



HPLC İLE ELMA SUYUNDA HMF ANALİZİ



Kim. Akın OSANMAZ
Ant Teknik Cihazlar Aplikasyon Uzmanı

İçecek endüstrisinde gıda güvenliği ve kalite kontrol gereklilikleri açısından yapılan HPLC analizleri arasında meyve suyunda patulin, HMF, organik asit (özellikle laktik asit, fumarik asit ve diğer organik asitlerden okzalik asit, tartarik asit ve sitrik asit), arbutin (fenolik bileşen), şeker (früktöz, glikoz, sakkaroz ve maltoz), sorbitol, benzoat ve sorbat, antosiyanin ve enerji içeceği üretimi yapılan fabrikalarda kafein analizleri gelmektedir. Bu içerikte HMF analizi uygulama örneğine yer verilecektir.



ÇALIŞMANIN AMACI

HMF (Hidroksimetil Furfural), asitli ortamda heksozun parçalanması ile veya Maillard reaksiyonu esnasında ortaya çıkan bir ara üründür. Daha basitiyle, HMF, şekerli gıdaların, uygun olmayan sıcaklıklarda saklanması ve üretimleri sırasın- da uygulanan ısıtma işleminden dolayı ortaya çıkmaktadır. HMF, ürünlerde kalite kriteri olarak da görülmektedir.

HMF, bal ve pekmezde oluşabileceği gibi, süt, meyve suyu veya diğer şeker içerikli gıdalarda da oluşabilmektedir. Bu oluşum, zaman, sıcaklık, su aktivitesi, katalizör miktarı ve kullanılan şekerin yapısına göre değişiklik

göstermektedir. Amacımız bu etkenin gıda numunesindeki miktarının tespitidir.

METOD VE MATERYALLER

Çalışmamız, Shimadzu marka Prominence LC-20A model HPLC ile ve AOAC kaynağı göz önünde tutularak, in-house metod olarak geliştirilmiştir.

KULLANILAN EKİPMAN VE KİMYASALLAR

1. HPLC
2. HPLC kolonu
3. PDA dedektör
4. Ultra saf su sistemi
5. Rotary evaporatör
6. Hassas terazi (0.0001g hassasiyette)
7. Ayırma hunisi
8. Otomatik pipet

9. Etil asetat, HPLC saflığında
10. Sodyum karbonat (Na₂CO₃) solüsyonu: % 1,5'lük olarak hazırlanır. 15 g sodyum karbonat (Anhydrous extra pure) 1000 mL'lik balon jofede ultra saf suyla çizgiye tamamlanır.
11. Azot gazı
12. Susuz sodyum sülfat (Na₂SO₄), analitik saflıkta
13. Filtre kağıdı, 0,45 µm
14. pH metre

STANDART HAZIRLAMA YÖNTEMİ

10 mg Saf HMF maddesi pH 4.0'e asetik asitle ayarlanmış ultra saf su ile balon jofede 10 mL ye tamamlanır. 1000 ppm'lik ana stok çözeltisi elde edilmiş olur.

Diğer seyreltmeler ise kullanılan pH 4.0 asetik asitle ayarlanmış ultra saf su ile yapılır. Seyreltme miktarı beklenen HMF miktarına göre yapılır. Çözeltiler,

– 18 °C’de alüminyum folyoya sarılı halde muhafaza edilmelidir.

EKSTRAKSİYON (SPE)

» Ayırma hunisine (100 mL’lik ayırma hunisi kullanılabilir)

11.2 Brikse sulandırılmış elma suyundan 20 mL koyulduktan sonra, üzerine 20 mL etil asetat 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 konsantrelisi) faz, ikinci erlenmayere ise, beyaz (etil asetatlı) faz alınır.

» Birinci erlenmayerdeki renkli faz tekrar ayırma hunisine alınır. Üzerine 20 mL etil asetat 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. Etil asetatlı faz ise, ayırma hunisinde kalır. Ayırma hunisindeki etil asetatlı 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, etil asetatlı 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 etil asetat ilave edilerek, iyice çalkalanır. Faz ayrılması için 5 dakika beklenir.

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

» 100 mL’lik dereceli silindir alınarak, üzerine huni koyulur. 0,45 mikronluk fitre kağıdına bir miktar (30 - 40 gram) Na₂SO₄ koyulur. Elde edilen solüsyon, yavaş yavaş boşaltılır. Daha sonra sodyumsülfat üzerinde kalan kalıntıların alınması için, 10 mL etil asetat 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’ı 4.0 olan (asetik asitle ayarlanmış) ultra saf su ilave edilir.

