MEYVE SULARINDA PATULİNİN YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOGRAFi İLE TAYİNİ

Mustafa YILMAZER

Yüksek Lisans Tezi

KMYA ANABİLİM DALI

ISPARTA 2002

T.C
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MEYVE SULARINDA PATULİNİN YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOGRAFi İLE TAYİNİ

MUSTAFA YILMAZER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

ISPARTA , 2002

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne

Bu çalışma jürimiz tarafından KİMYA ANABİLİM DALI'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan : .....

Üye : .....

Üye : .....

ONAY

Bu tez ...../ ..... / 20.. tarihinde Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

...../ ..... / 20..

S.D.Ü FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

Prof. Dr. Remzi KARAGÜZEL

İÇİNDEKILER **sayfa**

İÇİNDEKİLER ..... **i**
ÖZET ..... **ii**
ABSTRACT ..... **iii**
TEŞEKKÜR ..... **iv**
SİMGELER DİZİNİ ..... **v**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **vi**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **vii**
1. GiRiŞ **1**
1.1. KURAMSAL TEMELLER **2**
1.1.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) **2**
1.1.2. Kromatografide Temel Kavramlar **7**
1.1.3. HPLC Kolonları Hakkında Genel Bilgi **9**
1.1.3.1 Normal Faz Kromatografisi **10**
1.1.3.2 Ters Faz Kromatografisi **11**
1.1.4. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografide Yöntem Geliştirme **12**
1.1.5. Mobil Fazda pH Standardizasyonu **16**
1.1.6 Standart İlave Metodu **18**
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI **20**
3. MATERYAL VE METOT **26**
3.1. Genel Bilgi **26**
3.2. Kullanılan Cihazlar **26**
3.2.1. Yüksek Performans Sıvı Kromatografi Cihazı **26**
3.2.2. pH metre **26**
3.2.3. Döner buharlaştırıcı **26**
3.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler **27**
3.3.1 Kullanılan Çözeltiler **27**
3.4 Materyal **29**
3.5. Metot **30**
4. BULGULAR **31**
5. TARTIŞMA VE SONUÇ **40**
6. KAYNAKLAR **42**

7.ÖZGEÇMİŞ..... 47

ÖZET

Patulin, *Penicillium expansum* tarafından oluşturulan meyvelerde bulunan bir mikotoksindir. Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda toksik, mutajen, teratojen ve kanserojen etkileri bulunmuştur. İnsanlarda mide ve sindirim sistemi rahatsızlıklarına da yol açmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü bir çok Avrupa ülkesinde elma sularında patulinin izin verilen üst sınırını 50 μg/L olarak belirlemiştir. İşlenmiş meyve suyunda ve meyve ürünlerinde kaliteyi belirlemektedir. Elma suyunda patulinin bir çok tayin metodu geliştirilmişir, özellikle son zamanlarda yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) tekniği kullanılmaktadır. Bu çalışmada patulin HPLC ile C18 kolonda 276 nm dalga boyunda tayin edilmiştir. Tayinde elma suyunda bulunan bozucu etkisi olan 5-HMF 'ın patulinden ayrımını sağlayacak mobil faz ve kolon kullanılmıştır. Standart çalışma grafiği (y=327,8C-192,17) (N=5) 15-200μg/L aralığında lineer olup, regresyon katsayısı 0,99983 bulunmuştur. Patulin meyve suyundan etil asetat ile ekstrakte edilmiş sodyum karbonat çözeltisiyle ekstrakte edilerek temizlenmiştir. Geri kazanma değerleri hesaplanarak sonuçlar düzeltilmiştir. Metot elma suyunda patulin tayini için uygun olarak değerlendirilmiştir.

ANAHTAR KELİMELER :Patulin,HPLC,meyve suyu

ABSTRACT

Patulin is a mycotoxin poduced mainly by *Penicillium expansum* that commonly contaminated fruits. Studies with fungi on animals have demonstrated that patulin has a broad spectrum of toxicity ,including mutagenicity ,teratogenicity ,and carcinogenicity. In human beings ,ıt has caused nausea ,vomiting and gastrointestinal disturbance .It is regulated for apple juice in several European countries at amaximum permitted level of 50 μg/L ,as suggested by the World Health Organization. Patulin is an indicator of the quality of processed juice and fruit products. Many methods have been developed for measuring patulin in apple juice .Recently HPLC technique is used especially.In this study patulin was determined by HPLC on a reversed phase C18 column with UV dedection at 276 nm.The mobil phase and the column used in the HPLC determination were selected to seperate patulin from the interfering substances in apple juice , especially 5-HMF. The linear regression coefficient of the standart curve (y=327,795C -192,17) for patulin at concentrations ranging from 15 to 200 μg/L regression coefficient was 0,99983 (N=5).Patulin was extracted with ethyl acetate and then was cleaned up by extraction with sodium carbonate solution .The results corrected for the recovery percentage. The method is suggested rapid ,convenient for the determination of patulin in apple juice.

Keywords : Patulin, HPLC , fruit juice

TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı bana öneren danışman hocam SDÜ Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Yrd. Doç.Dr. Hakan AKTAŞ'a , deneysel çalışmalarımda yardımcı olan Fen–Edebiyat Fakültesi Dekanı Sayın Prof. Dr. Güleren ALSANCAK'a ayrıca Merkezi Araştırma Laboratuvarında çalışmalarımda emeği geçen arkadaşlarıma ,bana destek olan Eşim ve Aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER DİZİNİ

HPLC : Yüksek basınçlı sıvı kromatografi

RPHPLC : Ters faz yüksek basınçlı sıvı kromatografi

k : Kapasite faktörü

t_R : Bileşiğe özgü alıkonma zamanı

t_0 : Kolonda tutulmayan pikin alıkonma zamanı

α : Seçicilik faktörü

R : Ayırma gücü

N : Bir kromatografik ayırmada etkin tabaka sayısı

E_T^N : Normalize edilmiş mobil faz polarite parametresi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Patulinin molekül formülü..... 1
Şekil 1.1.1 Yüksek performanslı sıvı kromatografi cihazı. 3
Şekil 4.1 HMF-Patulin .logk-ETN grafiği..... 32
Şekil 4.2 Patulin alan derişim grafiği 33
Şekil 4.3 HMF ,patulin standart karışımının kromatogramı 35
Şekil 4.4 Elma suyu örneği kromatogramı 35
Şekil 4.5 Patulin katkısı yapılmış elma suyu örneği kromatogramı..... 36
Şekil 4.6 HMF ,patulin standart karışımının kromatogramı..... 36
Şekil 4.7 Elma suyu numune kromatogramı 37
Şekil 4.8 Geri kazanma fonksiyonu grafiği 39

ÇİZELGELER DİZİNİ

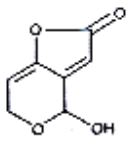
Çizelge 1.1.1 Sıvı kromatografisi dedektörleri hakkında genel bilgi.....5
Çizelge 1.1.2. Normal ve ters faz kromatografisinin özellikleri.....12
Çizelge 1.1.3. Metanol su ve Asetonitril su karışımında E_TN değerleri.....15
Çizelge 1.1.4. Asetonitril –su karışımında 0,05 m KHPh için pH_{RVS} değerleri.....17
Çizelge 3.1 Kullanılan kimyasal maddeler.....27
Çizelge 4.1 Alıkonma ve seçicilik faktörleri 32
Çizelge 4.2 Alıkonma ve seçicilik faktörleri 32
Çizelge 4.3 Çalışma grafiği verileri Astec kolonda 33
Çizelge 4.4 Çalışma grafiğinin standart sapma değerleri.....34
Çizelge 4.5 Standart ilave kalibrasyon grafiği 34
Çizelge 4.6 Standart ilavelere göre alınan veriler 38
Çizelge 5.1 Elma suyu numunelerinde bulunan patulin sonuçları.....40

1.GİRİŞ

İnsan sağlığını olumlu veya olumsuz şekilde etkileyebileceği düşünülen bir çok maddenin tayini her geçen gün önem kazanmaktadır. Belirlenen kriterler sayesinde özellikle insan sağlığı üzerinde zararlı etkileri saptanabilen tüm parametrelerin düzenlenmesi çalışmaları tüm dünyada sürdürülmektedir. Eser düzeylerde bir çok maddenin tayini gelişen teknoloji ile son zamanlarda başarı ile yapılabilmektedir. Besin değerleri açısından oldukça önemli yer tutan meyveler ise günlük yaşamın vazgeçilmez gıdalarıdır. Bazı meyve ve sebzelerde bulunabilen kahverengi çürüklerin varlığı küf oluşumunun bir göstergesi olup gıdalarda istenmeyen bir durumdur. Özellikle *Penicillium exp*ansum türü organizmalar tarafından üretilen patulinin analizi her geçen gün önem kazanmaktadır.

Patulin (4-hidroksi- 4H- furol [3,2-c] piran–2(6H)-1) bir mikotoksindir. (Şekil 1.1). Mikotoksinler gıdalarda istenmeyen çürükçül mantarların ikincil ürünüdür. *Penicillium expansum, P.leucopus , P.patulum, P.calavrforme, P.melinii, P.equinum, P.roeforti* gibi türler patulin üretmektedir (Woller ve Majerus , 1989) .

Patulin elmada, hububatta, ekmekte, peynirde, armut, kayısı, şeftali ve üzümde de bulunabilir (Martin ve Hernandez ,1990) Patulin miktarı işlenmiş meyve ve ürünlerinde ürünün kalitesini belirlemektedir. İşlem sırasında patulin miktarı kabul edilebilir sınırlara kadar düşürülebilmelidir. Patulin meyvelerden fermantasyon sırasında giderilebilmesine rağmen tamamen giderilememektedir.



Şekil 1.1 Patulinin molekül formülü

Patulin , antibiyotik olarak insanlar üzerinde kullanılmıştır, gram (+) ve gram (-) bakterilerin gelişimini inhibe etmektedir , daha sonraları ödem ,gözde irritasyon ve kan basıncını düşürücü etkileri saptanmıştır.

Renksiz ve kristal bir bileşik olan patulin'in erime noktası 110-112 ^{o}C dir. Yüksek vakum altında 70-100 ^{o}C de süblimasyon ile saf olarak elde edilebilmektedir. Patulin, su, etil alkol, aseton, etil asetat ve kloroformda çok iyi çözünür. Buna karşın dietileter ve benzende daha az, petrol eterinde ise hiç çözünmez. Su ve metil alkolde çözündüğü zaman kolaylıkla değişime uğramakta, benzen, kloroform ve diklorometan da ise değişim olmamakta ve stabilitesini uzun süre muhafaza etmektedir. Küfler tarafından patulin'in sentezinde, küfün suşu, ortamın sıcaklığı, su aktivitesi değeri, pH değeri, süre ve ortamdaki besin maddeleri ile ozmotik basınç önemli rol oynamaktadır. Kanser araştırma merkezleri patulin'in akut toksik karsinojen ve mutajen etkileri olan bir bileşen olduğunu bulmuştur, kısa dönemdeki etkileri ise alınan doza bağlıdır. 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

Bu çalışmada elma suyunda patulin tayini için gerek mobil fazın bileşimi gerek ekstraksiyon aşamalarına dikkat edilmiş tayinin gerçekleştirilmesi sağlanmıştır.

1.1.Kuramsal Temeller

1.1.1 Yüksek performanslı sıvı kromatografisi

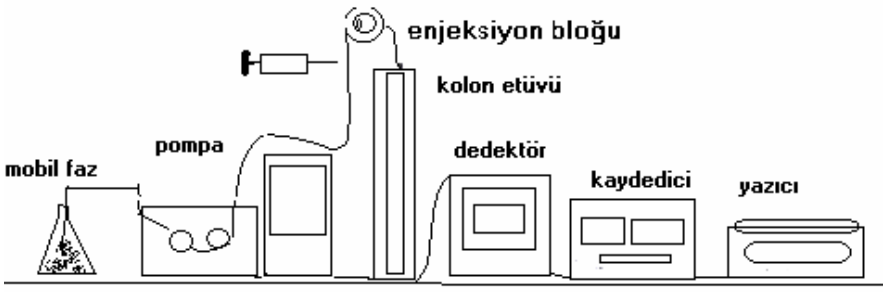
Kromatografi, karışımlardaki kimyasal bileşiklerin ayrılması, tanınması ve tayini için kullanılan bir analitik yöntemdir (Poole ve Poole., 1997). Karışımdaki bileşenler, akış halindeki gaz veya sıvı fazla durgun faz üzerinden geçirilir; kromatografik ayırma, bileşenlerin göç hızlarına bağlı olarak gerçekleşir. Yüksek performans sıvı kromatografi (HPLC), bir örnekteki bileşenlerin hızla ayırımına, ayrıca uçucu olmayan veya sıcaklıkla

bozunan ve bu nedenlerle gaz kromatografik tayinleri zorlukla gerçekleştirilen maddelerin ayırımına imkan tanır. Yüksek performans sıvı kromatografik yöntemler 5 ana grupta incelenir. Bunlar;

1)dağılma veya sıvı kromatografi
2)adsorpsiyon veya sıvı-katı kromatografi
3)iyon değiştirici kromatografi
4)jel geçirgenlik kromatografisi
5)jel süzme kromatografisi
dir.

