

HPLC İLE MEYVE SUYU ANALİZLERİ ve BAZI UYGULAMA ÖRNEKLERİ



Yük. Kimyager Ömer H. Turmuş
Aplikasyon Uzmanı - Ant Teknik Cihazlar

Gıda, ilaç, kozmetik vb. endüstrilerde hammaddenin ve üretimin belirlenen standartlara uygun olup olmadığının kontrolü için bir takım analizlere ihtiyaç duyulmaktadır. Örnek olarak ilaç endüstrisinde, ilaçların kalitesini doğrudan etkileyen ilaç etken maddeler, koruyucu maddeler ve safsızlıkların miktar tayin analizleri için, gıda endüstrisinde ise aflatoksin, koruyucu, tatlandırıcı, renklendirici, vitamin vb. analizlerde sıvı kromatografik yöntemler yaygın olarak kullanılmaktadır. Analitik laboratuvarlarda sıkça kullanılan ve sıvı kromatografisi yönteminin özel bir uygulaması olan Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) yöntemi, uygun bir çözücü içerisinde çözülmüş maddelerin, bir kolon içerisinde bulunan sabit faz ile farklı etkileşimlere girerek, kolon içinde ilgi farklılığının sonucu olarak değişik hızlarda ilerlemesi temeline dayanır. Bu yöntem gıda analizlerinde sıklıkla uygulama alanı bulmaktadır. Meyve ve sebzeler, günlük hayatımızda doğrudan veya meyve suyu, reçel veya konserve şeklinde işlenmiş olarak da tüketilebilen gıdalardır. Bu geniş kullanım alanı içerisinde, meyve suları buldukları meyve oranına göre meyve suyu, meyve nektarı, meyveli ve aromalı içecek olarak sınıflandırılmaktadır. Vücudun



Shimadzu Prominence serisi Yüksek Performanslı Sıvı Kromatograf (HPLC)

sıvı ihtiyacını gideren meyve sularının, içerisinde bulunan zengin antioksidan, vitamin ve mineraller sayesinde sağlıklı beslenme konusunda önemli bir yeri bulunmaktadır. Öte yandan, bu meyve ve sebzelerin yetiştirme ve işleme sırasında ya da işlendikten sonra maruz kaldığı etkilerin tespiti bir dizi analitik tekniğin kullanımını gerektirmektedir. Ant Teknik olarak, meyve ve meyve sularında Patulin, HMF, fumarik asit, laktik asit, pestisit, etanol ve fenolik madde vb. analizlerin kromatografik şartlar altında uygulanması konusunda teknik destek sağlamaktayız. Bu makalede HPLC yöntemi ile gerçekleştirilen iki uygulama örneğine yer verilecektir.

HPLC Uygulama Örneği – 1: İşlenmiş meyve ve ürünlerinde patulin ve HMF miktarlarının tespiti

İşlenmiş meyve ve meyve sularında oluşan ve toksik etkisi nedeniyle belirli bir limitin üzerinde olmaması gereken patulin analizi yapılması gereken en önemli analizlerden biri olarak kabul edilmektedir. Kanser araştırma merkezleri patulinin akut, toksik, kanserojen ve mutajen etkileri olan bir bileşen olduğunu yönünde araştırmalar yürütmektedir. Kısa dönemdeki etkileri alınan doza bağlı olan Patulin elmada, hububatta, ekmekte, peynirde, armut, kayısı, şeftali ve üzümde bulunabilir. Özellikle elma sularında çok sık görülen Patulin miktarı işlenmiş meyve ve ürünlerinde ürünün kalitesini belirlemektedir. Elma suyu durultmada ve filtrasyonda kullanılan yardımcı maddeler ve bunların kombinasyonu patulin miktarını

etkilemektedir (1). Meyvenin işlenmesi sırasında patulin miktarı kabul edilebilir sınırlara kadar düşürülmelidir.

Bazı ülkeler meyve suyu ve diğer meyve ürünlerinde patulin düzeyini 20-50 ppb olarak belirlemişlerdir. Dünya Sağlık Örgütü ise elma suyunda patulin düzeyini 50 ppb olarak belirlemiş olup, bu limitin üzerinde patulin içeren ürünlerin satışını kabul etmemektedir. Meyve suyunun ısıtma işlem görmesi nedeniyle indirgen şeker ve aminoasitlerin tepkimeye girmesi sonucunda HMF (hidroksimetilfurfural) meydana gelmektedir.