» Elde edilen kalıntı, vial pipet yardımıyla aktarılır. Böylece, örnek hazırlama işlemi tamamlanır.

HESAPLAMA

Numune değerlendirmesi ilk olarak kalitatif olarak ve ardından dış standart - kalibrasyon eğrisi metoduyla kantitatif olarak tayini gerçekleştirilmiştir.



LC-20A Prominence Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi



Analitik Koşullar

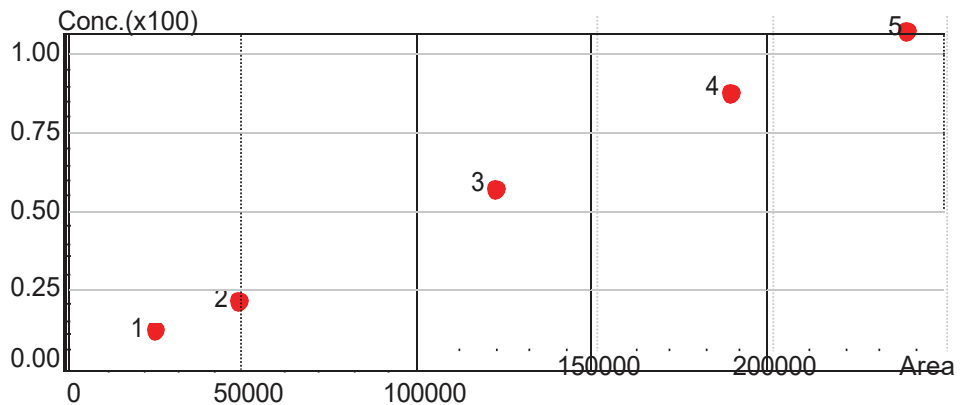
Cihaz	: Shimadzu HPLC
Model	: Prominence LC-20A
Kolon	: Inertsil ODS (250 mm x 4.6mm x 5 µm)
Kolon Fırın Sıcaklığı	: 25 °C
Enjeksiyon Hacmi	: 50 µL
Akış Hızı	: 1,5 mL/dk
Dedektör	: PDA, 275 nm
Süre	: 15 dk
Mobil Faz A	: Asetonitril (% 7)
Mobil Faz B	: Su (% 93)

*Analizin ardından, sistem ve kolon 1 saat boyunca Asetonitril ve Su (% 30-% 70 oranında) yıkanmalıdır.

Sonuçlar ve Değerlendirme

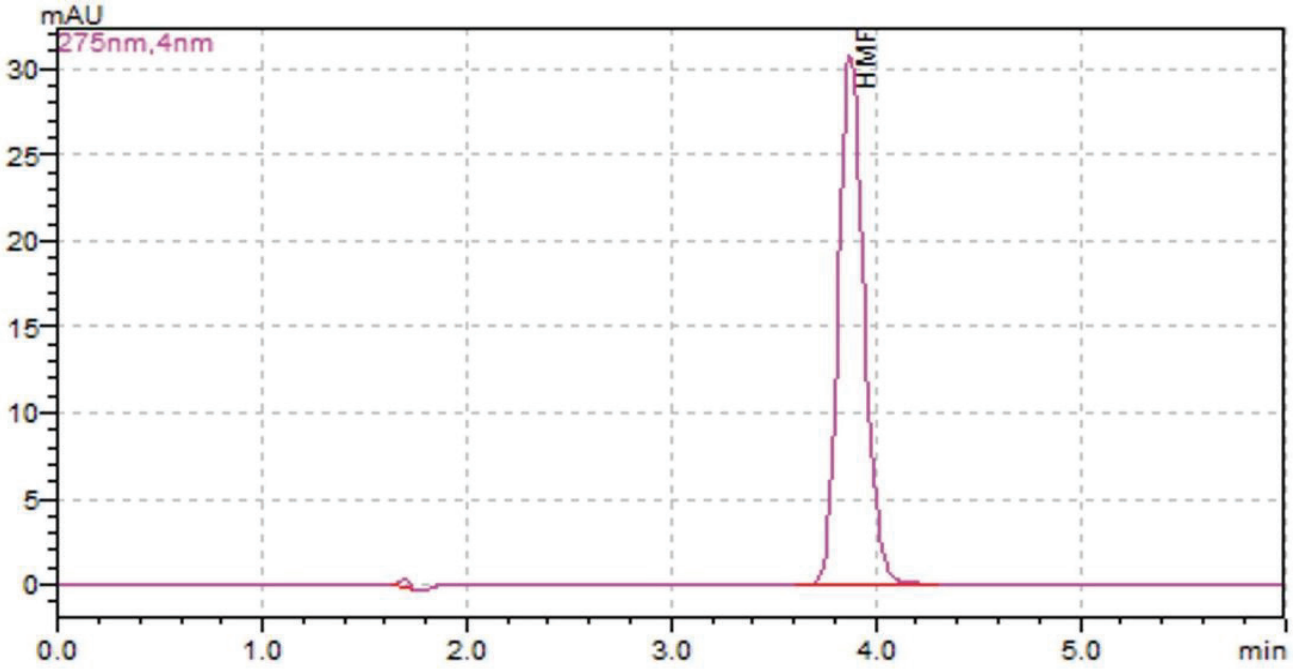
Numune değerlendirmesi, ilk olarak kalitatif ve ardından dış standart - kalibrasyon eğrisi metoduyla kantitatif olarak tayin edilmiştir.