Bu teknikler içinde en yaygın kullanılanı, dağılma kromatografisidir. Bu teknik sıvı-sıvı kromatografi veya sıvı bağlı faz kromatografi olmak üzere iki alt sınıfta incelenir. Yüksek performans sıvı-sıvı kromatografide durgun faz, katı yüzeyine fiziksel adsorpsiyonla, bağlı faz tekniğinde ise kovalent bağlarla tutturulur. Bu iki teknikten bağlı faz dağılma kromatografisi, kararlı olma özelliğinden dolayı daha yaygın kullanım alanı bulmuştur; durgun faz ve hareketli fazın bağıl polaritelerine göre iki tiptir.

Bir yüksek performans sıvı kromatografi sistemi Şekil 1.1.1'de görüldüğü gibi elue edici haznesi, pompalama sistemi, enjeksiyon sistemi, ön kolon, kolon, dedektör, kaydedici ve atık şişesi kısımlarından oluşur. Pompa tek veya çift olabilir. Çift pompalı sistemde elue edici kompozisyonu zamanla değiştirilerek çalışılır.



Şekil 1.1.1 Yüksek performanslı sıvı kromatografi cihazı

HPLC'de bir tek çözücü sistemi kullanılarak yapılan çalışma izokratik çalışmadır,. Bu tip çalışmanın yeterli olmadığı durumlarda çözücü bileşimi çift pompa sistemi kullanılarak zaman içerisinde değiştirilir, bu durumda yapılan çalışma gradient çalışmadır. Gradient ayırmada sistemden sisteme faklılıkların temel nedeni, çözücünün gradient karışımdan kolon girişine kadar olan hacmidir (dwell volume). Bu hacimdeki değişmenin etkileri, kromotogramda piklerin daha yüksek veya daha düşük alıkonma zamanlarına sebep olur ve iki problemle karşılaşılır. Bunlar;

a) ilk elue olan piklerde ayırmanın azalması

b) kromatogramda çeşitli piklerin belirlenmesindeki karışıklıktır.

İyi bir gradient ayırmada, başlangıç mobil fazın seçimi de çok önemlidir. Mobil fazın bir miktar organik çözücü içermesi durumunda kolon dengelenmesi için gereken zaman daha azdır.

HPLC'de kolondan çıkan maddenin derişimi, kolon çıkışına konulan bir dedektör ile ölçülür. Genellikle tek dedektör sistemi kullanılmakla beraber, birden fazla dedektör sisteminin yer aldığı cihazlar da mevcuttur. En çok kullanılan dedektör UV-görünür bölge dedektörüdür. Bu dedektörle ışığı absorplayabilen bileşenlerin tayinleri mümkündür ve dalga boyunun her bir bileşene göre ayarlanabilmesi nedeni ile seçimli bir dedektör türüdür. UV-görünür bölge dedektör sisteminde seçilen çözücülerin UV-ışınlarını absorpladığı dalga boylarına dikkat edilmeli ve seçilen çalışma dalga boyu çözücünün absorpsiyon yaptığı dalga boyu değerinden yüksek olmalıdır. (CH_3OH 205 nm, CH_3CN 190 nm, v.b.). Bu durum özellikle düşük dalga boylarında absorpsiyon yapan örnekler için son derece önemlidir Ayrıca elue edicinin pH değerinin UV-görünür bölge spektrumunu etkileyeceği de göz önünde bulundurulmalıdır. Sıvı kromotografisinde kullanılan fluoresans dedektörler, kendisi veya türevleri floresans özellik gösteren bileşiklere duyarlıdırlar ve çok seçimli sinyal verirler. Elektrokimyasal dedektörler, kolaylıkla indirgenebilen veya yükseltgenebilen bileşiklere duyarlıdırlar. Kromatografi kolunundan iyon halinde çıkan bileşiklerin izlenmesinde iletkenlik ölçümü yapan kondüktometrik dedektörler de kullanılabilir. Bir diğer dedektör de refraktometrik sıvı kromatografisi

dedektörü olup, kırılma indisi (RI) ölçümünü temel alır, seçimli olmayan bir dedektör türüdür. Bu dedektörle yapılan ölçümlerde sıcaklık kontrolünün çok iyi yapılması gerekir. Çeşitli dedektörlerin seçiminin mümkün olabildiği yüksek performans sıvı kromatografisinde basitçe aşağıdaki şema dedektörlerin karşılaştırılması amacı ile kullanılır.

Çizelge 1.1.1 HPLC dedektörlerinin başlıca özellikleri

	UV-Görünür	Fluoresans	Elektrokim.	İletken	RI
Cevap	Seçimli	Seçimli	Seçimli	seçimli	Üniversal
Duyarlık	ng	Pg	pg	pg	µg
Tayin limiti (g/mL)	10^{-10}	10^{-11}	10^{-11}	10^{-10}	10^{-7}
Sıcaklık duyarlılığı	-	+	+	+	+

HPLC yönteminde elde edilen kromatogramda pik1ere ait alıkonma zamanları kalitatif amaçla kullanılabilir. Ancak bu amaçla kullanılabilmesi için öncelikle pik1erin ayrılabilirliği ve kromatogramın tekrar1anabilirliği iyice anlaşılmalı ve saf standardın alıkonma zamanı ile örneğe ait pikin alıkonma zamanı aynı ise, yorum yapılmalıdır (Aynı akış hızı aynı çözücü ve aynı sıcaklıkta). Saf standartlarla alınan kromotogramlardaki alıkonma zaman1arı ile bir karışımdaki alıkonma zamanlarının farklılığı dikkatle izlenmelidir. Şüphelenildiği durumda, saf maddeden örneğe katılarak yeni bir numune hazırlanmalı ve bundan enjekte ederek pik tespiti gerçekleştirilmelidir. Aynı alıkonma zamanına sahip birden fazla bileşenin olabileceği durumlarda farklı dalga boylarında çalışma yaparak veya türev hazırlayıp, hazırlanan türevin farklı alıkonma zamanları değerlendirilerek yorum yapmak mümkündür. İki da1ga boyunda, hem standart hem de örnek ile çalışma yapılarak ve her biri için bu dalga boylarına ait

cevap1ar oranlanarak, oran bulunmalı ve oran aynı ise aynı madde, farklı ise, farklı madde yorumu yapılmalıdır.

Kantitatif analizde ise, çeşitli pik ölçüm teknikleri yardımı ile değerlendirme yapılır. Üçgen oluşturma, pik yüksekliği, kesme, tartma, sayısal integratör ve bilgisayar teknikleri kullanılarak pikler, değerlendiri1ir. En iyi doğruluk ve tekrarlanabi1irlik için temel çizgi, yatay ve gürültüsüz olmalıdır. Aksi halde doğru1uk ve/veya tekrarlanabilirliğin düşeceği bilinmelidir. Piklerin kantitatif değerlendirilmesinde dış standart ve iç standart yöntemlerinden yararlanılır. Dış standart yönteminde saf standardın derişimi belli çözeltisi uygun şekilde seyreltilir, aynı hacimde enjeksiyonlar her bir derişim için uygulanır ve alan tespit edilir, takriben alan-derişim grafiği çizilir. Daha sonra örneğin aynı hacmi enjekte edilir, okunan pik alanı değeri çalışma grafiğinde değerlendirilir.

Çalışma grafiği (alan-derişim) lineer olmalıdır. Her tayin öncesinde kalitatif yorum yapılmalı ve yorumdan hareketle hazırlanan hipotetik karışıma ait çalışma grafiği çizilmelidir. Grafik çizmeksizin cevap k değeri de kantitatif amaçla kullanılabilir.

İç standart yönteminde ise kimyasal yapısı örnek bileşenlerine kısmen benzeyen, ancak tüm diğer piklerden farklı alıkonma zamanı olan bir madde seçilir. Standardın belli derişimdeki çözeltileri dikkatle seyreltilirken her birine aynı miktarda iç standart eklenir. Bu durumda grafiğe almada $A_{standart}/A_{içstandart}$ oranı, örnek derişimine karşı grafiğe alınır. Takriben numune aynı koşullarda enjekte edilir. A_n/A_{is} oranı hesaplanır ve grafikte değerlendirilir. Grafik çizmeksizin cevap oranı kullanılabilir. Dış standart yöntemine göre daha zahmetli, ancak çok uzun süre yapılacak analizlerde farklı örnekler farklı kişilerce analiz edilecekse avantajlıdır. Komplike örnek hazırlamadan gelen hatalar, enjeksiyon hacminden gelen hatalar, piklerin alıkonma zamanları kaymalarından gelen hatalar varlığında da en uygun çalışma şeklidir.

1.1.2 Kromatografide Temel Kavramlar

Kromatografide bazı önemli kavramlar kapasite faktörü, seçicilik , ayırma gücü , etkin tabaka sayısı kavramlarıdır.Bu değer, hareketli fazın akış hızı ve kolon uzunluğu ile de değişir. t_o , durgun fazda hiç tutulmayan bir türe ait pikin geliş süresi veya ölü hacmidir. Kromatografide karşılaştırmalarda alıkonma zamanı yerine kapasite faktöründen, k, yararlanılır.

$$k = \frac{t_R - t_o}{t_o}$$

Burada t_R ,bileşene, t_o, kolonda tutunmayan türe ait alıkonma zamanlarıdır. k değerinin büyük oluşu, bileşenin sabit fazda iyi tutulduğu için kolon boyunca yavaş ilerlediğini; k değerinin küçük olması, bileşenin hareketli faza ilgisinin fazla olmasından dolayı kolon boyunca hızlı ilerlediğini gösterir. HPLC ayırmalarında k, mümkün olduğunca 1-10 arasında tutulmalıdır. k çok küçükse, bileşik, çözücü pikinden ayrılamaz; k çok büyükse ayırma işlemi çok zaman alır. k değerlerinin bu aralıkta olması, hareketli faz ve durgun faz bileşimlerinin değiştirilmesi ile sağlanır. RPHPLC de yüklü türlerin tutulması , genellikle nötrallerden daha azdır. Zayıf bir monoprotik asitin ODS veya polimer esaslı kolonda tutulması ile ilgili kapasite faktörü ve mobil faz pH'sı arasındaki ilişki aşağıdaki bağıntı ile verilir (Poole ve Poole, 1997).

$$k = \frac{[HA]k_{HA} + [A^-]k_{A^-}}{[HA] + [A^-]}$$

İki pikin birbirinden ayrılması seçicilik faktörü, α ile verilir.

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_{R2} - t_{R0}}{t_{R1} - t_{R0}}$$

dır. α, 1,15 ise iki bileşiğin birbirinden ayrıldığı kabul edilir (%98).

Bir kromatografi kolonunun boyu, L, ile hesaplanan N değeri kullanılarak, kolondaki bir kuramsal plakanın yüksekliği, H hesaplanır. t_R'nin değeri, L ile doğru orantılı, t_R/t_W'nin değeri ise $(L)^{1/2}$ ile doğru orantılı olduğundan, bir pikin genişliğinin ölçüsü olan t_W değeri de $(L)^{1/2}$ ile doğru orantılı olarak artar. Bir kolonda N değeri ne kadar büyük ise, yani H değeri ne kadar küçük ise, kolonun verimi o kadar yüksektir. H'nin değerini büyüten her etken, kolonun verimini düşürür ve pik genişlemesine neden olur.

Birbirini izleyen iki pik arasındaki ayırma gücü, R_S, için farklı hesaplama yöntemleri geliştirilmiştir. Aşağıdaki bağıntı kullanılarak hesaplama yapılabilir.

$$R_S = (1/4)\sqrt{N}\ [(\alpha-1)/\alpha]\ [k/(1+k)]$$

Burada;

R_S : Pik çifti için ayırma gücü,

$\sqrt{N}$: Etkin tabaka sayısı,

α : Seçicilik faktörü,

k : Kapasite faktörü

dür.

Ayırma gücü için geliştirilen diğer bir bağıntı, aşağıda verilmiştir.

$$R_S = 1{,}18 \times \frac{(t_2 - t_1)}{W_{0,5} + W_{P0,5}}$$

Burada;

R_S : Pik çifti için ayırma gücü,

t_1 : Birinci pikin alıkonma zamanı, s,

t_2 : İkinci pikin alıkonma zamanı, s,

$W_{0,5}$: Birinci pikin zaman ekseninde yarı genişiliği,

$W_{P0,5}$: İkinci pikin zaman ekseninde yarı genişiliği

dir.