METOD VE MATERYALLER:

Çalışma Shimadzu marka Prominence serisi HPLC cihazıyla yapılmıştır.

REFERANSLAR

- » GÖKMEN, V., ARTIK, N. ve ACAR, J. 2001. Effects of various clarification treatments on patulin, phenolic compound and organic acid compositions of apple juices. European Food Research Int. 213:194-199.
- » Ant Teknik Shimadzu LC Aplikasyon Notu, L011 - HPLC ile Meyve Sularında Patulin ve HMF Tayini
- » Ant Teknik Shimadzu LC Aplikasyon Notu, L012 - HPLC ile Meyve Sularında Fumarik Asit ve Laktik Asit Tayini

Ekstraksiyon Yöntemi:

Ayırma hunisinde gerçekleştirilen faz ayrılması ve filtrasyon aşamalarından sonra elde edilen örnek, rotary evaporatörde belirli sıcaklık ve basınçta evapore edilir.

Azot gazı yardımıyla örnek kurutulur.

Kuru balona belirli miktar ve pH'ta ultra saf su ilave edilir. Elde edilen kalıntı, vial pipet yardımıyla aktarılır. Böylece, örnek hazırlama işlemi tamamlanır.

Hesaplama:

Standart karışım kullanılarak eksternal standart yöntemine göre 11,2° Briks'teki Patulin ve HMF Miktarı tayini yapılmaktadır.

ANALİTİK KOŞULLAR:

Cihaz : Shimadzu Prominence-20 HPLC

Kolonlar : GL Sciences Inertsil ODS-3 (250 mm x 4.6mm x 5 um)

