

UYGULAMA NOTU

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi

L011

HPLC ile Meyve Sularında Patulin ve HMF Tayini

HAZIRLAYAN

Ömer Halit Turmuş
Aplikasyon Uzmanı
Ant Teknik Cihazlar Ltd. Şti.

KONU:

Meyve sularında patulin ve HMF analizi

ÇALIŞMANIN AMACI:

İşlenmiş meyve ve ürünlerinde patulin ve HMF miktarlarının tespiti.

Kanser araştırma merkezleri patulinin akut toksik kanserojen ve mutajen etkileri olan bir bileşen olduğunu bulmuştur, kısa dönemdeki etkileri ise alınan doza bağlı olan Patulin elmada, hububatta, ekmekte, peynirde, armut, kayısı, şeftali ve üzümde de bulunabilir. Patulin miktarı işlenmiş meyve ve ürünlerinde ürünün kalitesini belirlemektedir. İşlem 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 ısıtılması işlem görmesi nedeniyle indirgen şeker ve aminoasitlerin tepkimeye girmesi sonucunda HMF (hidroksimetilfurfural) meydana gelmektedir.

METOD ve MATERYALLER:

Çalışma Shimadzu marka HPLC cihazıyla yapılmıştır.

Ekstraksiyon Yöntemi:

Ayırma hunisine (100 ml'lik ayırma hunisi kullanılabilir) 11.2° Brix'e sulandırılmış elma suyundan 20 ml koyulduktan sonra, üzerine 20 ml etilasetat eklenir. Ayırma hunisinin kapağı kapatılarak, çalkalanır. Çalkalama sırasında, ayırma hunisinin havasının alınması unutulmamalıdır.

Standart olarak, faz ayrılması için 5 dakika beklenir. Birinci erlenmayere renkli olan (elma konsantreli) faz, ikinci erlenmayere ise, beyaz (etilasetatlı) faz alınır.

Birinci erlenmayerdeki renkli faz tekrar ayırma hunisine alınır. Üzerine 20 ml etilasetat çekildikten sonra çalkalanır. Çalkalama sırasında ayırma hunisinin havası alınır.

Standart olarak, faz ayrılması için 5 dakika beklenir. Renkli olan faz, birinci erlenmayere alınır ve atılır. Etilasetatlı faz ise, ayırma hunisinde kalır. Ayırma hunisindeki etilasetatlı fazın üzerine, daha önceden elde edilen, ikinci erlen- mayerdeki solüsyon ilave edilir.

Ayırma hunisinde bulunan bu solüsyona 10 ml %1,5'lik Na₂CO₃ ilave edilir. Çalkalama sırasında ayırma hunisinin havası alınır.

Faz ayrılması gerçekleşir gerçekleşmez, etilasetatlı kısım birinci erlenmayere, renkli olan kısım ikinci erlenmayere alınır. Alkali bir ortam oluştuğu için, faz ayrılması için 5 dakika beklemeye gerek yoktur.

İkinci erlenmayerdeki renkli olan kısım, tekrar ayırma hunisine alınır. Üzerine 20 ml etilasetat ilave edilerek, iyice çalkalanır. Faz ayrılması için 5 dakika beklenir.

Faz ayrılması gerçekleşince, renkli olan kısım, başka bir erlenmayere alınır ve atılır. Kalan etilasetatlı kısım ise, daha önce elde edilen etilasetatlı solüsyonla birleştirilir.

100 ml'lik dereceli silindir alınarak, üzerine huni koyulur. 0,45 mikronluk filtre kağıdına bir miktar (30-40 gr) Na₂SO₄ koyulur. Elde edilen solüsyon, yavaş yavaş boşaltılır. Daha sonra sodyumsülfat üzerinde kalan kalıntıların alınması için, 10 ml etilasetat Na₂SO₄ 'ün üzerine boşaltılır.