1.1.3. HPLC kolonları hakkında genel bilgi

HPLC'de dolgu maddesi olarak kullanılanların çoğu silika esaslı bağlı fazlar içerir. RPLC de sıklıkla kullanılan durgun fazlar C_8, C_{18} düz zincirli alkil gruplu silika yapısındadır. Bunlar 1-8 pH aralığında kullanılırlar. Aynı türde olsa dahi farklı kolonlar asidik ve bazik çözünenlere farklı şekilde davranır. Kolon etkileri, temelde fiziksel ve kimyasal olmak üzere iki kategoriye ayrılır. Fiziksel etkiler, faz oranlarında farklılaşmaya yol açar, bu da farklı kolonlarda kapasite faktörlerinin farklı olmasını doğurur. Ayrıca gözenek boyutundaki ve yüzey yükündeki farklılıklar da büyük ve/veya yüklü çözünenlerin alıkonmasına etki edebilir. Kimyasal etkiler, orijinal silika ve bağlama işlemlerindeki farklılıklardan doğar. Bağlamada mono, di ve tri fonksiyonlu reaktifler kullanılabilir. Bunlarla yapılan işlemi az miktarda silanize eden maddeler takip edebilir. Ana silikanın kimyasal etkileri, yüzeyde safsızlıkların bulunmasından veya silanol gruplarının etkisiyle olabilir. Silanol gruplarının bozucu etkisi, silanol gruplarının daha fazla olduğu durumda daha etkindir. Silanol grupları yüzeyde aşağıda verilen denklem gereği iyonlaşır.

$$SiOH \Longleftrightarrow SiO^- + H^+$$

Bu denge, $pK_{a,SiOH}$ iyonlaşma sabiti ile karakterize edilir ve sabitin değeri 6,5'dir. Ayrıca silanol gruplarının farklı çevreleri nedeniyle yüzeyde farklı tipte silanol grupları vardır. Komşu silanol gruplarının iyonlaşması ile komşu koşulların değişmesi söz konusudur . Silanol grupları çözünen moleküller ile elektrostatik olarak etkileşebilir. Bu etkileşimler uzun mesafede etkindir ve çözünen moleküller yüzeye yaklaşamayacak kadar büyük olduğunda bile büyük rol oynar. Silanol grupları mobil fazın bileşenleri ile (su, organik modifiyer, tampon iyonları) etkileşebilir ve durgun fazın yapısını ve bileşimini değiştirebilir. Silanol gruplarının iyonlaşması $pK_{a,SiOH}$'ın üzerindeki pH değerlerinde durgun fazın negatif yüklenmesine sebep olur. Bu durum - yüklü iyonların porları terk etmelerine yol açar. Sonuçta negatif k değerleri görülebilir. İyonik dışlama, hareketli fazın iyon şiddetinin artması ile minimize edilebilir. Mobil fazın yüksek iyon şiddeti, silanolü maskeleme etkisi nedeniyle pik şeklini iyileştirir. Ancak bu durum kolon bozunmasının artmasına sebep olabilir.

1.1.3.1 Normal faz kromatografisi

Buradaki temel mekanizma adsorbsiyon kromatografisidir. Polar gruplar, silika yüzeyindeki adsorbsiyon noktalarına en kuvvetli şekilde ilgi gösteren gruplardlr ve bu yüzden polar bileşikler non-polar olanlardan çok daha kuvvetli olarak alıkonurlar. Alıkonma hareketli fazın polaritesini arttırmakla azaltılabilir. Farklı çözücü karışımları kullanmak suretiyle bir örnek içindeki bir grup bileşiğin ayrılmaları sağlanabilir. Su, silikayı kuvvetli bir şekilde kuşatır ve hareketli fazın su içeriği silika yüzeyinin sabit aktivitesini sürdürebilmek ve bu şekilde de tekrarlanabilen alıkonma zamanları sağlayabilmek için kontrol edilmelidir. Bu olay. hareketli faz çok düşük polariteye sahip olduğunda büyük önem taşır. Bununla birlikte hareketli fazda düşük konsantrasyonda su kullanılabilir. Örnek silikanın polar hidroksil gruplarıyla etkileşir. Ayırım, farklı örnek moleküllerinin polar fonksiyonlarındaki farka dayanır ve en polar moleküller daha güçlü adsorbe olarak alıkonur. Dolgu maddesinin hareketli faza göre daha polar olduğu normal

faz kromatografisi için en tipik hareketli fazlar, hekzan, diklorometan, kloroform, dietil eter ve bunlarln karışımlarıdır. Normal faz kromatografisi, dolgu maddesinin hareketli fazdan daha polar olması kaydıyla siyanopropil ve aminopropil grupları gibi çeşitli fonksiyonel grupların silika molekü1üne bağlandığı bağlı faz silika dolgu maddeleriyle de yapılabilir Silanol gruplarının farklı asitlik derecesine sahip olduğu bilinmektedir.
Molekül içi hidrojen bağının meydana geldiği komşu silika atomlarında yerleşmiş en asidik olanlar genellikle kimyasal absorpsiyon, pikte kuyruklanma ve kolonun dengelenme zamanlarında uzama gibi istenmeyen kromatografik etkilere yol açmaktadır. Ayrıca, silikanın asidik yüzeyi aminler gibi bazik bileşiklerin daha kuvvetli alıkonmasına neden olur. Bu nedenle bu tip bileşiklerle ters faz kromatografisini kullanmak daha avantajlıdır.

1.1.3.2 Ters faz kromatografisi

ODS-silika üzerinde ters faz kromatografisi için kullanılan hareketli fazlar genellikle tampon çözeltisiyle asetonitril ya da metanol karışımlarıdır. Alıkonma, dolgu maddesi üzerindeki alkil zincirleri ve maddeler arasındaki hidrofobik etkileşimler tarafından kontrol edilir. Alıkonma zamanları maddenin polaritesi azaldıkça artar. Yani, polar bileşikler kolonu daha önce terkeder. Diğer bir deyimle alıkonma zamanı hareketli fazın polaritesini yani su içeriğini yükselterek artırılabilir. Hareketli fazın pH'ı ve bileşiğin pKa'sı da önemlidir. Çünkü noniyonize bileşikler daha uzun alıkonma zamanlarına sahiptirler. Böylece pH arttırıldıkça asitler alıkonma zamanında azalma, bazlar ise artma gostermektedir. Enjekte edilmiş bir örneği analiz etmek için yeterli kapasitede bir tampon kullanmak çok önemlidir. Aksi halde kromatografi süresince iyonik şiddetdeki değişikliklerden dolayı piklerde kuyruklanmalar ortaya çıkar. Bazik azot atomları içeren maddeler, dolgu maddesi üzerinde silanol gruplarının kalıntılarıyla etkileşimlerden dolayı kuyruklanmış pik verirler. Bu durum, silika üzerindeki adsorbsiyon noktaları için madde ile yarışan hareketli faza bir düzenleyici (modifier) olarak kuaterner amonyum bileşiklerinin ya da aminlerin katılması ile düzeltilebilir. Dietilamin. trimetilamin ve trietilamin gibi küçük molekül ağırlığına sahip aminler tampon sisteminin içinde

kullanılabilirler. Alıkonmada azalma alkil zincirinin uzunluğundaki azalma ile orantılıdır.

Silika, özellikle, oktadesilsilan (C18), oktasilan (C8), aromatik fenil ve siyano grupları gibi çeşitli fonksiyonel grupların bağlanabileceği reaktif bir substrattır. Silikaya bu şekildeki nonpolar grupların bağlanmasıyla silika yüzeyi nonpolar bir hale gelir ve dolgu maddesinin hareketli faza göre daha az polar olduğu bu sistem ters faz kromatografisi olarak bilinir. Bu şekilde, daha nonpolar bileşikler nonpolar kolon dolgu maddesi ile etkileşince kolonu daha geç terkederler. Tipik hareketli fazlar, su, sulu tamponlar, metanol, asetonitril, tetrahidrofuran ve bu organik çözücülerle su veya tampon çözeltilerin karışımlarıdır

Çizelge 1.1.2 Normal ve ters faz kromatografisi özellikleri

Faz	Normal Faz	Ters Faz
a. Sabit Faz	Polar (Silika)	Nonpolar (Kaplanmış silika, hidrofobik) C_2(dimetil),C_6(hekzil), C_8(oktil) ,C_{18}(oktadesil)
b.Mobil Faz	Nonpolar (Hekzan , kloroform)	Polar metanol,asetonitril,THF,su, pH ayarlama

1.1.4 Yüksek performanslı sıvı kromatografide yöntem geliştirme

Sıvı kromatografik bir yöntemin geliştirilmesinde üzerinde durulacak en önemli husus, yeterli ayırmaya ulaşıldığının belirlenmesidir.Bu yöntemler, genellikle mobil fazın bileşiminin (su-organik faz oranı) optimize edilmesinde kullanılır.

Yüksek performanslı sıvı kromatografide ayırmanın optimizasyonu, seçiciliğin maksimum hale getirilmesini gerektirir. Kromatografik sistemin seçiciliği,

kromatografik sistemde çözünen, mobil faz bileşenleri ve durgun faz arasındaki bütün etkileşimleri yansıtır. Bu etkileşimler, sıcaklık, mobil fazın yapısı gibi deneysel koşulların değiştirilmesiyle yönetilebilir. Seçicilik, çözünenlerin dağılma katsayıları ile ilgilidir ve çözünenlerin kapasite faktörlerinin bir fonksiyonudur. Bu nedenle çözünenlerin alıkonma davranışlarını ve onların deneysel koşullara bağımlılığını anlamak, seçiciliğin ve devamında ayırmanın optimizasyonu için gereklidir.

Çözünenlerin alıkonma davranışını kontrol eden önemli deneysel parametreler, sıcaklık (Carr et al. 1986), mobil faz bileşimi ve mobil faz pH'sıdır. Bir çok durumda sıcaklık, mobil faz organik modifiyer derişimi ve pH değerlerinin kapasite faktörü üzerindeki etkileri incelenerek, deneysel parametreler arasındaki bağıntılar anlaşılmaya çalışılır. Bu çalışmalarda, pH ve organik modifiyerin sabit olması sağlanarak sıcaklık değişiminin etkisi; pH ve sıcaklığın sabit olması sağlanarak organik modifiyerin etkisi ve organik modifiyer ve sıcaklığın sabit olması sağlanarak pH değişiminin etkisi incelenir.

Mobil fazın bileşimi, ters faz sıvı kromatografide bileşiklerin alıkonmalarında en önemli rolü oynar(Roses ve Bosch, 1993; Roses et al. 1996;). Mobil faz olarak kullanılan çözücü karışımlarında polarite, mobil fazın elue etme gücünün bir ölçüsüdür ve RPHPLC'de çözünenin alıkonmasını etkileyen temel faktördür. RPHPLC'de alıkonma, mobil faza su ilavesiyle mobil fazın polaritesinin artmasıyla artar. Bu güç çoğu kez organik çözücü-su karışımlarında organik fazın yüzdesi ile ifade edilir. Sabit pH'da alıkonmanın çözücü bileşimi ile değişimini belirlemek üzere aşağıdaki doğrusal yaklaşım kullanılır (Schoenmakers et al. 1991; Schoenmakers ve Tijssen, 1993).

$$\ln k_i = \ln k_0 - S\varphi$$

Burada k_0, φ 0 olduğunda (mobil faz olarak damıtık su veya tampon kullanıldığında) ekstrapolasyonla bulunan kapasite faktörü ve S eğimdir. Kapasite faktörü 1-10 arasında değilse lnk'nın φ'ye göre çizimi bir eğri verir. Bu eğri, bağıntıya kare terimi ilave edilerek ifade edilir.

$$k_i = k_0.\exp(-S\varphi + Q\varphi^2)$$

Asetonitril, RPHPLC çalışmalarında düşük absorpsiyonu, düşük vizkozitesi ve simetrik pik şekli verebilmesinden dolayı organik modifiyer olarak tercih edilen bir organik çözücüdür (Marcus ve Nigron, 1991).

