

Ligand-Exchange Kromatografi-MS kullanılarak içeceklerde ve ağız gargarasında tatlandırıcıların miktarsal analizi



Kimya Müh. Fatih ŞENOL
Ant Teknik Cihazlar
Aplikasyon Uzmanı

Tablo 1: Analiz Koşulları (Tatlandırıcılar)

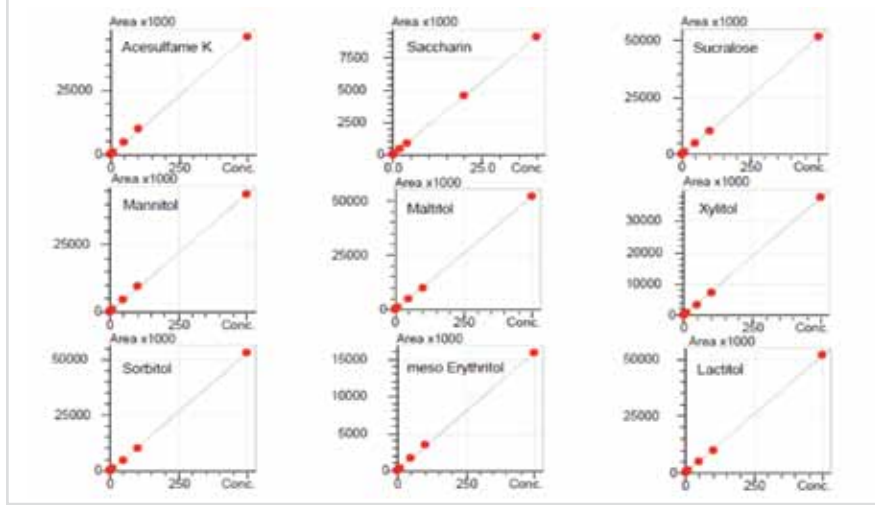
LC Koşulları	
Kolon	Shim-pack SCR-101 P (7.9 x 300 mm)
Akış Hızı	0.60 mL/dk
Elusyon Modu	İzokratik elüsyon
Mobil Faz	Su
Post Kolon	Metanol:Kloroform, 95:5
Çözelti	(0.1 mL/dk)
Fırın Sıcaklığı	80 °C
Enjeksiyon Hacmi	10 µL
MS Koşulları (Shimadzu LCMS-8030)	
Arayüz	APCI
MS Modu	Negatif Mod (MRM)
Arayüz Sıcaklığı	450 °C
Blok Sıcaklığı	200 °C
DL Sıcaklığı	250 °C
Nebulize Gaz	Azot, 2.0 L/dk
Akışı	
Kurutma Gazı	Azot, 10.0 L/dk
Akışı	

Şeker ikameleri, gıda katkıları, şeker alkoller ve yapay tatlandırıcıların endüstride kullanımının artmasıyla gıda güvenliği ve katkıların insan sağlığına etkileri üzerine daha ayrıntılı araştırmalar yürütülmeye başlanmıştır. Gıda ve içeceklerde kullanılan tatlandırıcıların araştırma laboratuvarlarında ve endüstride analizi yüksek hassasiyet ve seçicilik sağlayan analitik metodların kullanımını gerektirmektedir. Bu makalede 9 şeker alkolü ve yapay tatlandırıcının LCMSMS metodu ile ayrımı ve tespitine yer verilmektedir. Çalışmada mobil faz olarak saf su kullanılmaktadır. Öte yandan şeker molekülleri LCMSMS arayüzünde kolayca iyonize olmamakta, ayrıca saf suyun da ideal bir iyonlaştırma ajanı olmadığı bilinmektedir. Bu nedenle, metanol vb. organik solventler ile kloroform vb. iyonlaştırma ajanlarının post-kolondan geçirilmesiyle karbonhidratların iyonizasyon

etkinliğinin artması amaçlanmaktadır. Ancak kloroform ajanı iyonların baskılanmasına ve LCMSMS sisteminin arayüz ve iyon optiklerinin kirlenmesine neden olabileceğinden bu çalışmada post-kolon hattında düşük miktarda kloroform kullanılmıştır.