Kolon Fırın Sıcaklığı: 25 °C

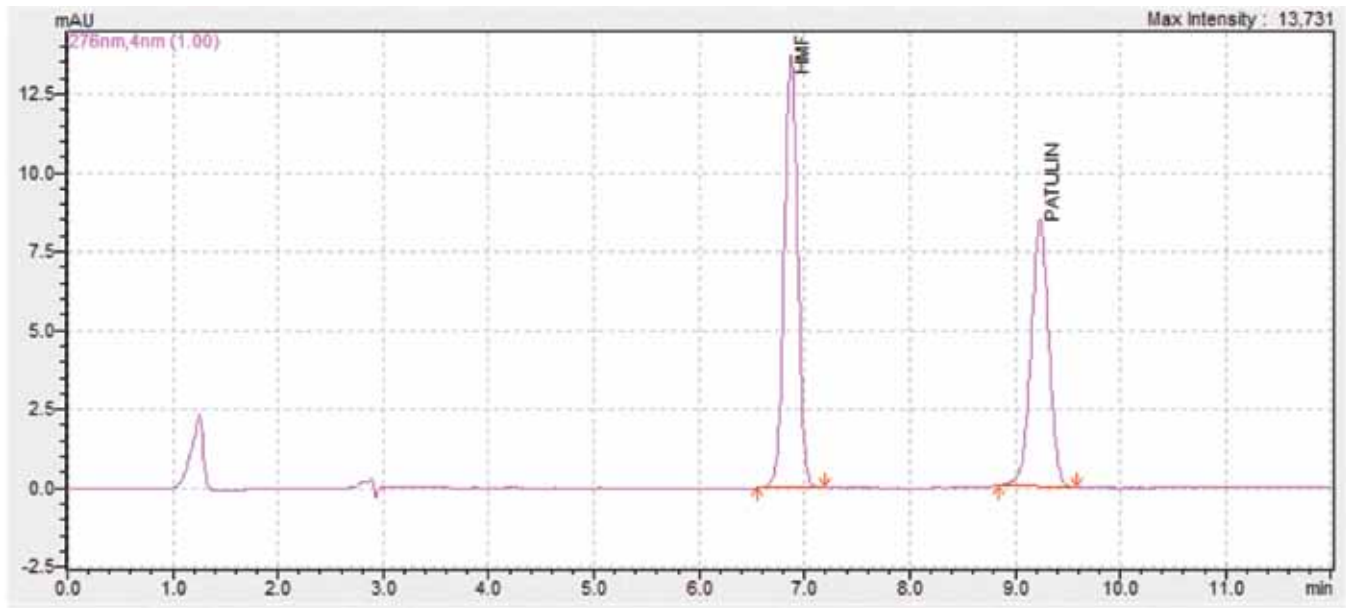
Enjeksiyon Hacmi: 50 uL

Akış Hızı : 1,5 ml/dk

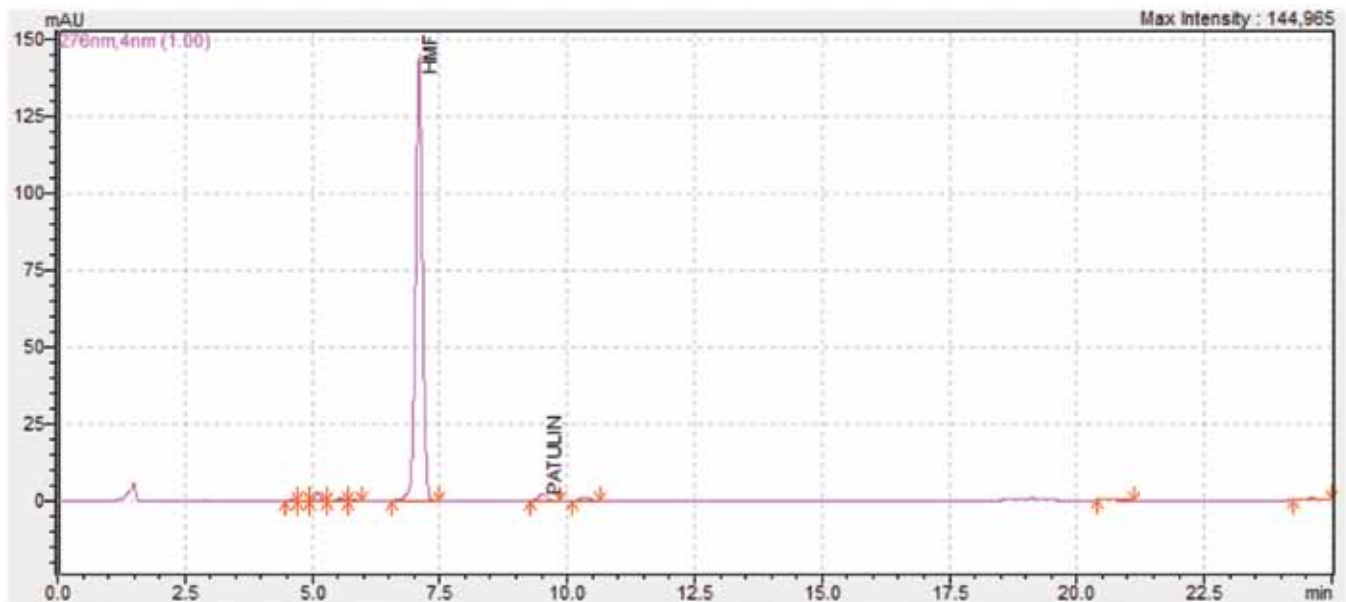
Dedektör : PDA

Süre : 25 dk

Mobil Faz : Asetonitril/Su (%7/%93)

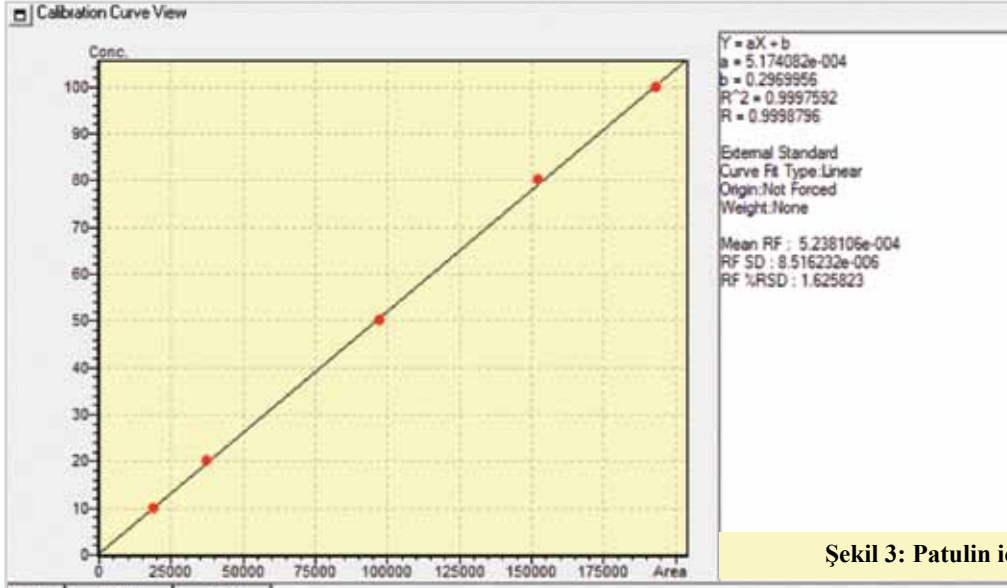
SONUÇLAR VE GÖRÜŞLER**» Kromatogramlar**