Solvatokromik çözücü-polarite ölçümleri, kromatografik alıkonmada mobil faz polaritesinin değişmesinin bağımsız incelenmesine imkan tanır. RPHPLC'de ve diğer kromatografi türlerinde tutunma olayını incelemek için kullanılan iki solvatokromik skala vardır. Dimroth ve Reichardt'ın $E_T(30)$ skalası, tek parametre skalasıdır. $E_T(30)$ skalası, 2,6-difenil-4-(2,4,6-trifenil-N-piridino) fenolat (ET30, Dimroth-Reichart betaini) molekülünün elektronik absorsiyonuna ait λ_{max} değerinin çözücünün polaritesi ile değişmesini belirtmektedir. Bu değer, aşağıdaki bağıntı ile bulunur (Johnson et al. 1986).

$$E_T(30)(\text{kcal/mol}) = 28591/(\lambda_{max}(\text{nm})$$

ET 30 kullanılarak belirlenen polarite değerleri, $E_T(30)$ olarak verilir. Yaklaşık 200 çözücü ve çözücü karışımının $E_T(30)$ değerleri bilinmektedir. $E_T(30)$ çözücü polarite skalası, hidrojen bağı donör kabiliyetine (HBD) olduğu gibi çözücünün dipolarite / polarizlenme özelliğine de duyarlıdır. Verilen bir çözücünün $E_T(30)$ polaritesi, dipolarite/polarizabilite skalasına (π^*) ve hidrojen bağı asiditesi skalasına (α) aşağıdaki verilen eşitlikle bağlanabilir.

$$E_T(30) = 28{,}21 + 12{,}40\,\pi^* + 14{,}40\,\alpha$$

log k değerleri ile $E_T(30)$ mobil faz solvatokromik parametresi arasında doğrusal ilişki son derece önemlidir. log k değerleri ile çözünenin $E_T(30)$ değeri arasındaki ilişki, log k'nın organik modifiyerin mol kesrine olan ilişkisinden daha iyi bir doğrusallık gösterir. Kromatografik çalışmalarda $E_T(30)$ parametresi yerine E_T^N normalize edilmiş parametre

(birimsiz) tercih edilmektedir. Normalize edilmiş parametre aşağıdaki bağıntı ile bulunur.

$$E_T^N = [E_T \text{ (çözücü)} - E_T(TMS)] / [E_T \text{ (su)} - E_T(TMS)]$$

Metanol-su ve asetonitril-su çözücü karışımları için bu değerin su içeriği arttıkça arttığı bilinmektedir (Çizelge 1.1.3, Krygowski et al.1985; Bosch et al. 1994). Metanol-su ve asetonitril-su karışımları için belli derişimler dikkate alınarak bu değerler çizelgede verilmiştir (Bosch et al. 1994).

Çizelge 1.1.3. Metanol-su ve asetonitril-su karışımları için E_T^N değerleri

Çözücü %	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Metanol	1,000	0,960	0,926	0,896	0,870	0,848	0,827	0,809	0,792	0,777	0,764
Aseto Nitril	1,000	0,947	0,903	0,867	0,836	0,810	0,787	0,767	0,749	0,712	0,462

Çözünenlerin nötral ve anyonik formlarının alıkonma parametrelerinin ($t_{R,HA}$, $t_{R,A}$) mobil faz bileşimi ile değişimi, aynı eğilimi gösterir. Mobil fazın organik modifiyeri arttıkça, mobil faz polaritesi ve çözünenin alıkonması azalır. log k ile bu parametre arasındaki ilişki aşağıdaki bağıntı ile verilir.

$$\log k = C + e\, E_T^N$$

Bu bağıntı, kompleks karışımların ayrılmasında deneysel çalışmayı önemli ölçüde azaltır. Burada eğim, çözünenin tutunmasının mobil faz polaritesindeki değişmelere ne dereceye kadar duyarlı olduğunu ifade eder. Bir bileşiğin organik modifiyer derişimi değişik olan iki farklı mobil fazda k değerlerinin ölçümü, kromatografik ayırma için yeterli olabilir. log k - E_T^N lineerliği nedeniyle bir çok durumda iki k değeri ile bu bağıntı kullanılarak mobil faz optimize edilebilir. pK_a değerleri biliniyorsa k için iki

ölçüm, ayırmada pH optimizasyonu için yeterlidir. Bu model, ayırmanın optimizasyonu için farklı organik modifiyer derişimlerinde ve mobil fazın farklı pH değerlerinde bileşiklerin kromatografik davranışlarını tahmin etmemizi sağlar. log k $-E_T(30)$ polarite ilişkisinin , log k -% organik modifiyer ilişkisinden daha iyi olduğu, eğim ve kesimin çözünen, çözücü ve kolona bağlı olduğu, eğim ve kesimin çözünenin boyutunun artması ile arttığı belirlenmiştir (Johnson et al. 1986). Bir çözünenin alıkonması, mobil fazın E_T^N değeri ve birkaç deneysel veri ile bu bağıntıdan yararlanılarak belirlenebilir. $E_T(30)$ skalası, önceleri çözelti özelliklerini doğru olarak ölçen bir parametre olarak gösterilmiştir. Bu parametre, günümüzde kromatografik ayırmada mobil fazın davranışını açıklamak için kullanılabilmektedir.

1.1.5. Mobil Fazda pH Standardizasyonu

Sıvı kromatografide kullanılan mobil fazların pH'sı , genellikle sulu çözelti pH'sı olarak alınmaktadır oysa HPLC çalışmalarında su hiçbir şekilde tek başına mobil faz olarak kullanılamaz. Tampon çözelti halinde veya bir organik modifiyer ile birlikte kullanılır. HPLC mobil fazında organik modifiyer olarak asetonitril ve metanol tercih edilir. Bu ortamlarda pH standardizasyonu ile ilgili çalışmalar mevcuttur. Su organik çözücü karışımında elektrolitin iyonlaşması, seçimli solvasyona çok bağımlıdır ve çözünen-çözücü etkileşimine göre değişir. Bu nedenle kimyasalların HPLC mobil fazına ve su ortamına ait pK değerleri farklıdır. Organik çözücü-su karışımlarında ortamın dielektrik sabitinin azalması nedeniyle aktivite katsayıları dikkate alınmaktadır. pH'nın sudaki pH yerine mobil fazdaki değerinin kullanılması, çözünenin tutulması ile pH arasındaki ilişkiye çok daha iyi uyum göstermektedir.

Referans değer pH standard çözeltisi(RVS) olarak potasyum hidrojen fitalat çözeltisi seçilmiş ve 0,05 molkg$^-$ esas alınmıştır (Rondinini et al.1987). Metanol-su ve asetonitril- su ortamında (%70'e kadar) potasyum hidrojen fitalat tamponu için çeşitli sıcaklıklarda standard pH değerleri belirlenmiştir. 0,05 m potasyum hidrojen fitalatın (KHPh) su asetonitril karışımlarında çeşitli sıcaklıklardaki pH değerleri (Rondinini et al.

1987; Rondinini ve Nese, 1987;), Çizelge 1.1.4'de verilmiştir. pH standardizasyonunda çok noktalı kalibrasyon da önerilmektedir(Baucke et al. 1993).

Çizelge 1.1.4. Asetonitril su karışımında 0,05 m KHPh için pH_{RVS} değerleri

t^0C	Asetonitrilin kütlece yüzdesi ,%(w/w) ve mol kesri				
	5;0,0226	15;0,0719	30;0,1583	50;0,3050	70;0,5059
15	4,163	4,533	5,001	5,456	6,159
25	4,166	4,533	5,000	5,461	6,194
40	4,178	4,542	5,008	5,475	6,236

Çözücü karışımlarında (metanol-su, asetonitril-su) standart tampon çözeltilerinin referans pH değerleri, pH_s bilindiği için bu karışımlarda pH ölçümleri pH'nın tanımına uygun olarak aşağıdaki bağıntı dikkate alınarak yapılır.

$$pH_x = pH_s + \frac{E_s - E_x}{g}$$

Bu bağıntı, sıvı temas potansiyeli, E_J, referans çözeltinin, PS , değişmesi ile değişiyorsa aşağıdaki şekle dönüşür.

$$pH_x = pH_s + \frac{E_s - E_x}{g} + \frac{(E_j)_x - (E_j)_s}{g}$$

Burada; $(E_j)_x - (E_j)_s$ artık sıvı temas potansiyelidir ve pH ölçülmesinde dikkat edilmesi gerekir (Barbosa et al. 1991; Barbosa et al. 1996). pH ölçümünün yapıldığı hücre aşağıdaki gibi şematize edilebilir.

Referans elektrot | Tuz köprüsü | | S çözücüsünde numune çözeltisi veya tampon çözelti | H^+ duyarlı elektrot

Mobil fazın pH optimizasyonu , çözücü bileşiminin optimizasyonundan çok daha komplikedir. Zira pH'nın değişmesi ile sadece iyonlaşan çözünen yapıların seçicilik ve alıkonma özellikleri değişmez, aynı zamanda pik genişlikleri ve pik simetrileri de değişir. Bu nedenle ayırmanın hesabında pik genişliklerinin ve şekillerinin de göz önüne alınması gerekir.

1.1.6. Standard iIave Metodu

Bir analitik çalışmada kalibrasyon fonksiyonu ve lineer bölge belirlendikten sonra , standardize edilmiş analitik yöntemde standard ekleme yöntemi uygulanır. Örnek alma ve örnek hazırlama, analitik yöntemde belirtildiği şekilde gerçekleştirilir. Eklemeler, derişimin en az iki katı olacak şeki1de veya lineer bölge kullanılarak yapılır. Örnekte parametrenin değeri, ilk bilgi değer ve daha önce çizilmiş kalibrasyon fonksiyonu kullanılarak hesaplanır. Eklenecek parametre, örnekteki derişimin en fazla 4 katı olacak şekilde ve eşit aralıklarla eklenir. En yüksek eklemenin kalibrasyon fonksiyonunun lineer bölgesinde kalmasına dikkat edilir. Aksi taktirde en yüksek derişim olarak seçilen derişim, uygun koşula kadar azaltılmalıdır . 4 ekleme, kabul edilebilir güven seviyesi, zaman ve gerekli değerler için en uygun olanıdır. Bazı analitik standard yöntemler 3 eklemeyi önerir. Ekleme sayısının artması, belli güven seviyesindeki güven aralığını azaltabilir,ancak bu sayının 6'dan fazla olması da boşuna bir analitik çaba demektir. Analiz edilen parametrenin standard çözeltisinin derişimi, ekleme hacmini mümkün olduğunca düşük tutabilmek için yeterince yüksek olmalıdır. Standardların ilavesiyle numune bileşimi seyreleceğinden, parametrenin mümkün olduğunca doygun çözeltisi bu amaçla kullanılır ve eşit kısımlar halinde örneğe eklenir. Bu esnada örnek hacmi, sabit tutulur. Bazı durumlarda , orijinal örneğin hacmini ayarlamak için numuneye çözücü eklenir. Bu durumda toplam hacim ve orijinal örnek hacmi sabit tutulur. Sadece eklenen standardın hacmi ve çözücünün hacmi değişir. Bütün numuneler,

bütün işlem adımlan dahil analitik yönteme göre hazırlanır ve tüm bilgi değerleri kalibrasyon fonksiyonunun hazırlandığı koşullarda okunur . Standard ekleme kalibrasyon fonksiyonunu sınırlayan hiperbollerin çalışma aralığının en düşük bölgesinde birbirinden oldukça uzak olması nedeniyle örneğin derişimi , dış kalibrasyona göre daha geniş bir güven aralığı ile verilir .