1. Kalibrasyon Eğrisi

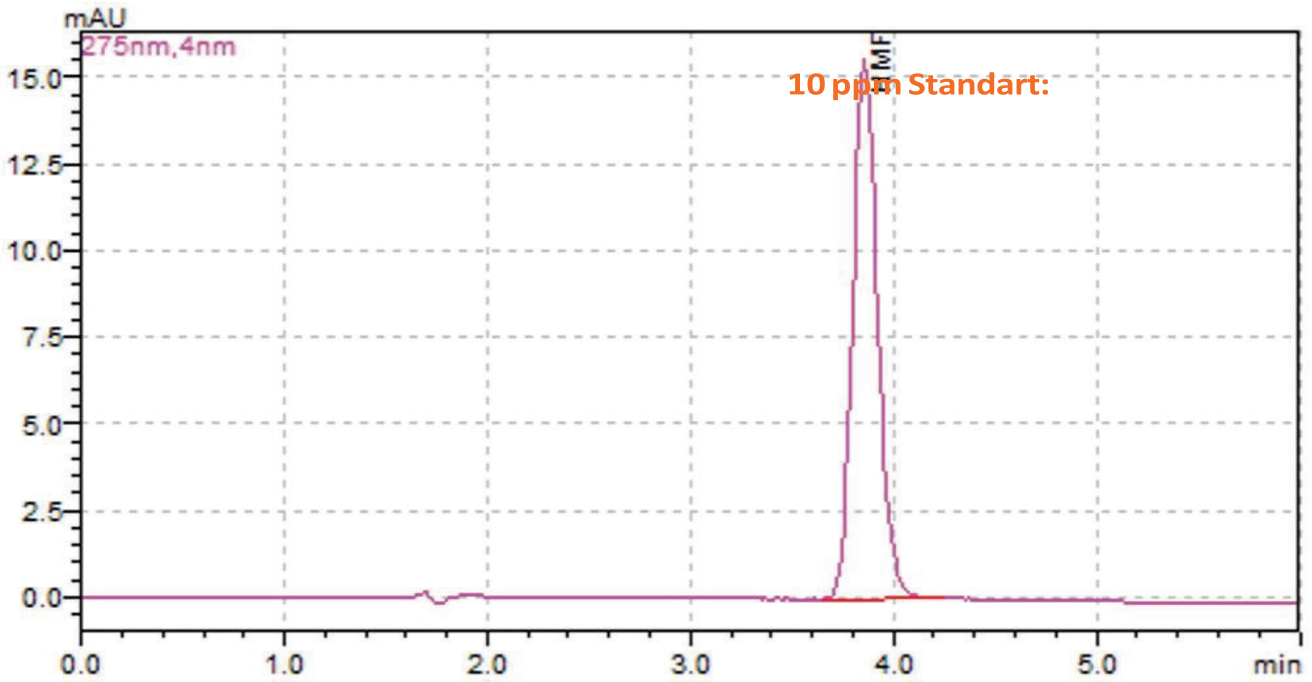


Korelasyon Katsayısı = 0,99972

2. Kromatogramlar



Şekil 1. 10 ppm standarda ait kromatogram



Şekil 2. Numune kromatogramı

Referans

1. Sibel Kuş, Fahrettin Göğüş & Sami Eren (2005) Hydroxymethyl Furfural Content of Concentrated Food Products, International Journal of Food Properties, 8:2, 367-375