Şekil 1: 0.5 ppm Patulin ve HMF Standart



Şekil 2: Numune Kromatogramı

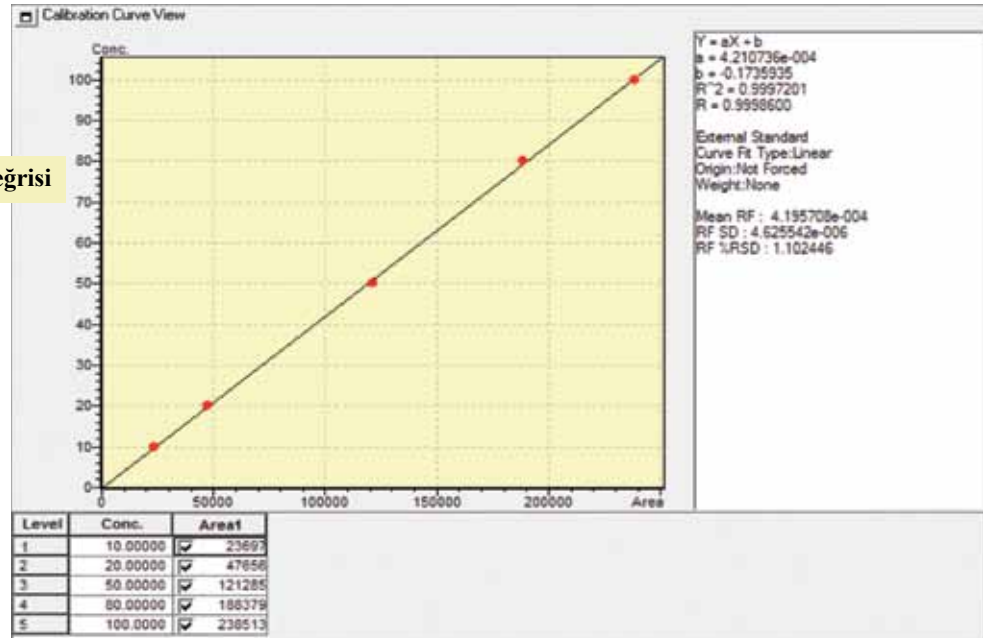
» Kalibrasyon Eğrisi



Şekil 3: Patulin için kalibrasyon eğrisi

Level	Conc.	Area
1	10.00000	18774
2	20.00000	37657
3	50.00000	97429
4	80.00000	152380
5	100.00000	193403

Şekil 4: HMF için kalibrasyon eğrisi



HPLC Uygulama Örneği – 2: Meyve sularında Fumarik Asit ve Laktik Asit Tayini

İşlenmiş meyve ve ürünlerinde Laktik Asit ve Fumarik Asit miktarlarının tespiti. Meyve sularında fumarik asit önemli bir kalite kriteri olarak göz önüne alınmaktadır. Bazı küf ve mantarların meyve sularında fumarik asit oluştuğu saptanmıştır. Fumarik asit bir mikotoksin

olmamakla birlikte, hammaddenin küflenmiş olduğunun bir kanıtı olduğundan önem taşımaktadır. Meyve suyu ve meyve bazı içecekler laktik asit bakterileri için ideal ortam olduklarından, bu bakterilerin neden oldukları enfeksiyonlar önem taşımaktadır. Ayrıca yetersiz temizlenmiş alet ekipman, boru ve tanklar da sekonder enfeksiyon kaynağı olabilirler. Bu nedenle meyve sularındaki laktik asit yetersiz

hijyen sonucunda oluşan bakteriler tarafından daha çok sentezlenir.