DENEYSEL

Bu çalışma Shimadzu LCMS-8030 cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Şeker ve tatlandırıcıların ayrımı Shim-pack ligand exchange kolonu kullanılarak, su fazında sağlanmıştır. LC ve MS koşulları **Tablo 1**'de gösterilmektedir. En çok kullanılan 9 tatlandırıcı bileşik (**bkz. Tablo 2**) toz formda Sigma Aldrich, Fluka ve Supelco'dan temin edilmiştir. Dokuz tatlandırıcının karışım stok çözeltisi saf su ile hazırlanmıştır. Suyla seyreltilerek standart stok çözelti karışımından 0.04 mg/L ile 500 mg/L aralığında kalibrasyon noktaları oluşturulmuştur.

Şekil 1: 9 Tatlandırıcı Standardına Ait Kalibrasyon Eğrileri, Pik Alanı Konsantrasyon (mg/L)**Tablo 2: 9 Tatlandırıcının Miktersal Analizine Ait Kalibrasyon Eğrisi ve Metod Tekrarlanabilirliği Tablosu**

Tatlandırıcı	MW	MRM			RI (dk)	Kons. aralığı	R ² değeri	%RSD Pik Alanı
		[M+Cl] ⁻	[M-K] ⁻	[M-H] ⁻				
Asesülfam K	201.24	-	161.9>82	-	6.91	0.1-500	0.9996	0.92
Sakkarin	183.18	-	-	181.9>42	7.087	0.04-40	0.9999	0.57
Maltitol	344.31	379.1>35	-	-	18.692	0.5-500	0.9999	9.44
Meso Erythritol	122.12	157>82	-	-	19.799	0.5-500	0.9998	3.88
Lactitol	344.31	379.10>35	-	-	20.685	0.5-500	0.9998	8.59
Sukkaroz	397.64	432.9>359	-	-	24.361	0.1-500	0.9999	2.02
Mannitol	182.17	217>181	-	-	25.026	0.1-500	0.9998	7.06
Xylitol	152.15	187>89	-	-	31.492	0.1-500	0.9997	2.58
Sorbitol	182.17	217>181	-	-	34.371	0.1-500	0.9997	5.94

SONUÇLAR**Metod Geliştirme**

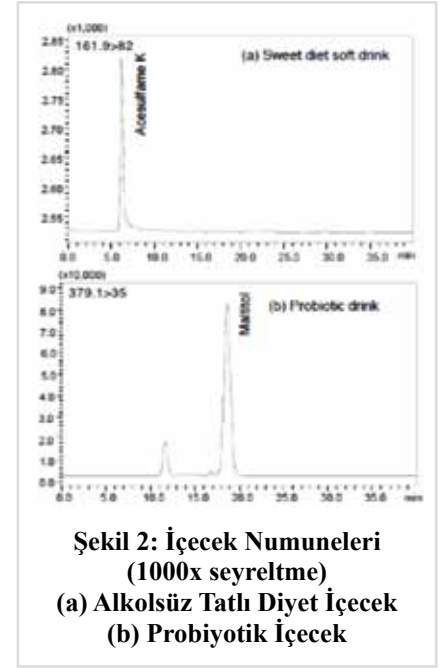
Dokuz tatlandırıcının Ligand Exchange Kromatografi-MS'inden MRM kromatogramları elde edilmiştir. Saf su fazı kullanılarak ligand exchange kromatografi ayrımı gerçekleştirilmiştir. MeOH'de çözünen %5'lik kloroform çözeltisi APCI arayüzü öncesinde 0.1 mL/dk akışla gönderilmiştir. APCI'a giren mobil fazdaki kloroformun içeriği %0,07 idi. Bu miktar literatürde kullanılanın çok altındadır. Çalışılan tatlandırıcı ve şeker alkollerinin çoğu negatif modda klor adduct iyon [M+Cl]⁻ oluşturmuştur. Asesülfam potasyum ve sakkarin doğrudan negatif modda iyonize olarak sıra ile [M-K]⁻ ve [M-H]⁻ oluşturmuştur. Birbirine çok yakın alıkonma süreleri olan üç bileşik çifti belirlenmiştir: asesülfam potasyum ve sakkarin (6.91/7.09 dk), sukraloz ve mannitol (24.36/25.03 dk), meso Erythritol ve Lactitol (19.79/20.68 dk). Asesülfam potasyum ve sakkarin farklı MRM değerlerinde (161.9>82 [M-K]⁻ ve 181.9>42 [M-H]⁻) MRM modunda tespit

