

UYGULAMA NOTU

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi

L002

HPLC ile Gıda Numunelerinde Fenolik Bileşiklerin Tayini

HAZIRLAYAN

Yük. Kimyager Ozan HALIŞÇELİK
Ant Teknik Cihazlar Ltd. Şti.

1.AMAÇ

Bu prosedür gıda maddelerinde fenolik bileşiklerin miktarının saptanması amacıyla kullanılacak olan standart çalışma yöntemini açıklamaktadır.

2.KAPSAM:

Bu analiz metodu; Meyve Suyu, şarap, bal, yoğurt, peynir vb. ürünleri kapsar.

3.PRENSİP:

Fenolik bileşikler deney numunesinden Metil Alkol ve Su karışımı ile ekstrakte edildikten sonra ters faz yüksek işlevli sıvı kromatografi ile tespit edilmesi ilkesine dayanır.

4.ALET - EKİPMAN ve AKSESUARLAR:

1. HPLC (Shimadzu LC-20A Prominence)
2. Dedektör (SPDM-20A Photodiode Array Dedektör)
3. HPLC Kolonu (GL Sciences Inertsil ODS3 - 250 mm x 4.6µm)
4. Analitik Terazî(0.001 g hassasiyette)
5. Ultra Saf Su Cihazı
6. Karıştırıcı
7. Otomatik Pipet (0-1 ml)
8. Membran Filtre Kağıdı
9. Mobil Faz Süzme Aparatı
10. Laboratuvar Cam Malzemeleri
11. Enjektör (20 ml lik tek kullanımlık)
12. Vial (Amber renkli 1.5 ml'lik)

5. KULLANILAN KİMYASALLAR VE KİMYASALLARIN HAZIRLANIŞI:

5.1. HPLC Mobil Faz Hazırlanması : Mobil Fazlardan biri Asetik Asit(%2 suda hazırlanmış) , diğeri ise; Metanoldür ve bunlar gradient program ile kullanılır.

5.2. Çözücü : %50 Metanol: %50 Su karışımı

5.3. Standart Ana Stok Çözeltisi (1000 ppm): Metanol-saf su (50-50)karışımı ile 100 mg fenolik asit standartlarından alınıp, 100 ml 'lik balon jode çözülür.(1000 ppm) konsantrasyonda stok çözelti hazırlanır.

Not : Fenolikler : Gallik Asit/Kateşin /Kafeik Asit/Vanilik Asit/Kafeik Asit/Epikateşin/p-Kumarik Asit/Ferrulik Asit/Hidroksi Sinamik Asit/Kuersetin

5.4.1. Çalışma Standartlarının Hazırlanması :

- **100 ppm 'lik çalışma standardı:** Ana stok çözeltilerden 10 ml alınır ve 100 ml 'lik balon jöjeye aktarılır metanol - saf su karışımı ile 100 ml'ye tamamlanır karıştırılır.
- **75 ppm'lik çalışma standardı:** Ana stok çözeltilerden 7.5 ml alınır ve 100 ml 'lik balon jöjeye aktarılır metanol - saf su karışımı ile 100 ml'ye tamamlanır karıştırılır.
- **50 ppm'lik çalışma standardı:** Ana stok çözeltilerden 5 ml alınır ve 100 ml 'lik balon jöjeye aktarılır metanol - saf su karışımı ile 100 ml'ye tamamlanır karıştırılır.
- **25 ppm'lik çalışma standardı:** Ana stok çözeltilerden 2.5 ml alınır ve 100 ml 'lik balon jöjeye aktarılır metanol - saf su karışımı ile 100 ml'ye tamamlanır karıştırılır.
- **5 ppm'lik çalışma standardı:** Ana stok çözeltilerden 0.5 ml alınır ve 100 ml 'lik balon jöjeye aktarılır metanol - saf su karışımı ile 100 ml'ye tamamlanır karıştırılır.
- **1 ppm'lik çalışma standardı:** Ana stok çözeltilerden 0.1 ml alınır ve 100 ml 'lik balon jöjeye aktarılır metanol - saf su karışımı ile 100 ml'ye tamamlanır karıştırılır.

HPLC Şartları:

Model: Shimadzu LC-20A Prominence

Dedektör : SPDM-20A PDA dedektör

Kolon : ODS/ODS3 (250mmx 4.6um)