Birden faz1a standart ekleme yerine bazı durumlarda tek ilave yeterli olabilir . Bunun için örnekte beklenen derişimin en az iki katı olacak şekilde ilave yapılır . Bu ilavenin, metodun doğrusal çalışma aralığı içinde kalmasına dikkat edilir . Örneğin derişimi , örneğe ait değer ve katkılı örneğin derişimi ile bu örneğe ait değer kullanılarak hesaplanır. Bu iki değer kullanılarak eklenen maddenin deneysel olarak bulunan değerine geçilir. Bu değer, aşağıdaki bağıntıda değerlendirilerek geri kazanma yüzdesi hesaplanır .

$$\%\text{Geri kazanma} = \frac{X_{\text{bulunan}}}{X_{\text{eklenen.}}} . \ 100$$

Bu işlemle hesaplanarak bulunan değer, numuneye eklenen değere hemen hemen eşit olduğunda geri kazanma, yaklaşık %l00'dür ve dış kalibrasyon fonksiyonu kullanılabilir. Geri kazanma değeri, %100'den çok farkettiğinde standart eklemeli kalibrasyon hesaplanmalıdır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Elma suyunda patulin tayini için sıklıkla HLPC kullanılmaktadır. Patulin, alkali pH derecelerinde dayanıksızdır. Gıdalarda patulin sentezi için optimum pH değeri 3,0-6,5 arasındadır. Diğer taraftan ortamdaki patulinin stabilitesini pH değeri önemli düzeyde etkileyebilmektedir. Patulin kaybı, pH değeri 6-8 arasında değişen tampon çözeltilerde farklı olmaktadır (Artık ve Ark.,1995). Patulinin düşük pH değerlerinde daha stabil olduğu belirtilmiştir. 3,5-5,5 pH aralığında 125 ^{o}C ye kadar ısıtılan patulinin, ısıl işlemle inaktivasyona karşı dayanıklı olduğu belirtilmiştir. (Ekşi ve Karadeniz.,1995). Patulinin asit ortamda stabil olması nedeniyle ısıl işlem ile inaktif hale getirilememesi nedeniyle suda çözünen patulinin meyve suyundan uzaklaştırılması işlemi uygulansa bile patulin meyve suyunda kalabilmektedir. Bu nedenle tanklara azot gazı verilmesi gerekir (Artık ve Ark.,1995). Çeşitli şekillerde zedelenen meyvelere bulaşan , patulin üreten küfler; taşıma ve kısa süreli depolamada hızla gelişmekte ve meyvelerde patulin oluşturmaktadır. Oluşan patulinin elma içine difüzyonu değişik şekillerde olmaktadır. Patulin yalnızca küf üremesi olan bölgede meydana gelmekte ve bu bölge uzaklaştırıldığında elmanın diğer kısımları meyve suyu üretiminde kullanılabilmektedir. Çürümüş elmalarda , çürük dokudan sağlam dokuya geçen patulin miktarının oluşan toplam patulinin % 0,0-5,1'i kadar olduğunu ve çürük kısmın ayıklanması ile %94.9-100 düzeyinde patulinin temizlenebileceği belirtilmiştir. Elmanın küflü kısımlarının uzaklaştırılması için basınçlı su kullanımı yaygın bir uygulamadır. Bu durum özellikle meyve suyu endüstrisinde büyük önem taşımaktadır. Elma dokularında hücreler arası boşluklarda bulunan gazın patulin difüzyonunu engellediği de açıklanmaktadır. Modifiye atmosferin elmalarda hem küf gelişimini hem de patulin sentezini engellediği belirtilmiştir. % 10 CO_2 içeren atmosferin patulin sentezinin azalmasında etkili olmasına karşın ,küf gelişimini önemli düzeyde engellemediği de bildirilmiştir. Küf gelişimine uygun olan her sıcaklık derecesinde patulin sentezlendiği bildirilmiştir. Su aktivitesinin şeker katkısı ile azaltıldığı bir araştırmada, şeker katkısının küf gelişimini arttırmasına rağmen patulin sentezini azalttığı belirtilmiştir. *Byssochiamsy nivea*'nın suşlarının zedelenmiş elmalarda ve haşlanmış pirinçte patulin sentezlediklerini ancak

zedelenmiş armut veya domateste sentezlenmedikleri belirtilmiştir. Ayrıca kayısı, çilek, muz ve patateste hiçbir gelişim gözlenmediği belirtilmiştir. Bu durumun , söz konusu meyvelerin kimyasal bileşimleri ile ilgili olduğu bildirilmektedir. Patulin ve penisillik asit, üzüm ve elma sularında stabilken, portakal sularında tiyollerle olan reaksiyonlarından dolayı stabil değildir.

Elma ürünlerinin endüstriyel işlemlerden vakum destilasyonu ile konsantre edilmesi sırasında 90 ^{o}C'de 10 saniye süreyle uygulanan pastörizasyon işleminin patulin miktarını tamamen yok edemediği belirtilmiştir (Chao vd., 2000) . Patulin, elma suyu paketlendikten sonra ve depolanma sırasında bir miktar azalmaktadır. Patulin içeren elma suyuna askorbik asit ilavesiyle miktarının azaldığı hatta belli süre sonra yok olma düzeyine geldiği fakat bu reaksiyondan sonra bilinmeyen toksinlerin ortaya çıkmasına sebeb olduğu belirtilmektedir. Bununla beraber, elma şarabı gibi mayalanmış elma suyunda ise mayada bulunan *Saccharomyces* türü bakteriler tarafından uçucu olmayan suda çözünebilir maddelere dönüştürülmesinden dolayı patulin daha az bulunmaktadır.

Hernandez ve Bartolome (1992) çalışma grubunun yaptığı çalışmada Patulinin asetonitril içinde hazırlanmış çözeltileri eser düzeyde patulin içeren elma suyu örneklerine ilave edilmiş etil asetatla ekstrakte edilmiştir. Etil asetatın kullanımı geri kazanımı yükseltmiştir.. 25 mL elma suyu örneği 20 mL etil asetatla 6 kez ekstrakte edilmiş, organik fazlar birleştirilmiştir. 30 dakika susuz sodyum sülfat ile bekletilmiş, filtre edilmiş kuruluğa kadar buharlaştırılmıştır. Kalıntı 1 mL %50 lik metanol/su içinde çözülmüş 10 μL'si HPLC' ye enjekte edilmiştir. Bu çalışmada ters faz kolon Novapak C_{18}(300x3.9 mm i.d.) kullanılmıştır. Gradiyent çalışmada a çözeltisi % 2'lik asetik asit çözeltisidir. Su-metanol-asetik asit (68:30:2)(v:v:v) çözeltisi B çözeltisi olarak kullanılmıştır. Fotodiyod array dedektörle dalga boyu taraması 210 nm' den 400 nm' ye kadar yapılmıştır. Bu yöntemde tayin sınırı 8,96 μg/L olarak bulunmuştur. Alan-derişim kalibrasyon grafiği için korelasyon katsayısı r = 0.961 olarak bulunmuştur.

Javier ve arkadaşlarının (1993) yaptığı bir çalışmada patulinin çalışma çözeltileri 50 ve 5 μg /L derişimde asetonitril ortamında hazırlanmış; 40 °C' de saklanmıştır. Katı faz ekstraksiyonu için silika Seppak kartuş 5 mL kloroform ile şartlandırılmıştır, ekstrakt kartuşa uygulanmış ve 1 mL kloroform ile elue edilmiştir. HPLC analizlerinde mobil faz olarak % 1 lik THF 1mL/dakika akış hızıyla geçirilmiş ve absorbanslar 275 nm' de kaydedilmiştir. Patulinin kalibrasyon grafiği 0,05 ile 5 ng arasında lineerdir. Örnek çözeltileri % 1'lik THF içinde 20 μL olarak enjekte edilmiştir.

Gökmen ve Acar (1998) tarafından yapılmış bir çalışmada elma suyu konsantrelerinde brix'i en az 69,6 en çok 76,2 olan örnekler +4 C^{0} 'de saklanmıştır, Brix'i 11,2 ye ayarlandıktan sonra analizi yapılmıştır. Kolon olarak 5 μ Elsi Sphere C_{18}(150x40 mm i.d.), sabit fazlı kolon seçilmiştir. Koruyucu kolon olarak Mikropak C_{18} (40x4 mm i.d.) kullanılmıştır. Mobil faz olarak % 1 asetonitril 1 mL/dak akış hızında kolondan geçirilmiştir. Patulin 5 mL elma suyunu 10 mL etil asetat ile çalkalanarak 2 kez ekstrakte edilmiş, sonra organik faz %1, 5 'luk sodyum karbonatın 2 mL'si ile yıkanmış, ayrılan sulu faz 5 mL etil asetat ile 1 dakika daha çalkalanarak tekrar ekstrakte edilmiştir. Birleştirilen organik fazlar 2,5 g susuz sodyum sülfat ile kurutulmuştur. Ekstrakt kuruluğa kadar 40 C^{0}'de su banyosunda N_2 atmosferi altında evapore edilmiş. Elde edilen kalıntı asetik asitle pH 4'e ayarlanmış 500 μL saf suyla çözülmüş 10 μL'si kolona enjekte edilmiştir. Bu çalışmada stok standart patulin çözeltisi, 5 mg patulin (merck) 25 mL etil asetatatta çözülmüş bu çözeltiden 100 μl alınarak 10 mL'lik balonda N_2 gazı ile oda sıcaklığında evapore edilmiş, kalıntı asetik asitle pH 4'e ayarlanmış 10 mL saf su ile çözülmüştür. Çalışmada geri kazanımın %94,2 ila %125 arasında değiştiği belirlenmiştir. Bu yöntemde tayin sınırı 4 μg /L dir.

Michael ve Peter (1998) tarafından yapılan bir başka çalışmada ^{13}C etiketlenmesiyle LC/MS ve HPLC /UV sisteminden yararlanmışlardır. Kullanılan kimyasallar N,O–bis(trimetilsilil) trifloro asetamid (BSTFA), patulin, sodyum karbonat, perflorokerozen, sodyum sülfat, Tween 80'dir. Özel toplanmış elmaların suları sıkılıp 78^{o}C' de 3 dakika

pastörize edilmiş, cam şişede saklanmıştır kıyaslama yapmak için marketten alınmış golden türü elmalar 5 dakika 100 ^{o}C' de pastörize edilip –30^{o}C' de saklanmıştır. Patulinin standart çözeltisi 5 mg patulinin 50 mL kloroformda çözülmesiyle hazırlanmış bundan 250 μL alınmış kuruluğa kadar buharlaştırılmış ve kalıntı 5 mL etanolde çözülmüştür. Derişimler spektrofotometrede hesaplanmıştır. 5 mL örnek 2 kez 10 mL etil asetatla ekstrakte edilmiş $^{13}C_2$ katkısı 1:3 ile 3:1 oranında yapılmıştır. Organik fazlar 2 mL % 1,5 lik sodyum karbonatla yıkanmış 10 mL etilasetat ile tekrar ekstrakte edilmiştir. Susuz sodyum sülfatla bekletildikten sonra kuruluğa kadar buharlaştırılmıştır.Çalışmada Nucleosil Reverse Phase C_{18} (250x4.0 mm i.d. 5 μm) kolon kullanılmıştır. % 5 'lik asetonitril taşıyıcı fazı 1 mL/dakika akış hızıyla kolondan geçirilmiş ve sonuçlar 275 nm' de kaydedilmiştir. Meyve sularına 1, 2, 4, 10 μg/L patulin katkıları yapılmıştır Bu yöntem için dedeksiyon limiti 1,3 μg/L, tayin limiti 4 μg/L, relatif standart sapma %18 (5 örnek için), geri kazanım değerleri % 90 dır. LC/MS ile yapılmış çalışmalarda yüksek çözünürlüklü GC/MS'e göre daha iyi tekrarlanabilirlik ve düşük dedeksiyon limiti gözlenmiştir. ^{13}C etiketlenmiş patulin GC/MS de internal standart olarak kullanıldığında ise HPLC/UV metoduna göre 100 kat daha duyarlı olduğu belirtilmiştir.

Acar ve Gökmen (1999) tarafından yapılan çalışmada elma suyunda, patulin miktarlarının farklı organizmalar tarafından oluşumu ve uygulanan farklı proseslerin etkileri incelenmiştir. Bunun için elma sularında farklı mikroorganizmaların gelişimi sağlandıktan sonra, elma suyu işleme basamaklarından geçirilmiş analizleri yapılmıştır. Uygulanan herbir basamaktaki değişimi belirlenmiştir. Patulin analizleri HPLC ile Gökmen V., Acar J.,(1996) metoduna göre yapılmıştır .proseslere göre patulin değişimi belirlenmiştir.

Sonuçlara göre *P.Expansum* ile inkübe edilen elma sularının patulin oluşumunun en yüksek olduğu , uygulanan işlemlerin patulin miktarında azalmaya neden olduğu belirtilmiştir. Çalışmada aynı zamanda elma sularında bulunan fumarik asit , L-malik

asit ,Laktik asit değişimleri de incelenmiş, fumarik asit seviyelerinin hammaddede mikrobiyolojik kalite açısından bir gösterge olabileceği belirtilmiştir.

Gordon S. Shephard, Norma L.Leggot (2000) yaptıkları çalışmada ince tabaka kromatografisi, HPLC ve Gaz Kromatografik yöntemlerin genel bir değerlendirmesini yapmışlar ve ,daha çok ince tabaka kromatografisi üzerinde durmuşlardır. İnce tabaka kromatografisi ile patulinin tayin sınırı 20 μg/L olarak belirtilmiştir. Bu teknikte patulin başarıyla ayrılabilmiş fakat , doğal olan örneklere uygulanamamıştır.

Diğer bir çalışmada (Gökmen vd., 2001) yaptıkları çalışmada farklı elma suyu berraklaştırma tekniklerinin patulin ,organik asit ve fenoliklerin miktarları üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Altı farklı proses uygulanan elma suları iki gruba ayrılmış ve patulin düzeyleri belirlenmiştir. Grubun birincisinde patulin bulunmazken, ikinci grup *Penicillium expansumla* 27 ^{o}C'de on gün inkübe edilmiş; patulin seviyesi 600 μg/L olarak belirlenmiştir. İki grup birleştirilmiş, pektolitik enzimle 50 ^{o}C'de 2 saat işlem gördükten sonra farklı prosesler uygulanmıştır.
Çalışmada analitik metod olarak Gökmen V.,Acar J.,(1996) tarafından kullanılmış olan patulin analiz metodu kullanılmıştır. Fenolik ve organik asitlerin analizi için Brix 5 ^{0}'ye ayarlı elma suyu 0,45 μm filtre ile süzüldükten sonra HPLC 'ye direkt olarak enjekte edilmiştir. Fenolikler 250x4.6 mm i.d. C_{18} kolondan ikili taşıyıcı fazın farklı oranlarda sürüklenmesiyle ayrılmışlardır. Organik asitlerin ayrımı ise oda sıcaklığında 0,2 mol/L KH_2PO_4 (H_3PO_4 ile pH=2.4 ayarlı) taşıyıcı fazla 0,5 mL/dak. akış hızında sağlanmıştır. Sonuçlar Brix 11,2 'ye göre düzeltilmiştir. Basamaklara uygulanan farklı işlemlerden biri olan toz aktif karbonun patulin giderme etkisinin en fazla olduğu (% 40,9) bunun yanında renk açılmasının gözlendiği belirtilmiştir.