METOD VE MATERYALLER:

Çalışma Shimadzu marka Prominence serisi HPLC cihazıyla yapılmıştır.

Numune Hazırlama:

1,2 Brix e ayarlanmış elma suyu 0.45 µ filtreden süzülür ve elde edilen süzüntü viallere konur.

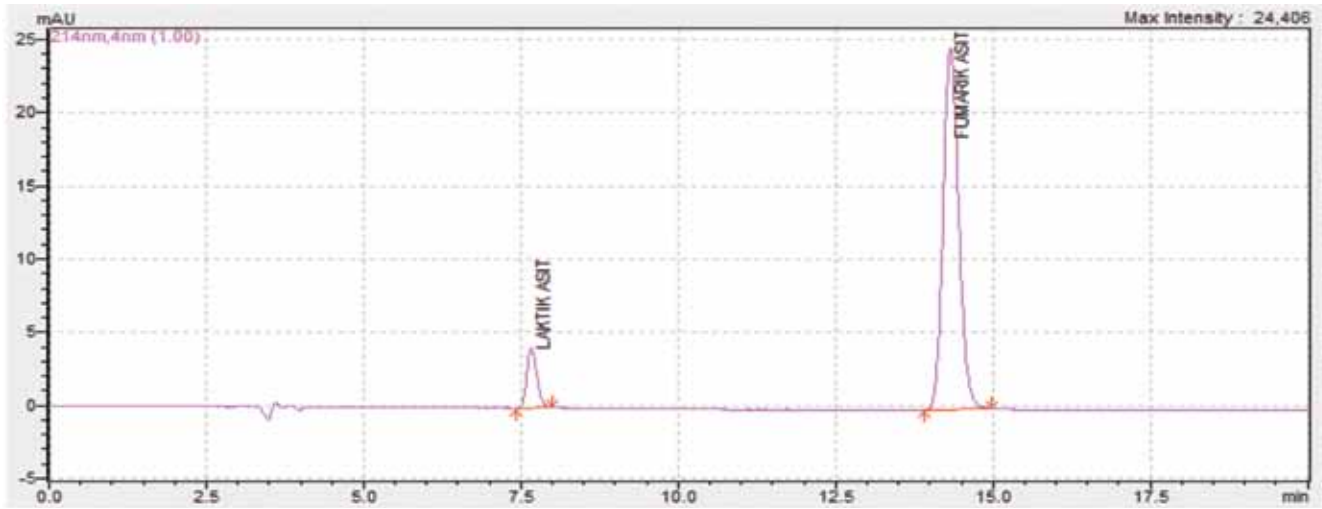
ANALİTİK KOŞULLAR:

Cihaz	: Shimadzu Prominence-20 HPLC
Kolonlar	: GL Sciences Inertsil ODS-4 (250 mm x 4.6mm x 5mm)
Fırın Sıcaklığı	: 30 °C
Enjeksiyon Hacmi	: 10 µL

