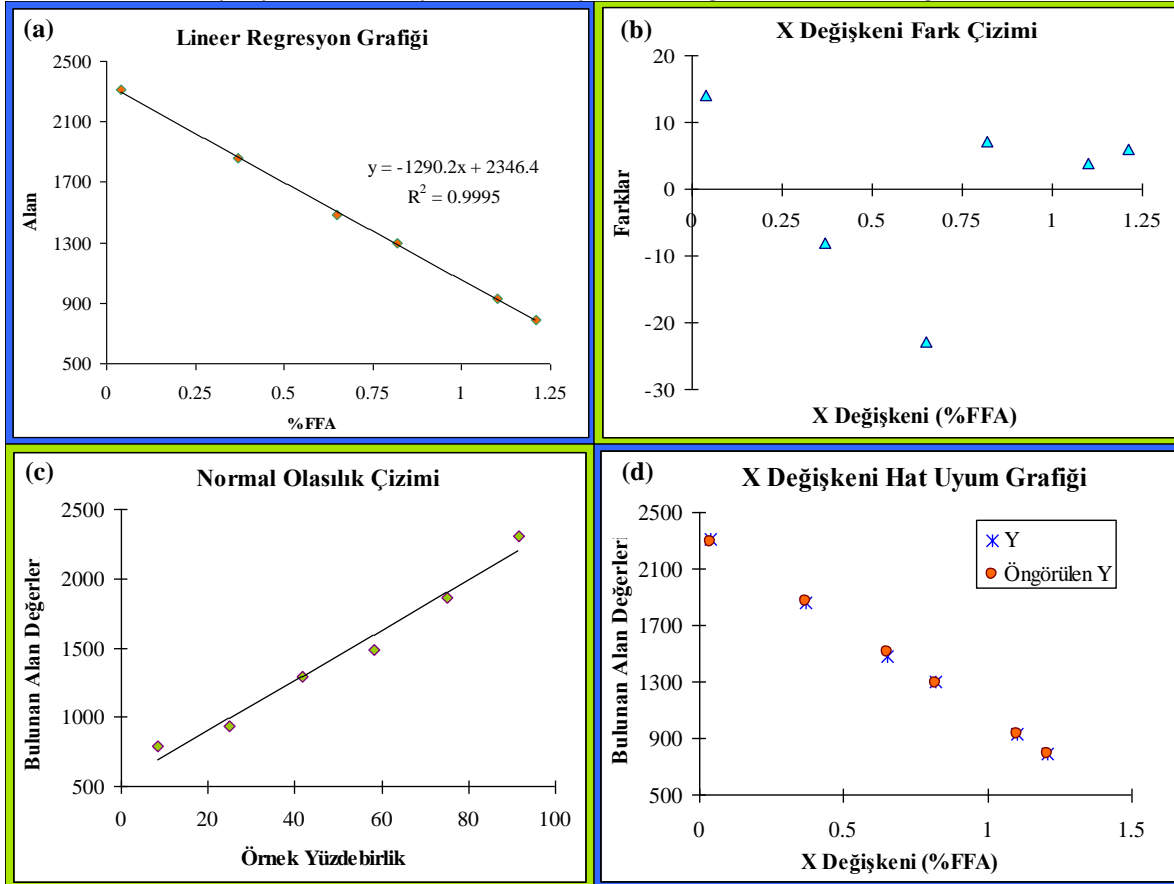
3.1.5. FIA Metodunun Doğrusallık ve Lineer Ölçüm Aralığı

%FFA tayini için geliştirilen FIA metodunun doğrusallık ve lineer ölçüm aralığının belirlenmesinde, her bir yağ cinsi için ayrı ayrı oluşturulan kalibrasyon grafiklerinden faydalanılmıştır. Örnek teşkil etmesi bakımından, kanola yağı WRMs kullanılarak tespit edilen doğrusallık ve lineer ölçüm aralığı sonuçları **Şekil 5.**'de ve **Tablo 7.**'de özetlenmiştir.