edilmiştir. Kalan iki çift de adduct iyonların [M+Cl]⁻ farklı MRM değerlerine göre tespit edilmiştir. Dokuz tatlandırıcının kalibrasyon eğrileri 0.04, 0.1 veya 0.5 mg/L, 500 mg/L aralığında standart numune karışımları kullanılarak çizilmiştir.

Tüm bileşiklerden elde edilen lineer kalibrasyon eğrileri ($r^2 > 0.999$) Şekil 1'de görülmektedir. Çözeltilerin içindeki bu bileşiklerin tespit limitleri (LOD değerleri) bileşiğe bağlı olarak 0.01~1 mg/L arasında değişmektedir. Yöntemin tekrarlanabilirliği (20 mg/L sakkarin hariç) 50 mg/L konsantrasyon için elde edilen pik alanının RSD (%; n=6) (maltitol (%9.44) ve laktitol (%8.59) hariç) %7'nin altında olarak tespit edilmiştir. (Bkz. Tablo 2)

Tablo 3: Test Edilen Numunelerdeki Tatlandırıcılara Ait Sonuçlar (g/L)

	Alkolsüz tatlı diyet içeceği	Ağız gargarası	Probiyotik içecek
Asesülfam K	0.07	-	-
Sakkarin	-	0.47	-
Maltitol	-	11.45	39.05
Sorbitol	-	88.82	-

**Şekil 2: İçecek Numuneleri (1000x seyreltme)
(a) Alkolsüz Tatlı Diyet İçecek
(b) Probiyotik İçecek****İÇEÇEK VE AĞIZ GARGARALARININ ANALİZİ**

Bu LC/MS/MS yöntemi alkolsüz diyet içecekler, probiyotik içecekler ve ağız gargaraları için uygulanmıştır. Sıvı numuneler su içinde 1000 kat seyreltilmiş ve hava kabarcıklarının giderilmesi amacıyla ultrasonik banyo kullanılmıştır. Tüm numuneler Ligand-Exchange Kromatografi – MS'e enjekte edilmeden önce 2 µm'lik filtreden geçirilmiştir. Test edilen numunenin SIM kromatogramları Şekil 2'de gösterilmektedir. Yapay tatlandırıcıların ve alkollerin türlerinin tespit sonuçları ürün etiketleri ile uyum göstermektedir (Tablo 3).

SONUÇ

Dokuz tatlandırıcı bileşiğin miktersal analizi için yeni bir APCI-Ligand Exchange Kromatografi/MS/MS metodu geliştirilmiştir. Sonuçlar kloroformun post-kolon reaktifi olarak %0.7 gibi düşük miktarlarda dahi kullanımının dokuz tatlandırıcının etkin iyonizasyonu ve istenen hassasiyet seviyesine (0.01~1mg/L) ulaşılması için yeterli olduğunu göstermiştir.

Referanslar

- » Shimadzu Aplikasyon Bülteni, C74
- » Shimadzu Aplikasyon Bülteni, AD-0022