Elde edilen örnek, 100 ml'lik balon jöjeye aktarılır ve rotary evaporatörde 45° C'de 1 mm Hg basınçta, balonda çok az bir miktar kalıncaya kadar evapore edilir.

Azot gazı yardımıyla örnek kurutulur. Kuru balona 2 ml pH sı 4.0 olan (asetik asitle ayarlanmış) ultra saf su ilave edilir. Elde edilen kalıntı, vial pipet yardımıyla aktarılır. Böylece, örnek hazırlama işlemi tamamlanır.

Hesaplama:

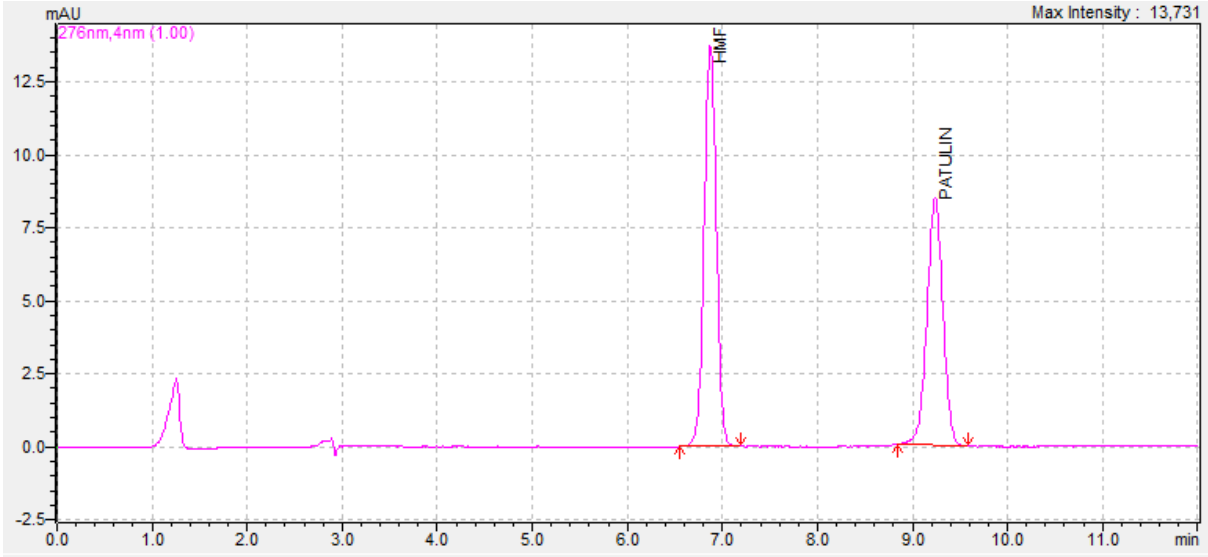
Standart karışım kullanılarak external standart yöntemine göre 11,2° Briksteki Patulin ve HMF Miktarı tayini yapılmaktadır.

ANALİTİK KOŞULLAR:

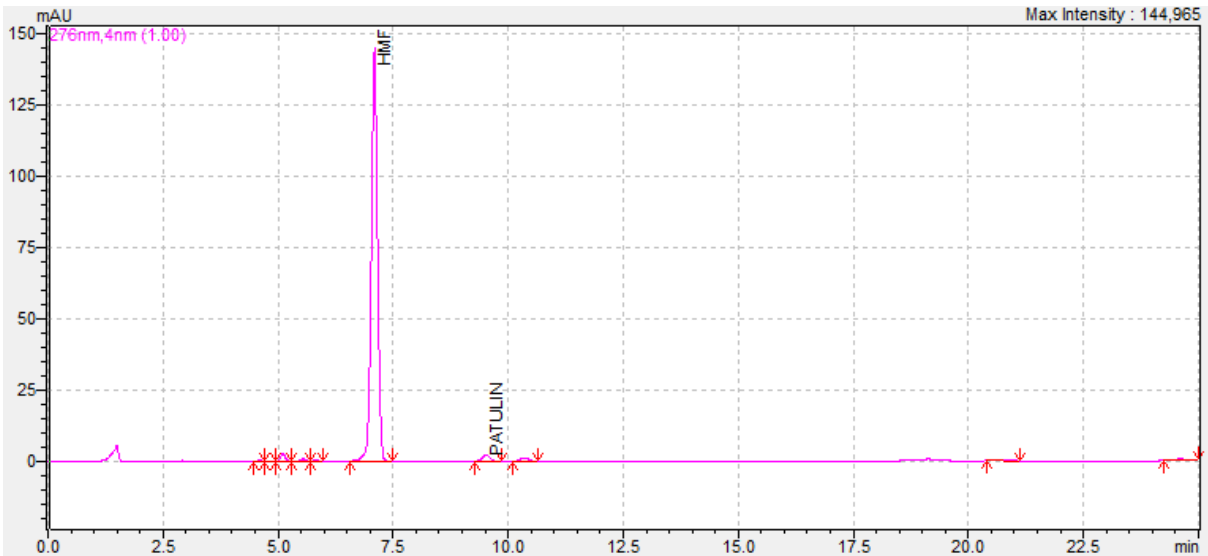
Cihaz	: Shimadzu Prominence HPLC	Akış Hızı	: 5 ml/dk
Kolon	: GLSciences Inertsil ODS 3 (250 mm x 4.6mm x 5 um)	Dedektör	: PDA
Kolon Fırın Sıcaklığı	: 25 °C	Süre	: 25 dk
Enjeksiyon Hacmi	: 50 uL	Mobil Faz	: Asetonitril/Su (%7/%93)