3.1.6. FIA Metodunun Sağlamlığı

Validasyon çalışmalarında sağlamlığın değerlendirilmesinin tek amacı; sistem uygunluk parametrelerinin incelenerek, analitik yöntem her uygulandığında yöntemin valide olduğunun kanıtlanmasıdır. Bir başka deyişle; sağlamlık testlerinden elde edilen bilgiler, yöntemin uygulanabilir olduğu koşulların tanımlanmasını sağlar. Sağlamlığın tespitinde kullanılan tipik varyasyon örneklerinden bazıları pH, sıcaklık, akış hızı vb.'dir.

FIA ile %FFA tayininde; taşıyıcı faz akış hızı, numune ve reaktif hacmi, reaksiyon hücresi, sıcaklık gibi birçok parametrenin %FFA tayini üzerine etkileri incelenmiş ve incelemeler sırasında FIA yönteminin tekrarlanabilirlik, doğrusallık gibi önemli validasyon parametrelerini sağladığı belirlenmiştir. Dolayısıyla; %FFA tayini için FIA yöntemi sağlamlık açısından güvenilir bulunmuştur.



Şekil 5. %FFA: 0.04-1.21 Aralığında Kanola Yağı Numuneleri Kullanılarak FIA ile PHP İndikatörlü %FFA Tayini için Metodun Doğruluğunun Belirlenmesinde Kullanılan Grafikler (a) Lineer Regresyon Grafiği, (b) %FFA Fark Çizimi, (c) Normal Olasılık Çizimi, (d) %FFA Hat Uyum Grafiği

3.1.7. FIA Metodunun Hassasiyeti

%FFA tayini için FIA metodunun hassasiyeti; çalışmada kullanılan yağ cinslerinin her biri için çizilen kalibrasyon grafikleri ve elde edilen grafik denklemleri (**bkz Tablo 3.**) yardımıyla, kalibrasyon hassasiyeti (m) hesaplanarak değerlendirilmiştir. Buna göre geliştirilen FIA metodunun, kullanılan yağ türleri arasında soya yağının %FFA tayini için daha hassas olduğu söylenebilir. Geliştirilen FIA

yönteminin, %FFA tayinlerinde en az hassas olduğu yağ türü ise yer fıstığıdır.

3.2. %FFA Tayini için FIA Metodunun Standart Metotlarla Karşılaştırılması

Önerilen bir metodun kullanılabilirlik kazanabilmesi için, metodun performansını ve üstünlüğünü gösteren validasyon çalışmalarının gerçekleştirilmesi, bunun yanı sıra yeni metodun, daha önce kullanımda olan standart metotlarla istatistiksel olarak karşılaştırılması gerekmektedir. Bu sebeple; bitkisel yağlardaki %FFA içeriğinin tespiti için geliştirilen FIA yöntemi valide edildikten sonra, %FFA tayinleri için şimdiye kadar kullanılmakta olan standart metotlarla istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

%FFA tayini için FIA ve standart metot karşılaştırması yapılırken, t ve F testleri dikkate alınmış ve istatistiksel hesaplamaların gerçekleştirilmesinde SPSS Inc. 16.0, XLSTAT 2010, statistiXL gibi programlardan faydalanılmıştır. Farklı %FFA değerine sahip 10 adet kanola yağı numunesi için FIA ve standart metotlar kullanılarak yürütülen tayinlerden elde edilen verilerden faydalanılarak gerçekleştirilen t ve F testlerine geçilmeden önce Kolmogorov-Smirno testi ile verilerin normal dağılıp dağılmadığı kontrol edilmiş, daha sonra bağımsız iki örnek-t testi ve F testleri uygulanmıştır.

Sırasıyla, karşılaştırılan yöntemlerle elde edilen veri gruplarının ortalama değerleri (\bar{x}) ve varyans değerleri göz önünde bulundurularak gerçekleştirilen t ve F testleri, Null ve alternatif hipotezler temelinde, %95 güven seviyesinde (p=0.05) çift taraflı olarak gerçekleştirilmiş ve hesaplanan t ve F değerleri, kritik t ve F değerleri ile karşılaştırılmıştır.