Rychlik , Schieberle (2001) yaptıkları çalışmada çürümüş elmalardaki bozuk dokudan sağlam dokuya patulin difüzyonunu incelemişlerdir. Çürümüş dokudan 1,2,3,4 cm uzaklıklarda doku örnekleri alınarak analizi yapılmıştır. Alınan doku parçaları su ilavesiyle parçalanıp 60 ng [$^{13}C_2$] etiketlenmiş patulin katkısı yapılmıştır. Etil asetat

ekstraksiyonu yapılıp kuruluğa kadar buharlaştırılmış trimetilsilil türevlendirmesi yapıldıktan sonra yüksek çözünürlüklü Gaz kromatografi Kütle spektrometresi ile analizi yapılmıştır. Trimetilsililleme reaktifi N,O –bis (trimetilsilil) trifloroasetamiddir. Bulunan sonuçlara göre patulin çürük bölgede 83,7 ppb patulin 1 cm uzaklıkta 1,27 ppb 2 cm uzaklıkta ise 0,005 ppb 3ve 4 cm uzakta ise $<6x10^{-5}$ ppb olarak belirlenmiştir.

Norma ve arkadaşları (2001) yaptıkları çalışmada elma ürünlerinde patulin düzeyleri incelenmiş olup, 50 μg/kg olan izin verilen sınırı aşan değere rastlanmamıştır. Sekiz örnekte 5 ila 45 μg/L arası bulunmuş, yirmi üç örnekte tayin sınırının altında kalmıştır. HPLC ile ayrımlarında Waters Symmetry C_{18} 150x4.6 mm I.D 5 μm kolonda çalışılmış sonuçlar 275 nm dalga boyunda takip edilmiş ve taşıyıcı faz olarak % 10 asetonitril kullanılmıştır. Tayin sınırı 5 μg/L olarak belirlenmiştir.

Robert ve Kryger'in (2001) yaptıkları çalışmada, patulin'in uçuculuğu incelenmiştir. Elma suyunun konsantrasyon işlemi sırasında hem destilat hem de elma suyu konsantresinin patulin miktarları belirlenmiştir. Bunun için derişimi belirlenen konsantre elma suyu 11,5 Brix 'e seyreltildikten sonra patulin ilave edilmiştir. Son derişim 3420 ppb olmuştur. Patulin ilave edilmeyen örnekte derişim 90 ppb'dir. Destilasyon işlemleri 100 ^{0}C'de 177 dakikada tamamlanmıştır. Toplanan destilatlar ve konsantrelerin ayrı ayrı analizleri yapılmıştır. Başlangıç patulin derişimi 3240 ppb olan örnekte ısıl işlemden sonra 2180 ppb olarak belirlenmiş, fakat destilatta patulin derişimi dedeksiyon limitinin 10 ppb olmasından dolayı bu sınırın altında kalmıştır. HPLC ile analiz için etil asetat ekstraksiyonundan sonra kuruluğa kadar buharlaştırılan örnek pH 4'e asetik asitle ayarlanmış saf su ile çözülüp enjekte edilmiştir

3.MATERYAL VE METOT

3.1 Genel Bilgi

Bu bölümde, elma suyunda Patulin'in kromatografik analizinde kullanılan cihazlar, kimyasallar ve metotlar hakkında bilgi verilecektir.

3.2 Kullanılan Cihazlar

3.2.1 Yüksek performanslı sıvı kromatografi cihazı

5-HMF ve Patulinin kromatografik ayırım ve tayinlerinde , Shimadzu HPLC cihazı kullanılmıştır. Cihaz, sistem kontrol ünitesi (SCL 10 A VP), pompa (LC10 ADVP), dedektör (SPDM 10A VP Foto Diyot Array), oto enjektör (SIL 10 AD VP, 70 Vial Model Rack 7), kolon fırını (CTO 10 AVP) ve gaz giderme biriminden (D GU 14 A) oluşmaktadır**.** Tayinlerde kullanılan kolon Astec C_{18}(100x4,6 mm I.D,3 μm) kolondur. Ayrıca Luna C_{18} (250x4,6 mm I.D ,5μm) kolon da kullanılmıştır.

3.2.2 İyon analiz cihazı

pH ölçümlerinde pH/ İyon analiz cihazı (Mettler Toledo MA 235) kullanılmıştır. Kombine cam elektrottan (Hanna HI 1332 Ag/AgCl) yararlanılmıştır. pH ölçümlerinde sabit sıcaklık banyosu kullanılarak $25^oC \pm 0,1^oC$ sıcaklıkta çalışılmıştır.

3.2.3 Döner buharlaştırıcı

Örneklerin ekstraksiyon aşamasından sonra buharlaştırılmaları Buchi Rotavapor ile yapılmıştır.

3.3 Kullanılan kimyasal maddeler

Çizelge 3.1 Kullanılan kimyasallar ve özellikleri

Kimyasal madde	Açıklama
5-HMF	Sigma
Patulin	Sigma
Susuz sodyum karbonat	Riedel de haen
Susuz sodyum sülfat	Analar
Etil asetat	Merck
Asetonitril	Merck
Metanol	Merck
Tetrabutil amonyum bromür	Sigma
Asetik asit	Merck

3.3.1 Çözeltiler

Çalışmalarda kullanılan gerekli standart çözeltiler ve taşıyıcı fazlar kullanılacakları gün hazırlanmışlardır. Kullanılan su deiyonize saf sudur.

Sodyum karbonat çözeltisi ,% 1,5 w/v, suda

1,5 g tartılmış sodyum karbonattan 100 mL'lik ölçülü balona alınmış .az miktarda suda çözülmüş ve ölçü çizgisine kadar tamamlanmıştır.

Asetik asit çözeltisi pH 4

Deiyonize suyun pH değeri 4,0 olacak şekilde asetik asit ile hazırlanmıştır.

Standart stok patulin çözeltisi

Standart patulinden 5 mg tartılmış 25 mL'lik ölçülü balona alınıp, pH 4 olan asetik asit çözeltisi ile hazırlanmıştır, stok –18 ^{0}C'de muhafaza edilmiştir. Analizden önce bu stoktan uygun seyreltmeler yapılarak çalışma grafiği çözeltileri hazırlanmıştır . Çalışma taze çözeltilerle yapılmıştır.

Standart stok 5-HMF çözeltisi

5-HMF 'den 5 mg tartılmış 25 mL'lik ölçülü balona alınıp pH 4 olan asetik asit çözeltisi ile hazırlanmıştır, stok –18 ^{0}C'de muhafaza edilmiştir. 5-HMF 'nin kantitatif tayini yapılmamıştır patulin pikinden ayrımı gerçekleştirilmesi amacıyla kalitatif olarak alıkonma zamanı belirlenmiştir.

Mobil faz 1

25 ml Asetonitrile 0,0564 g tetrabutilamonyum bromur ilave edilmiş tartılıp pH 4 olan asetik asitle 250 mL'ye tamamlanmıştır.İyon çifti oluşturucunun derişimi 0,7 mM dır.Kolon Nucleosil Macherey Nagel (250x 4,6 mm I.D 5 μm) 'dir.

Mobil faz faz 2

(9:91) Metanol :su(v:v) taşıyıcı fazı hazırlanmıştır. Nucleosil C18 Macherey Nagel (250x 4,6 mm I.D 5 μm) kolon kullanılarak çalışılmıştır.

Mobil faz 3

(5:95) Asetonitril:su(v:v) taşıyıcı fazı hazırlanmıştır. Luna C18 (250x 4,6 mm I.D 5μm) kolonda çalışılmıştır.

Mobil faz 4

(5:95) Asetonitril:su (v:v) taşıyıcı fazı Astec C18 (100x4,6 mm I.D 3 μm) Spherical kolonda çalışılmıştır.

Mobil faz 5

(7:93) Asetonitril:su (v:v) taşıyıcı fazı Astec C18 (100x4,6 mm I.D 3 μm) Spherical kolonda çalışılmıştır.

3.4 Materyal

Bu çalışmada elma suyunda patulin tayini gerçekleştirilmiştir. Patulinin elma suyundan ekstraksiyonu sırasında patulinle birlikte bulunabilen temel bozucu madde olan 5-HMF'dir. Isparta yöresinden toplanmış ve elma suyu haline getirilmiş örneklerde çalışılmıştır.

Örnek hazırlama : % 70 Brix değerinde olan elma suyu konsantresinden 8 mL alıp 50 mL' ye seyreltilerek brix 11,2 olmuştur. Hazırlanmış elma suyunun 5 mL'si ekstraksiyon için ayırma balonuna pipetle konulduktan sonra 10 mL etil asetatla iki dakika çalkalanmış sonra etil asetatlı faz ve sulu faz ayrı ayrı behere konmuştur. Sulu faz tekrar 10 mL etil asetatla iki dakika daha çalkalandıktan sonra sulu faz ayrılmış başka behere aktarılmıştır etil asetatlı fazlar birleştirilmiş 2 mL % 1,5 luk sodyum karbonat çözeltisi ile yıkanmıştır. Bu yıkama süresinin kısa tutulmasına dikkat edilmiştir , Patulinin alkali pH değerlerinde hızla bozunmaya uğradığı dikkate alınmıştır. Sodyum karbonatlı (sulu) kısım 10 mL etil asetatla tekrar çalkalandıktan sonra etil asetatlı fazlar birleştirilmiş sonra 2 g susuz sodyum sülfatla bekletilerek kurutulması sağlanmıştır. Sodyum sülfatı ortamdan uzaklaştırmak için siyah bant filtre kağıdı ile süzülüp filtre kağıdı 1 kez 5 mL etil asetatla yıkandıktan sonra berrak süzüntü 5 damla asetik asit ile asitlendirilmiştir. Döner buharlaştırıcıya uygun balona aktarılan çözelti , kuruluğa kadar

azot gazı atmosferinde vakum altında 40 ±1 ^{0}C de su banyosunda evapore edilmiştir,azot gazı akışı kontrollu sağlanmıştır. Elde edilen kalıntı 500 μL asetik asit çözeltisinde çözülmüş ve HPLC' ye 20 μL'si enjekte edilmiştir.

3.5 Metot

Bu çalışmada elma suyunda patulinin tayini HPLC metodu ile yapılmıştır.HPLC metodunda (5:95) Asetonitril:su taşıyıcı faz ile patulin tayinleri gerçekleştirilmiştir.5-HMF'nin patulinden ayrımı gerçekleştirilmiştir. Metotla ilgili deneysel koşullar bulgular kısmında ;sonuçlar ve ilgili yorumlar tartışma ve sonuç bölümünde verilmiştir.

4.BULGULAR

Mobil faz 1 ile çalışmada

Akış hızı 1,5 mL/dakikadır ; HMF ve Patulinin alıkonma zamanları sırasıyla 3,61 ; 4,39 olarak bulunmuştur

Mobil faz 2 ile çalışmada

Akış hızı 0,8 mL/dakikadır.HMF ve patulinin alıkonma zamanları sırasıyla 12,51; 13,81 olarak belirlenmiştir.

Mobil faz 3 ile çalışmada

Akış hızı 1,0 mL/dakikadır . HMF ve patulinin alıkonma zamanları sırasıyla 7,81; 9,62 olarak belirlenmiştir.

Mobil faz 4 ile çalışmada

Akış hızı 0,8 mL/dakikadır. HMF ve Patulinin alıkonma zamanları sırasıyla 4,72; 6,16 olarak belirlenmiştir. Taşıyıcı fazın belirlenmesinden sonra çalışma grafiği çizilmiştir.

Mobil faz 5 ile çalışmada

Akış hızı 0,8 mL/dakikadır. HMF ve Patulinin alıkonma zamanları sırasıyla 3,91; 4,25 olarak belirlenmiştir.