SONUÇLAR ve GÖRÜŞLER

1. Kromotogramlar

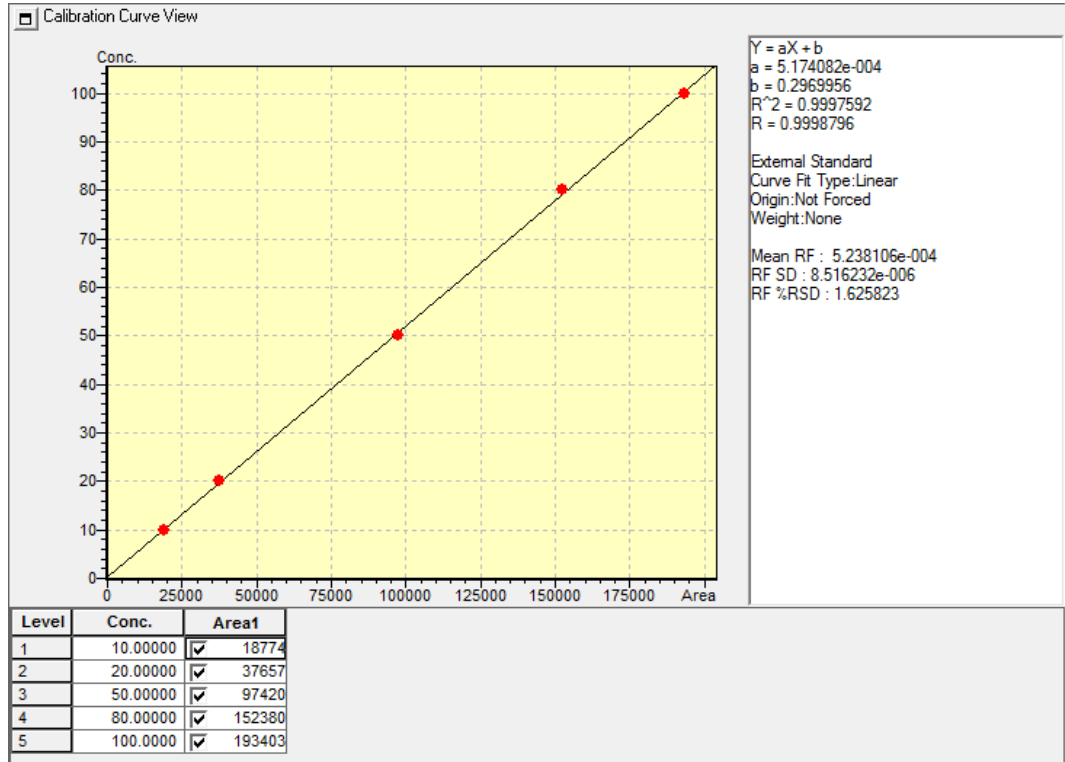


Şekil 1 : 0.5 ppm Patulin ve HMF Standart

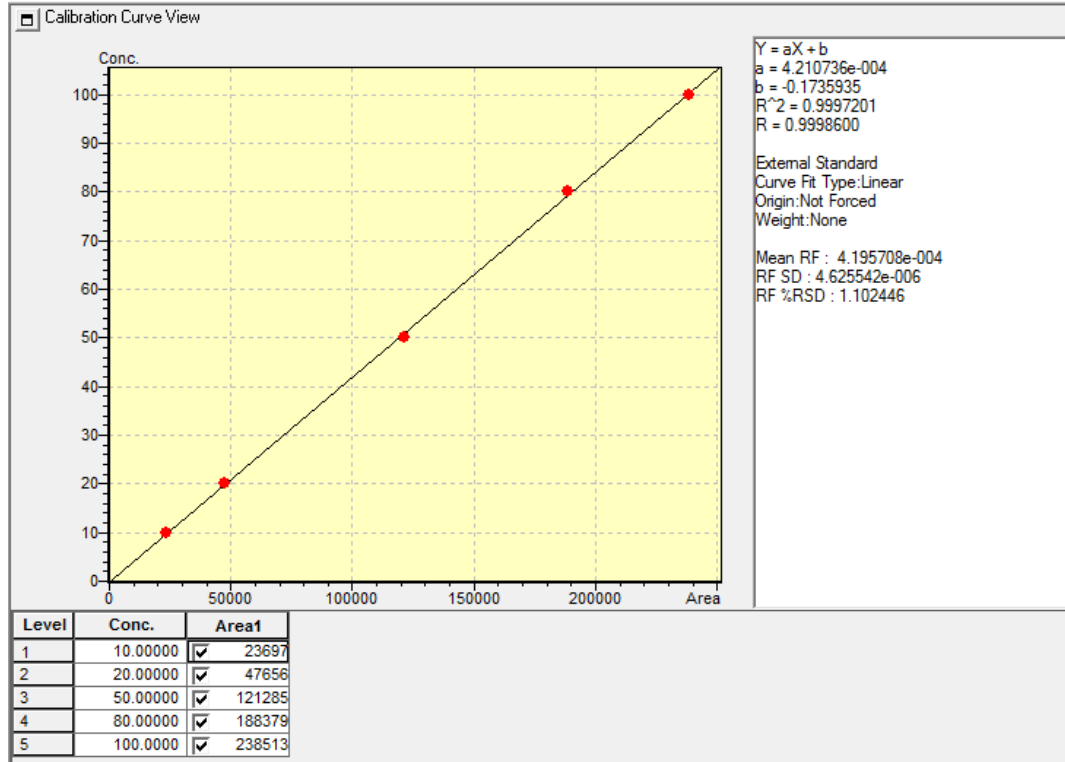


Şekil 2 : Numune Kromatogramı

2. Kalibrasyon Eğrisi



Şekil 3 :Patulin için kalibrasyon eğrisi



Şekil 4 :HMF için kalibrasyon eğrisi

Bu Aplikasyon Notu uygulamanın gerçekleştirildiği tarihe ait bilgiler ışığında oluşturulmuştur. Bu yayında yer alan bilgilerin referans gösterilerek başka bir yerde kullanılması Ant Teknik'in iznine tabidir. Aplikasyon Notu Ant Teknik tarafından önceden bildirilmeksizin değiştirilebilir.