3.2.1. t Testi

%FFA tayinleri için FIA ve standart metotlardan elde edilen iki bağımsız gruba ait ortalama değerlerinin karşılaştırılmasında; öncelikle tanımlayıcı istatistiksel değerler tespit edilmiş, daha sonra **Eşitlik 2.** ve **Eşitlik 3.** yardımıyla t değeri hesaplanmıştır. t değerinin hesaplanmasından sonra ise; serbestlik derecesine göre oluşturulmuş tablolardan kritik t ve F değerleri bulunmuş ve hesaplanan değerlerle karşılaştırılarak, hipotezlerden hangisinin uygun olduğuna karar verilmiştir.

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{s_b \sqrt{\frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2}}} \text{ Eşitlik 2.}$$

$$s_b = \sqrt{\frac{(N_1 - 1)s_1^2 + (N_2 - 1)s_2^2}{N_1 + N_2 - 2}} \text{ Eşitlik 3.}$$

t: deneysel verilerden hesaplanan t değeri

\bar{X}_1 : 1. metottan elde edilen verilerin ortalama değeri

\bar{X}_2 : 2. metottan elde edilen verilerin ortalama değeri

s_b : birleşik standart sapma

N_1 : 1. gruptaki veri sayısı

N_2 : 2. gruptaki veri sayısı

FIA ve standart metotlar kullanılarak gerçekleştirilen tayinlerden elde edilen verilerin karşılaştırılmasında aşağıdaki null (H_0) ve alternatif (H_A) hipotezleri kullanılmıştır (Kayri 2009).

$$H_0: \bar{X}_1 = \bar{X}_2$$

$$H_A: \bar{X}_1 \neq \bar{X}_2$$

Oluşturulan hipotezlere göre; H_0 , FIA ile standart metot verilerine ait ortalamalar arasında anlamlı olarak (%95 güven seviyesinde) bir fark olmadığını ileri sürerken, H_A , FIA ile standart metot verilerine ait ortalamalar arasında anlamlı bir fark olduğunu savunmaktadır.

Tablo 7. %FFA Tayinleri için Geliştirilen FIA Metodunun Doğrusallığının Tespiti Amacıyla %FFA: 0.04 -1.21 ± 1.46x10⁻³ Aralığında Kanola Yağı Numuneleri Kullanılarak Gerçekleştirilen Deneylerinden Elde Edilen Pikler ve Doğrusallık Hesaplamalarından Elde Edilen İstatistiksel Değerler

FIA ile PHP İndikatörlü %FFA Tayininde Doğrusallık Hesapları						Kanola Yağı – PHP’li %FFA: 0.04-1.21 doğrusallık	
Regresyon İstatistikleri							
Gözlem Sayısı (N)	6						
Eğim (a)	-1290.2						
Kesim (b)	2346.4						
Regresyon Katsayısı (r)	0.9997						
Belirlilik Katsayısı (R ²)	0.9995						
Standart Hata (SEM)	14.91						
ANOVA	df						
Regresyon	1.00	1633870.84	1633870.84	7347.51	Yüzdebirlik	Y (Alan)	
Fark (artık)	4.00	889.48	222.37		8.33	791.20	
Toplam	5.00	1634760.32			25.00	931.00	
Regresyon Katsayıları	Katsayılar	Standart Hata	t Stat	P-değeri			
Kesim	2346.41	12.15	193.17	0.00	41.67	1295.60	
X Değişkeni (PV)	-1290.23	15.05	-85.72	0.00	58.33	1484.80	
Fark (artık) Değerleri	Gözlem	Öngörülen Y (Alan)	Farklar (artık)	Standart. Farklar (artık)	75.00	1861.00	
	1	2294.80	14.00	1.05	91.67	2308.80	
	2	1869.03	-8.03	-0.60			
	3	1507.76	-22.96	-1.72			
	4	1288.42	7.18	0.54			
	5	927.16	3.84	0.29			
	6	785.23	5.97	0.45			