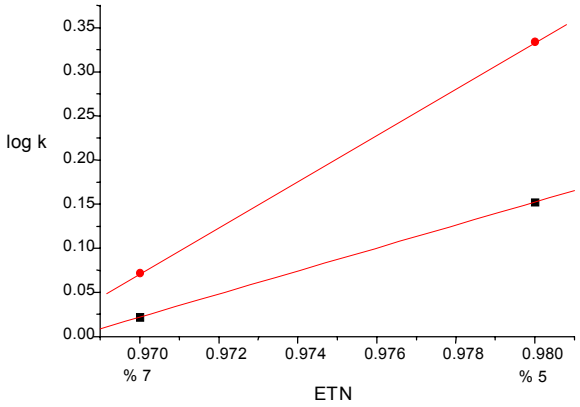
mobil faz 4(% 5 asetonitril:su) ve mobil faz 5 (% 7 asetonitril:su) için log k-E^{T}_{N} grafiği çizilmiştir.

Çizelge 4.1 Alıkonma ve seçicilik faktörleri Mobil faz %5 (v/v) asetonitril-su karışımı Kolon Astec Akış hızı 0,8 mL/dakika .t_o 1,95

Bileşik	t_R	k	Log k	α	R
HMF	4,72	1,42	0,334	-	
Patulin	6,16	2,16	0,152	1,52	6,2

Çizelge 4.2 Alıkonma ve seçicilik faktörleri Mobil faz %7 (v/v) asetonitril-su karışımı Kolon Astec Akış hızı 0,8 mL/dakika .

Bileşik	t_R	k	Log k	α	R
HMF	3,91	1,005	0,022	-	
Patulin	4,25	1,17	0,361	1,16	1,9



Şekil 4.1 HMF ve patulin için log k- E_T^N doğrusal ilişkisi, Asetonitril -su ortamı

■HMF ^{O} patulin

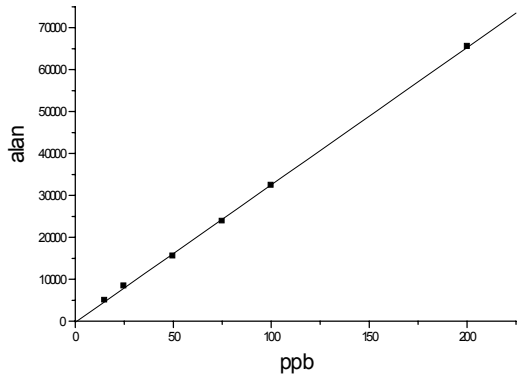
Patulin log k= -0,3923 + 1,3901 E^T_N

HMF log k= -12,63 + 13,04 E^T_N

Elma suyu örneklerinin tayinleri için mobil faz 4 ile elde edilen α değerinin 1,52 olması tayinler için uygun bulunmuştur.

Çizelge 4.3 Mobil faz 4 ve Astec kolonla elde edilmiş çalışma grafiği değerleri

Patulin Derişimi ,ppb	Alan
200	65588
100	32354
75	23824
50	15505
25	8316
15	5116



Şekil 4.2 Patulin Alan-Derişim grafiği

R = 0,9998 SD = 525 N = 6

Y=327 X –292

S_{xo} =SD/m S_{xo}=525/327

S_{xo}=1,60

% CV= $S_{xo}/\overline{x}$ .100% CV=(1,60/77,5) .100

%CV=2,06

Çalışma grafiği her analizden önce yeni çözeltilerle hazırlanmıştır. Dış kalibrasyon grafiğinin yanısıra hazırlanan örneklere geri kazanma değerlerinin belirlenmesi amacıyla

ekstraksiyonların başlangıcında belli derişimlerde standart patulin katkısı yapılmıştır. Standart ilave ile çizilen çalışma grafiğinden elde edilen geri kazanma değerlerine göre sonuçlar düzeltilmiştir.

Çizelge 4.4 Çalışma grafiği verileri

Adı	**Dış Kalibrasyon fonksiyonu**	**r**	**Sxo***	**CV****	**Lineer bölge,ppb**	**N**
Patulin	(328±3,5)C + (-292±344)	0,99978	1,608	2,074	(15-200)	6
Patulin	(328±3,5)C+(-192,17±360)	0,99983	1,608	2,062	(15-200)	5

***Metodun standart sapması**

****Metodun varyasyon katsayısı**

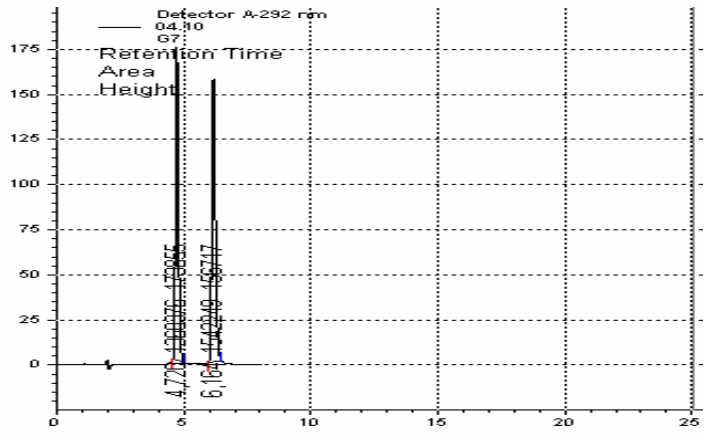
Standart ilavesiyle elde edilmiş çalışma grafiği verileri ise ;N 10

Katkı ppb	Alan	Bulunan derişim ppb*
0	16224	41,91
60	34174	83,76
120	54230	130,5

*on kat deriştirilmiş örnek sonucu

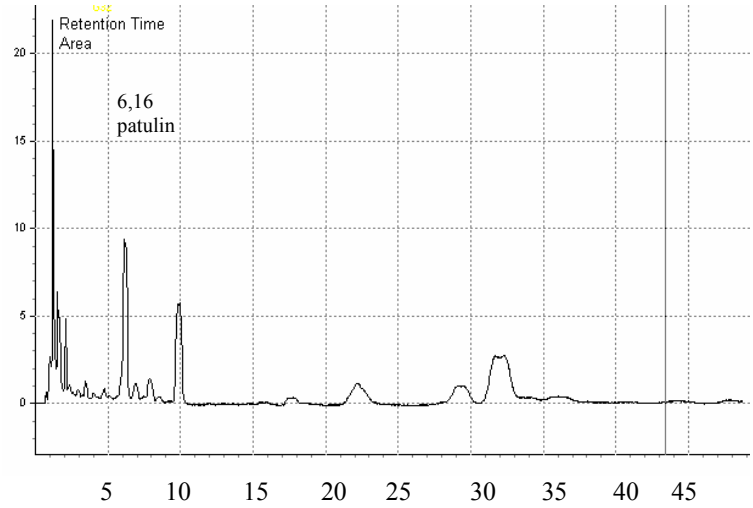
Çizelge 4.5 Standart ilave kalibrasyon grafiği

Adı	**Standart ilave kalibrasyon fonksiyonu**	**r**	**Sxo***	**CV****	**N**
alan	(316,72±10,13)C + (15873±784,86)	0,99949	2,714	0,0078	3
derişim	(0,738±0,024)C+(41,09±1,82)	0,99949	2,735	3,202	3



Şekil 4.3 HMF ve patulin standart karışımının kromatogramı

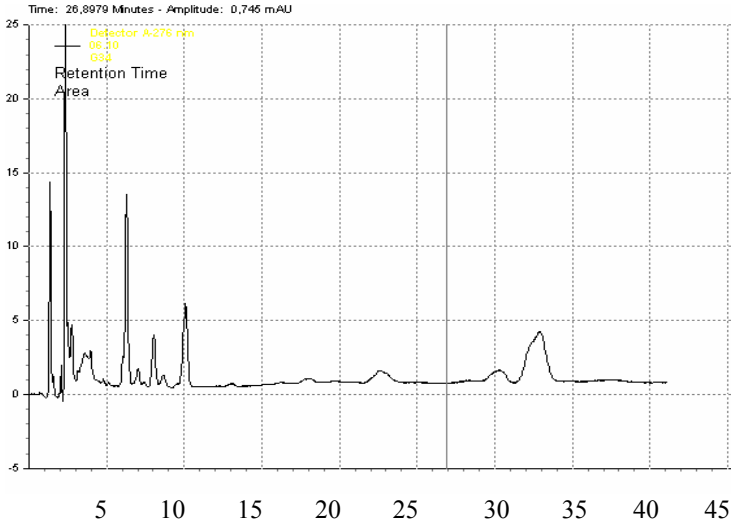
(5:95) Asetonitril:su taşıyıcı faz. Kolon Astec C18 (100x4,6 mm I.D 3 µm)



Şekil 4.4 Elma suyu örneğinin kromatogramı

Astec C18 (100x4,6 mm I.D 3 µm)

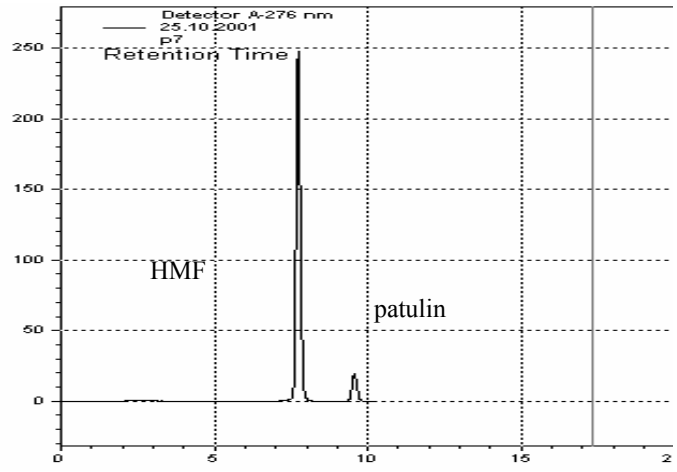
(5:95) Asetonitril:su



Şekil 4.5 Patulin katkısı yapılan örneğin kromatogramı

Astec C18 (100x4,6 mm I.D 3 µm)

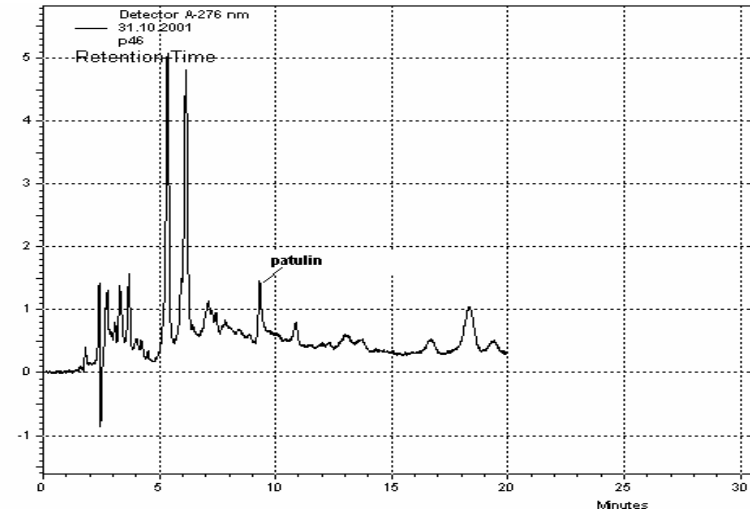
(5:95) Asetonitril:su



Şekil 4.6 HMF ve Patulin standart karışımının kromatogramı

Luna C18 (250x4,6 mm I.D 5µm)

Mobil faz (5:95) Asetonitril:su



Şekil 4.7 Elma suyu kromatogramı

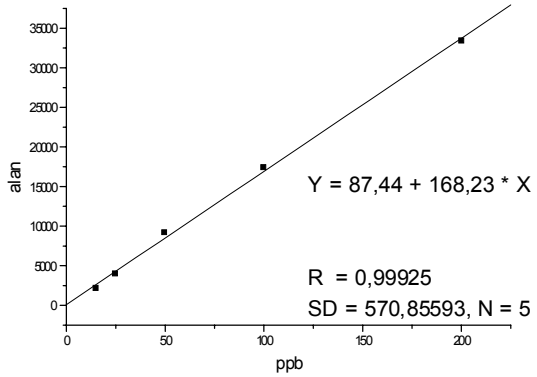
Luna C18 (250x4,6 mm I.D 5µm)

Mobil faz (5:95) Asetonitril:su

Sonuçların Hesaplanması: Örnek 2 için elde edilen verilere göre numune sonucu Şöyle hesaplanmıştır.