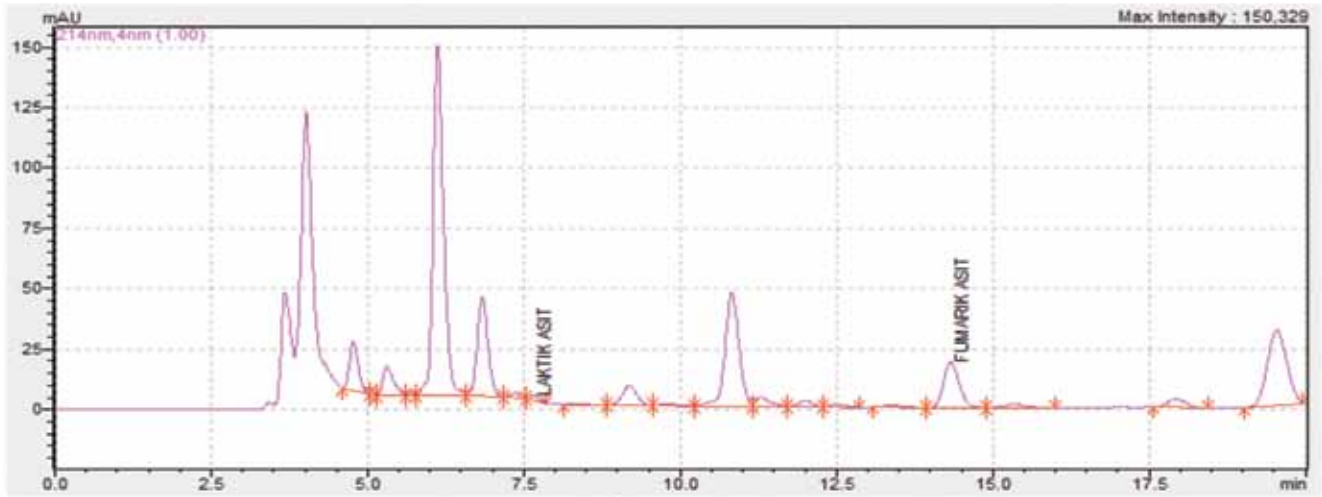
Akış Hızı	: 0,8 ml/dk
Dedektör	: PDA
Süre	: 30 dk
Mobil Faz	: 0,2 M KH ₂ PO ₄

SONUÇLAR VE GÖRÜŞLER

» Kromatogramlar

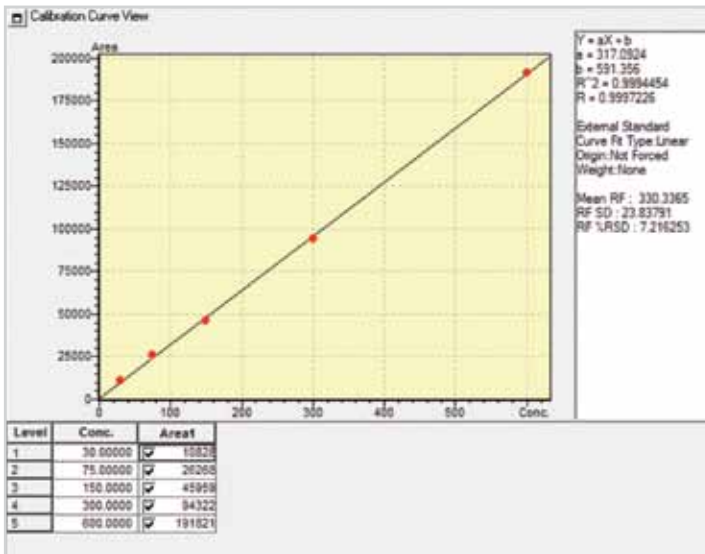


Şekil 5: 5 ppm Fumarik asit ,150 ppm Laktik asit Standart enjeksiyonu

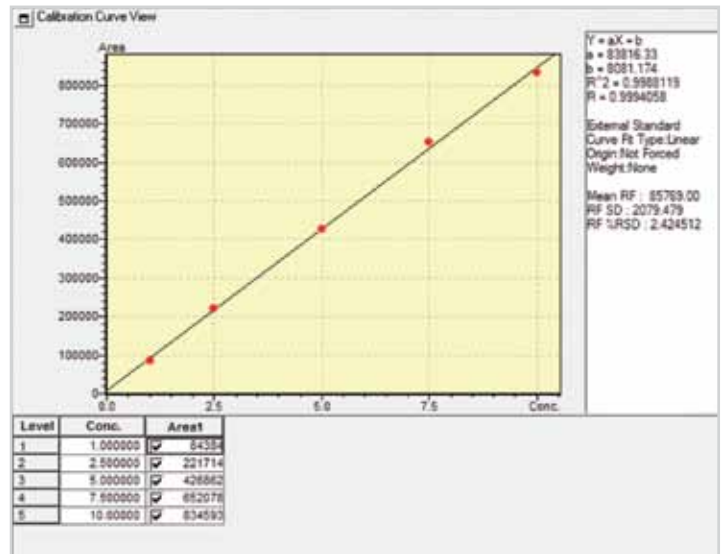


Şekil 6: Numune Kromatogramı

» Kalibrasyon Eğrisi



Şekil 7: Laktik asit için kalibrasyon eğrisi



Şekil 8: Fumarik Asit için kalibrasyon eğrisi