İki metottan elde edilen deneysel verilerin kullanılmasıyla, çift taraflı olarak hesaplanan $\left(\frac{N-1}{p} = 0.025\right)$ dikkate alınarak) ***t* değeri: 1.59** olarak, ***kritik t değeri (tablodan) ise 2.78*** olarak belirlenmiştir ($p=0.05$). Çift taraflı *p* değeri ise; 0.16 olarak hesaplanmıştır. Yukarıdaki bilgiler doğrultusunda, %95 güven seviyesinde H_0 hipotezinin reddedilemeyeceği açıkça görülmektedir. Şöyle ki; $t_{\text{hesaplanan}} : 1.59 < t_{\text{kritik}} : 2.78$ olduğundan hesaplanan *t* değeri, dağılım grafiğinde kabul bölgesine düşmektedir. Aynı durum, *p* değeri dikkate alındığında da geçerlidir. Bu sebeple; $\bar{X}_1 = \bar{X}_2$ olduğunu ileri süren H_0 hipotezi reddedilemez, yani; FIA ve standart metotlardan elde edilen veri gruplarının ortalaması birbirinden anlamlı olarak farklı değildir.

3.2.2. F Testi

Varyans analizi temelinde gerçekleştirilen ve iki farklı yöntemin (metodun) kesinliklerinin karşılaştırılması amacıyla kullanılan F testinde; metotlardan elde edilen veri gruplarının varyansları oranlanır ve belirlenen güven seviyesinin (olasılık fonksiyonu) dikkate alınmasıyla tespit edilen kritik F değeri ile karşılaştırılır.

Bu amaçla; *t* testinde olduğu gibi F testi için de iki hipotez ileri sürülmüş, bunlardan sıfır (null) hipotezinde; FIA ve standart metotlardan elde edilen veri gruplarının varyans değerleri $p=0.05$ olasılık düzeyinde (%95 güven seviyesinde) eşit kabul edilirken, alternatif hipotezde bu eşitliğin söz konusu olmadığı söylenmiştir (Kayri 2009).

$$H_0: s_1^2 = s_2^2$$

$$H_A: s_1^2 \neq s_2^2$$

FIA ve standart metotlardan elde edilen deneysel verilerin kullanılmasıyla, çift taraflı olarak hesaplanan F değeri: 0.23 olarak, kritik F değeri (tablodan) ise 15.44 olarak belirlenmiştir ($p=0.05$). Çift taraflı *p* değeri ise; 0.27 olarak hesaplanmıştır.

Buna göre; %95 güven seviyesinde H_0 hipotezinin reddedilemeyeceği açıkça görülmektedir. Şöyle ki; $F_{\text{hesaplanan}} : 0.23 < F_{\text{kritik}} : 15.44$ olduğundan hesaplanan F değeri, dağılım grafiğinde kabul bölgesine düşmektedir. Aynı durum, *p* değeri dikkate alındığında da geçerlidir. Bu sebeple; $s_1^2 = s_2^2$ olduğunu ileri süren H_0 hipotezi reddedilemez, yani; FIA ve standart metotlardan elde edilen veri gruplarının varyansları birbirinden anlamlı olarak farklı değildir.

t ve F testleri kullanılarak yapılan karşılaştırmalar neticesinde; geliştirilen FIA metodu kullanılarak elde edilen verilerle, standart metottan elde edilen veriler arasında anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir.

Sonuç olarak; bitkisel yağlardaki %FFA tayini için yeni bir metot geliştirmeyi amaçlayan bu çalışma ile; genellikle sulu çözeltiler için kullanılan FIA metodunun, susuz ortam reaksiyonları gerektiren yağ analizleri için de uygulama kazanması sağlanmış, standart metotlarla sağlanamayan deneysel ortam şartları, oluşturulan izole sistem sayesinde rahatlıkla sağlanabilmiş, yağ numuneleri herhangi bir ön işlemten geçirilmeksizin, direk olarak sistem içine enjekte edilmiş, deneylerde kullanılan numune ve reaktif miktarları mikrolitre seviyesinde tutulmuş, numune ve reaktiflerin sisteme gönderilmesi/enjekte edilmesi sırasında taşıyıcı faz olarak kullanılan çözücü ve/veya çözeltilerin sarfiyatını azaltmak amacıyla; numune verici devreye girdiğinde, akış hızı otomatik olarak sıfırlanmaya programlanmış ve oluşturulan sistem bağlantı uzunlukları gerekli ölçülerde kullanıldığından, zamandan ve çözücü/çözelti sarfiyatından tasarruf edilmiştir.