Derişim ppb	alan
200	33437
100	17337
50	9140
25	3921
15	2213

Bu alanlara göre grafik çizilirse



Derişik numune 10 kat

Numune alanı=17893

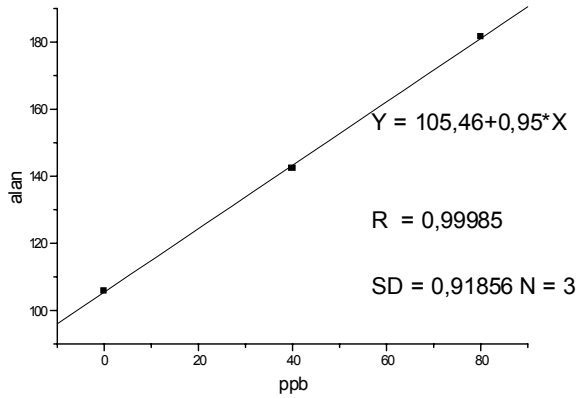
17893=87,44+168,23 c

c=105,84 ppb

Dış kalibrasyon sonucu

Çizelge 4.6 Standart ilavelere göre alınan veriler

Derişim ilave miktarı	Alan	Geri kazanma yüzdesi
0	17893	105,84
40	24063	142,52
80	30612	181,45



Şekil 4.8 Geri kazanma fonksiyonu grafiği

Bulunan Geri Kazanma Fonksiyonu grafiğinden

Y=105,46+0,95X

geri kazanma=0,95*100 =%95 dir

Düzeltilmiş sonuç=105,84/0,95=111,41

Numune 10 kat deriştirildiği için 111,41/10=11,14 ppb ‘dir.

5.SONUÇ VE TARTIŞMA

Çizelge 5.1 Elma suyu örneklerinde bulunan patulin sonuçları

Örnek No	Sonuç (μg /L)	R	%CV	Geri Kazanma %	Dış kalibrasyon
1	_*	0,9999	2,44	_	_
2	11,14±0,05	0,99925	3,39	95,4	105,84
3	_*	0,99997	0,92	_	_
4	_*	0,99995	1,08	_	_
5	_*	0,99995	1,08	_	_
6	6,97±0,99	0,9999	2,61	105	69,7
7	6,5±1,5	0,9995	2,82	76	49,02
8	7,5±0,6	0,9999	4,63	74	55,5
9	7,53±1,5	0,9995	4,28	98	75,31

* Tayin edilememiştir

Isparta yöresinden toplanmış elma suyu konsantresi örneklerinde yapılan analizlerde ekstraksiyon aşamalarına dikkat edilmiştir (geri kazanma değerlerinin bu aşamayla değişebileceği literatürde belirtilmektedir). Bu yüzden döner buharlaştırıcı ile çözücünün uzaklaştırılması sırasında verilen azot gazı hızına dikkat edilmiştir Ekstraksiyon sırasında örnek kayıpları en aza indirilmeye çalışılmıştır. Etil asetat ekstraksiyonu yüksek veriminden dolayı tercih edilmektedir.(Gökmen ve Acar, 1998) Çalışma grafikleri ile elde edilen veriler sonucu metodun standart sapması, varyasyon katsayısı, korelasyon katsayıları ve geri kazanma değerleri analitik açıdan yeterli düzeye getirilmeye çalışılmış değerler literatürle de uyumlu bulunmuştur. Son yıllarda yapılan çalışmalarda asetonitril derişiminin % 1 ile 10 arasında değişen mobil faz bileşimleri dikkati çekmektedir. Asetonitril derişimi artırıldıkça HMF ve patulinin alıkonma

zamanları küçülmekte, pikler birbirine yaklaşmaktadır ayırmada α değerinin yeterli tutulması koşuluyla analiz gerçekleştirilebilir. Çalışmamızda %5 asetonitril derişiminin tayinlerde uygun olduğu belirlenmiştir.

Bulunan patulin düzeylerine göre Dünya Sağlık Örgütünün belirlemiş olduğu izin verilen 50 μg /L patulin seviyesini aşan değere rastlanmamıştır.

6.KAYNAKLAR

AOAC Official Methods of Analysis ,ed.1990 Helrich, k., Association of Official Analytical Chemists Washington , DC,15 th edn., ,pp,.1209-1210.

Artık, N.,B. Cemeroğlu , G.Aydar, N.Sağlam .1995 .Elma suyu konsantresinde Aktif Kömür Kullanımı Üzerinde Araştırmalar.Aktif Kömür Kullanarak Elma Suyu Konsantresinde Patulin Miktarını Azaltma Olanakları. Ankara Üniv. Ziraat Fak. Gıda Müh.Böl. Ankara.

Barbosa, J. And Sanz-Nebot, V., 1993. Standard pH- Values İn Non-Aqueous Mobile Phases Used in Reversed- Phase Liquid Chromatography, 1993.Analytica Chimica Acta, 283, 320-325.

Barbosa, J., Sanz -Nebot, V., 1995. Assignment Of Reference pH Values To Primary Standard Buffer Solutions For Standardization Of Potantiometric Sensors in Acetonitrile - Water Mixtures. Fresenius J. Anal. Chem., 353, 148-155.

Barbosa, J., Berges, R., Sanz-Nebot, V., 1998. Retention Behaviour Of Quinolone Derivatives İn High-Performance Liquid Chromatography; Effects Of pH And Evaluation Of İonization Constants. J. Chromatogr. A., 823, 411-422.

Barbosa, J., Toro, I., Sanz-Nebot, V., 1998. Secondary Chemical Equilibria in HighPerformance Liquid Chromatography Influence Of İonic Strenght And pH On Retention Of Peptides. J. Chromatogr. A., 823, 497-509.

Barbosa, J., Bergés, R., Sanz-Nebot, V., Prediction Of The Chromatographic Behaviour For A Series Of Diuretic Compounds,2000. Chromatographia, 51(7/8), 417-427.

Bosch, E., Bou, P., Roses,M., 1994. Linear Description Of Solute Retention İn Reversed Phase Liquid Chromatography By A New Mobile Phase Polarity Parameter Anal Chim. Acta., 299, 219-229.

Chao –L., L. ,You-M., F., And Daniel Y., 2000. Detection Of Mycotoxin Patulin İn Apple Juice Journal Of Food And Drug Analysis 8(2) :85 96.

Ekşi A., F. Karadeniz 1990. Elma Suyu Konsantrelerinde Patulin Miktarı ve Değişkenliği Gıda Sanayi Dergisi. Sayı No:39. İstanbul. :14-18

Fernandez de Simon B.,J.Perez Ilzarbe ,T.Hernendez, vd., 1992. Jagric .Food Chem., 40-1531 .

Gökmen V.,Acar J., 1996. Rapid Reverse Phase Liquid Chromatographic Determination Of Patulin İn Apple Juice. Journal Of Chromatography A.,730 ,53-58.

Gökmen V., Acar J 1998. Journal of Chromatography A ,815.

Gökmen V.,Acar J., 2000. Long Term Survey of Patulin in Apple Juice Concentrates Produced in Turkey . Food Additives and Contaminants,Vol.17,No.11,933-936.

Gökmen V.,Artık N.,Acar J,.Kahraman N.,Poyrazoğlu E., 2001.Effects of Clarification Treatments on Patulin, Phenolic Compound and Organic Acid Compositions of Apple Juice .Eur Food Res technol 213:194-199.

Gökmen V., Acar J., 1995, Flüssiges Obst .62 368

Hurst W.J., Snyder K.P., and Martin R.A 1987. High Performance Liquid Chromatographic Determination Of the Mycotoxins Patulin and etc. In Artifically contaminated cocoa beans. Journal of chromatography ,392 389-396.

.

Hann, J.T. And Gılkıson, I.S., 1987. Gradient Liquid Chromatographic Method For The Simultaneous Determination Of Sweeteners, Preservatives And Colours İn Soft Drinks. J. Chromatogr. 395, 317-322.

Javier P., ,Miguel A.M., ,Javier B., ,Susana D., Guillermo S., And Lucasd., Vd. 1998. Determination Of Patulin By Reversed Phase Highperformance Liquid Chromatography With Extraction By Diphasic Dialysis Analyst ,February Vol.118 Journal Of Food Engineering . 35 , 259-266.

Johnson, B. P., Khaledi, M. G., Dorsey, J. G., 1986. Solvatochromic Solvent Polarity Measurements And Retention İn Reversed Phase Liquid Chromatography. Anal.Chem., 58; 2354-2365.

Kadakal C. And Nas S., 2002. Effect of Activated Charcoal on Patulin , Fumaric Acid and Some Other Properties of Apple Juice Nahrung Food 46 No.1,pp 31-33

Krygowski, T. M., Wrona, P. K., Zıelkowska, U. 1985. Empirical Parameters Of Lewis Acidity And Basicity For Aqueous Binary Solvents Mixtures. Tetrahedron, 41, 4519-4527.

Leggot N. L.,Shephard G. S.,2001.Patulin in South African Commercial Apple Products. Food Control 12 73-76.

Leggot N. L.,Shephard G. S., Stockenstörm S.,Staal And Schalkwy Van D .J: 2001 The Reduction Of Patulin İn Apple Juice By Three Different Types Of Activated Carbon.Food Additives And Contaminants .Vol 17 ,No.11,933-936.

Lehmann D. and B.Wald ,Dtsch.Lebensm.-Rundsch 1990.86 216.

Martins L.M. ,Martins H.M.,Bernardo F., 2001. Aflatoxins in Spices Marketed in Portugal.Food Additives and Contaminants, , vol 18,no. 4 315-319.

Möller,T.E., Josefsson ,E.,J 1980.Assoc .Off.Anal .Chem., ,63,1055.

Mutlu ,M., N .Gökmen ,V1997 .Patulin Adsorbtion Kinetics on Activated Carbon Activation Energy and Heat of Adsorption. Journal Of Food Science ,62(1),128-130.

Martin R. ,P.E. Hernandez and B.Sanz,Rev .Agroqium .Technol .Aliment.,30(1990) 315.

Kryger Robert A. 2001.Volatility of Patulin in Apple Juice. J.Agric. Food Chem., 49,4141- 4143.

Priest W.J., and Light J.R. 1990. Applications of High Performance Liquid Chromatography To Quantitation of Metabolites and Enzymes of the Patulin Pathway From Penicillium patulum .Journal of Chromatography,513. 237-246

Poole, C. P. And Poole, S. W., 1997. Chromatography Today. Fifth Impression. Elsevier Science, B.V., Amsterdam.

Rondinini, S., Mussini, P. R., Mussini, T., 1987. Reference Value Standard And Primary Standard For PH Measurements İn Organic Solvents And Water + Organic Solvent Mixtures Of Moderate To High Permittivities. Pure & Appl. Chem., 59 (11), 1549-1560.

Rondinini, S., Nese, A., 1987. Standard Ph Values For Potasium Hydrogenphthalate Reference Buffer Solutions İn Acetonitrile-Water Mixtures Up To 70 Wt % At Various Temperatures. Electrochimica Acta, 2(10), 1499-1505.

Rychlik M.,Schieberle P., 2001.Model Studies On The Diffusion Behavior Of The Mycotoxin Patulin İn Apples, Tomatoes, And Wheat Bread .Eur Food Res.Technol. ,212:274-278 .

Sewram V.Nair J.J.,Nieuwoudt T.W.,Leggott N.L., Shephard G.S. Shephard. Determination Of Patulin İn Apple Juice By HPLC –Atmospheric Pressure Chemical İonization Mass Spectrometry. Journal Of Chromatography A, 897(2000) 365-374.

Schoenmakers, P. J., Van Molle, S., Hayes, C. M. G., Uunk, L. G. M., 1991. Effects Of Ph İn Reversed Phase Liquid Chromatography. Anal. Chim. Acta., 250, 1-19

Shephard G.S.,Leggott N.L. 2000. Chromatographic Determination Of The Mycotoxin Patulin İn Fruit And Fruit Juices .Journal Of Chromatography A,882 17-22.

Stray ,H.,Jassoc.Off.Anal .Chem.,!978,61,129.

Solfrizzo M.,Avantaggiato, Visconti A. 1998.Use Of Various Clean Up Procedures For The Analysis Of Ochratoxin A İn Cereals. Journal Of Chromatography A, (8158) 67-73.

.

Thuvander A.,Möller T.,Enghart B,Jansson 2001. A Dietary İntake Of Some İmportant Mycotoxins By The Swedish Population .Food Additives And Contaminants Vol. 18, No.8 ,696-706.

Veerabhadrarao, M., Narayan, M.S., Kapur, O. And Sastry, C.S., 1987. Reversed Phase Liquid Chromatographic Determination Of Some Food Additives. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 70, 578-582.

Woller R., P.Majerus, Wein-Wissenschaft.3/41 1989 A.M. Harrison, J. Food Safety 9 147.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı :Mustafa Yılmazer
Doğum Yeri :Isparta
Doğum Yılı :1975
Medeni Hali :Evli

Eğitim ve Akademik Durumu:
Lise 1993 Isparta Anadolu Lisesi
Lisans 1999 Süleyman Demirel Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü

Yabancı Dil: İngilizce

İş Deneyimi:2000- S.D.Ü Temel Ve Uygulamalı Bilimler Araştırma ve Uygulama Merkezi ,Okutman.