Mobil Faz Akış Hızı : 1 ml / dk

Enjeksiyon Hacmi : 20 ul

Dalga Boyu : 280,320 ve 360 nm

Numuneye Ait Dilüsyon : 20

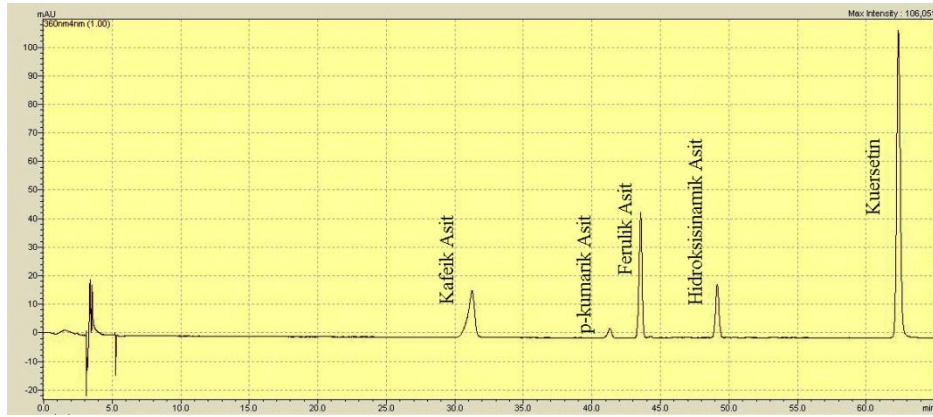
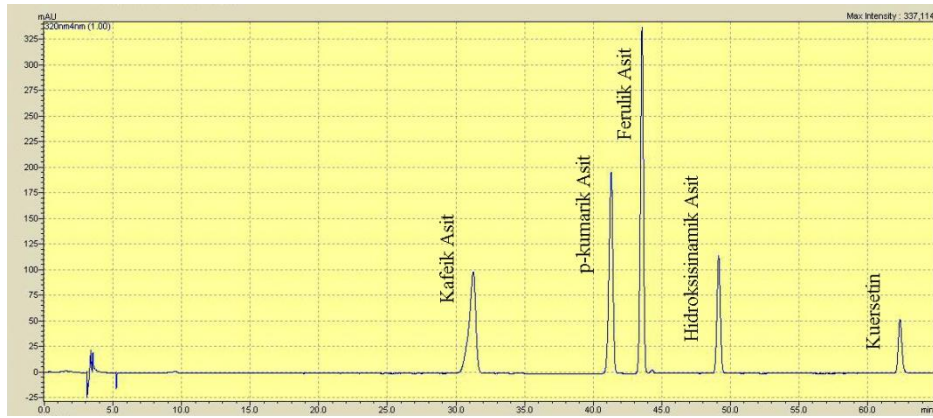
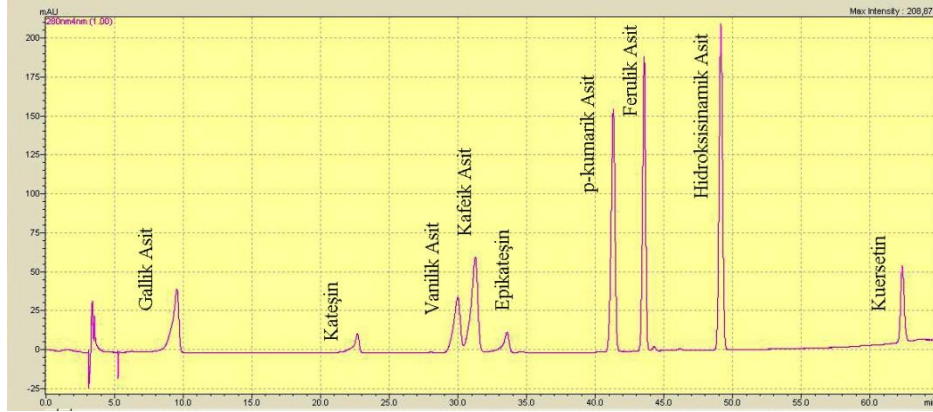
Gradient Programı:

Süre(dk)	A		B	
	Süre(dk)	Konsantrasyonu(%)	Süre(dk)	Konsantrasyonu(%)
0	0	100	0	100
3	5	95	3	95
18	20	80	18	80
25	20	80	25	80
30	25	75	30	75
35	30	70	35	70
40	40	60	40	60
55	50	50	55	50
65	60	40	65	40
67	0	100	67	100
68	0	100	68	100

Ektraksiyon:

100 ml'lik balon jöjeye katı örnekten 5 gr, sıvı örnekten 5 ml homojenize edilmiş örnek alınır. Örnek üzerine 50 ml metil alkol ilave edilir. 15-30 sn çalkalanır. Yaklaşık 45 ml saf su ilave edilir. Tekrar çalkalanır ve soğuyup hacim sabitlenince saf su ile çizgisine tamamlanır. 20-30 ml süspansiyon kaba filtre kağıdından süzülür ve ilk 10 ml süzüntü atılır. Süzüntü enjektöre alınır ve 0.45 um filtreden viallere süzülür. Eğer numune gazlı bir ürünse analize başlamadan ultrasonik banyoda gazı degaze edilir.

KROMATOGRAM



Çalışmalarımız Ankara Üniversitesi Müh. Fak. Gıda Mühendisliği Bölümü'nde yapılmıştır. Desteklerinden dolayı Sn. Prof. Dr. Ender Poyrazoğlu'na teşekkürlerimizi sunarız.

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.