Dolayısıyla; bitkisel yağlardaki %FFA tayini için tarafımızdan geliştirilen FIA metodu, hızlı, basit, çevre dostu ve düşük maliyetli bir metot olması ve standart metotla oldukça iyi bir uyum sergilemesi bakımından standart metotlara alternatif olarak kullanılabilir bir özelliğe sahiptir. Ayrıca; yağ sanayi sektörü ve analitik kimya açısından son derece önemli bir gelişme olduğu düşünülen bu çalışmanın, ülkemizdeki tüm bitkisel yağ sanayi sektörü için yol gösterici olacağına inanılmaktadır.

Teşekkür

Bu çalışma, Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından, 2008-101029 Nolu proje ile desteklenmiştir.

Kaynaklar

- AOCS, 2004. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society, III. AOCS (Method Cd 8-53 and Ca 5a-40). In. Eds, 5th edn.: Champaign, p.
- Armenta S, Garrigues S, de la Guardia M, 2007. Determination of edible oil parameters by near infrared spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 596, 2, 330-337.
- Ayyıldız HF, 2010. Otomatikleştirilmiş Akış Enjeksiyon Sistemleriyle Yağ Analiz Metotlarının Geliştirilmesi, Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi, Konya.
- Ayyıldız HF, Kara H, 2014. A Highly Efficient Automated Flow Injection Method for Rapid Determination of Free Fatty Acid Content in Corn Oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 91, 4, 549-558.
- Ayyıldız HF, Kara H, Sherazi STH, 2011. A Novel Approach for Determination of Free Fatty Acids in Vegetable Oils by a Flow Injection System with Manual Injection. *Lipids*, 46, 12, 1181-1190.
- Ballesteros E, Gallego M, Valcárcel M, 1995. Simultaneous determination of sterols in edible oils by use of a continuous separation module coupled to a gas chromatograph. *Analytica Chimica Acta*, 308, 1-3, 253-260.
- Bernardini E, 1973. In: *New Oil and Fat Technology*. Eds: Colucci V, 2nd Ed. . Rome: Technology, p. 423-467.
- Cañizares MP, Tena MT, De Castro MDL, 1996. On line coupling of a liquid-liquid extraction flow-reversal system to a spectrophotometric flow-through sensor for the determination of polyphenols in olive oil. *Analytica Chimica Acta*, 323, 1-3, 55-62.
- Che Man YB, Setiowaty G, 1999. Application of Fourier transform infrared spectroscopy to determine free fatty acid contents in palm olein. *Food Chemistry*, 66, 1, 109-114.
- EC, (1991). Official Journal of the Commission of the European Communities, Regulation No 2568/91, L 248.
- Ekstrom LG, 1981. An automatized method for determination of free fatty acids. *J Am Oil Chem Soc*, 58(10), 935-938.
- EURACHEM, (1998). The Fitness for purpose of analytical methods a laboratory guide to method validation and related topic.
- Kanya TCS, Rao LJ, Sastry MCS, 2007. Characterization of wax esters, free fatty alcohols and free fatty acids of crude wax from sunflower seed oil refineries. *Food Chemistry*, 101, 4, 1552-1557.
- Kayri M, 2009. Araştırmalarda Gruplar Arası Farkın Belirlenmesine Yönelik Çoklu Karşılaştırma (Post-Hoc) Teknikleri. *Fırat Üniversitesi Sosyal Bilimler Dergisi*, 19, 1, 51-64.
- Kırış S, Velioglu YS, 2013. Zeytin ve Zeytinyağı Örneklerinde Pestisit Kalıntılarının Belirlenmesi için Bir Metot Çalışması. *Gıda*, 38 (3), 151-158.
- Klampfl CW, Buchberger W, Haddad PR, 2000. Determination of organic acids in food samples by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 881, 1-2, 357-364.
- Korkut AY, Kop A, Demir P, 2007. Balık Yemlerinde Kullanılan Balık Yağı ve Özellikleri. *E.Ü. Su Ürünleri Dergisi*, 24, 1-2, 195-199.
- Labrinea EP, Thomaidis NS, Georgiou CA, 2001. Direct olive oil anisidine value determination by flow injection. *Analytica Chimica Acta*, 448, 1-2, 201-206.
- Li G, You J, Suo Y, Song C, Sun Z, Xia L, Zhao X, Shi J, 2011. A developed pre-column derivatization method for the determination of free fatty acids in edible oils by reversed-phase HPLC with fluorescence detection and its application to *Lycium barbarum* seed oil. *Food Chemistry*, 125, 4, 1365-1372.
- Mariotti E, Mascini M, 2001. Determination of extra virgin olive oil acidity by FIA-titration. *Food Chemistry*, 73, 2, 235-238.
- Mesa JAG, Linares P, Luque de Castro MD, Valcárcel M, 1990. Direct automatic determination of polyphenols in olive oils in the aqueous phase of a flow-injection liquid-liquid extraction system without phase separation. *Analytica Chimica Acta*, 235, 0, 441-444.
- Nouros PG, A. Georgiou C, Polissiou MG, 1999. Direct parallel flow injection multichannel spectrophotometric determination of olive oil peroxide value. *Analytica Chimica Acta*, 389, 1-3, 239-245.
- Nouros PG, Georgiou CA, Polissiou MG, 1997. Automated flow injection spectrophotometric non-aqueous titrimetric determination of the free fatty acid content of olive oil. *Analytica Chimica Acta*, 351, 1-3, 291-297.
- Osawa CC, Gonçalves LAG, Ragazzi S, 2007. Correlation between free fatty acids of vegetable oils evaluated by rapid tests and by the official method. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 6, 523-528.

DETERMINATION OF FREE FATTY ACID LEVELS IN EDIBLE OILS BY DEVELOPED FLOW INJECTION ANALYSIS METHOD AS AN ALTERNATIVE TO THE STANDARD METHOD

- Pérez-Ruiz T, Martínez-Lozano C, Tomás V, Val O, 1993. Fluorimetric flow-injection determination of hydroperoxides in foodstuffs. *Food Chemistry*, 46, 3, 301-305.
- Pineiro Avila G, de la Guardia M, 1997. Enzymic Determination of Peroxides in Non-aqueous Media. *Analyst*, 122, 12, 1543-1547.
- Pinto PCAG, Saraiva MLMFS, Lima JLFC, 2006. A flow sampling strategy for the analysis of oil samples without pre-treatment in a sequential injection analysis system. *Analytica Chimica Acta*, 555, 2, 377-383.
- Saad B, Ling CW, Jab MS, Lim BP, Mohamad Ali AS, Wai WT, Saleh MI, 2007. Determination of free fatty acids in palm oil samples using non-aqueous flow injection titrimetric method. *Food Chemistry*, 102, 4, 1407-1414.
- Saygın A, 1988. Deoderizasyon Şartlarının Pamuk Yağının Özelliklerine Etkileri, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, Bornova, İzmir.
- Tan C-H, Ghazali HM, Kuntom A, Tan C-P, Ariffin AA, 2009. Extraction and physicochemical properties of low free fatty acid crude palm oil. *Food Chemistry*, 113, 2, 645-650.
- Thomaidis NS, Georgiou CA, 1999. Edible oil analysis by flow injection. *Laboratory Automation & Information Management*, 34, 2, 101-114.
- Thomaidis NS, Georgiou CA, 2000. Direct parallel flow injection multichannel spectrophotometric determination of olive oil iodine value. *Analytica Chimica Acta*, 405, 1-2, 239-245.
- Toyo'oka T, 2002. Fluorescent tagging of physiologically important carboxylic acids, including fatty acids, for their detection in liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 465, 1-2, 111-130.
- Tunca A, İmamoğlu E, 2012. Sibutramin'in GC-FID Kromatografisi Metodu ile Farmasötik Preparatlarda Miktar Tayini SAÜ Fen Edebiyat Dergisi.
- Velasco-Arjona A, Luque de Castro MD, 1998. A fully robotic method for the determination of acid values in olive oil without titration. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75, 12, 1849-1853.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL DERGİLER KOORDİNATÖRLÜĞÜ
SELÇUK UNIVERSITY
COORDINATION UNIT OF SCIENTIFIC JOURNALS
© 2015 Reproduction is free for scientific studies