

**T.C.  
HİTİT ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PİYASADA BULUNAN BEBEK GIDALARINDA YÜKSEK  
PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFI YÖNTEMİ  
(YPSK) İLE PATULİN TAYİNİ**

**Arslan KARAKÖSE**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**KİMYA ANA BİLİM DALI**

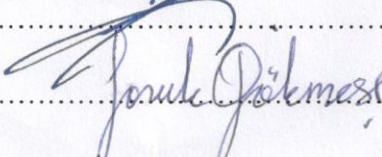
**ŞUBAT 2012**

**ÇORUM**

Arslan KARAKÖSE tarafından hazırlanan “Piyasada Bulunan Bebek Gıdalarında Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Yöntemi (YPSK) İle Patulin Tayini” adlı tez çalışması ~~10.02/2012~~ tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından oy birliği / ~~oy çokluğu~~ ile Hitit Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans / ~~Doktora~~ tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Sibel A.ÖZKAN.....

Doç. Dr. Nurullah ŞANLI.....

Doç. Dr. Faruk GÖKMEŞE.....

Hitit Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun ~~22.02.2012~~ tarih ve ~~2012/03~~ sayılı kararı ile Arslan KARAKÖSE’nin Kimya Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans / ~~Doktora~~ derecesi alması onanmıştır.

  
Prof. Dr. Ali KILIÇARSLAN  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

**TEZ BEYANI**

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını beyan ederim.



Arslan KARAKÖSE

**PİYASADA BULUNAN BEBEK GIDALARINDA YÜKSEK  
PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİ YÖNTEMİ (YPSK) İLE  
PATULİN TAYİNİ**

Arslan KARAKÖSE

HİTİT ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
Şubat 2012

**ÖZET**

Ürün kalitesinin bir göstergesi olan ve oldukça zehirli etkileri bulunan patulin ve 5-HMF (hidroksimetilfurfural)'ın bebek ve çocuk gıdalarında tayini için hızlı, güvenilir, duyarlı ve etkin bir sıvı kromatografi yöntemi geliştirilmeye çalışılmıştır. Çalışmada, optimum ayırma koşulları (organik çözücü yüzdesi, pH, sıcaklık vb. parametreler) tayin edilmiştir. Geliştirilen yöntemin ICH kurallarına göre validasyonu yapılmıştır. Ayrıca geliştirilen yöntemin ölçüm belirsizliği hesaplanmıştır. Bu yöntem kullanılarak Türkiye'de marketlerde satılan bebek ve çocuk gıdalarından alınan örnekler üzerinde patulin'in tayini yapılmıştır.

Anahtar Kelimeler : YPSK, Bebek gıdaları, HMF, Patulin

**DETERMINATION OF PATULIN AND 5-HMF BY HIGH-PERFORMANCE  
LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC) IN BABY FOODS FROM  
TURKISH MARKETS**

Arslan KARAKÖSE

HİTİT UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

February 2012

**ABSTRACT**

As an indicator of product quality and the highly toxic effects of patulin and 5-HMF (hydroxymethylfurfural) 's determination in foods for infants and children to a fast, reliable, sensitive, and effective method was developed. In this study, the optimum separation conditions (percentage of organic solvent, pH, temperature and so on.) were determined. The developed method was validated according to ICH guidelines. Furthermore, the developed method of uncertainty was calculated. By using this method, patulin and HMF were determined on the samples from infants and children feedstocks which sold in market in Turkey.

Key Words : HPLC, Baby foods, HMF, Patulin,

## TEŞEKKÜR

Çalıőmalarım boyunca değerli yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren Hocam Doç. Dr. Nurullah ŞANLI'ya, yine kıymetli tecrübelerinden faydalandığım Hocam Yrd. Doç. Dr. Senem ŞANLI'ya ve laboratuvarıda görevli tüm çalışma arkadaşlarıma, desteklerinden dolayı Vural GÖKMEN hoca'ya, maddi ve manevi desteğini esirgemeyen değerli eőim Ayőe KARAKÖSE'ye teőekkürü bir borç bilirim.

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	İV
ABSTRACT.....	V
TEŞEKKÜR.....	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	XI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XII
RESİMLER DİZİNİ.....	XIII
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	XIV
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	5
2.1. Sıvı Kromatografi Cihazları.....	6
2.1.1.Hareketli Faz Hazneleri ve Çözücü Sistemleri .....	7
2.1.2.Pompa.....	8
2.1.3.Enjektör .....	8
2.1.4.Kolon.....	8
2.1.5.Dedektörler.....	10
2.1.5.1.Ultraviyole-Görünür Bölge Detektörü .....	12
2.1.6.Kaydedici .....	13
2.2. Kromatografide Temel Parametreler.....	13
2.2.1.Alıkonma Zamanı ve Kapasite Faktörü .....	14

2.2.2. Seçicilik, $\alpha$ .....	15
2.2.3. Teorik Tabaka Sayısı (N).....	16
2.2.4. Ayırma Gücü, $R_s$ .....	16
2.3. Ters Faz Sıvı Kromatografide pH ve Seçicilik.....	19
2.3.1. İyonlaşma ve pH.....	19
2.3.2. Mobil Faz ve pH.....	20
2.4. Sıvı Kromatografide Mobil Faz Optimizasyonu.....	22
2.5. Mobil Fazda pH Standardizasyonu.....	23
2.6. Metodun Geçerli Kılınması.....	26
2.6.1. Metodun Geçerli Kılınmasının Önemi ve Genel Tanımlar.....	26
2.6.1.1. Spesifiklik ve Seçicilik.....	26
2.6.1.2. Kesinlik.....	28
2.6.1.3. Tekrarlanabilirlik.....	28
2.6.1.4. Tekrar Elde Edilebilirlik.....	29
2.6.1.5. Doğruluk.....	29
2.6.1.6. Kalibrasyon Doğrusu.....	30
2.6.1.7. Doğrusallık.....	31
2.6.1.8. Ölçüm Aralığı.....	31
2.6.1.9. Referans Standartlar ile Karşılaştırma.....	31
2.6.1.10. Teşhis Sınırı, Gözlenebilirlik Sınırı ( LOD).....	32
2.6.1.11. Tayin Alt Sınırı (LOQ).....	33
2.6.1.12. Sağlık Testleri,.....	34
2.6.1.12.1. Kararlılık.....	34
2.6.1.12.2. Tutarlılık.....	34



2.6.1.13.	Metodun Geçerli Kılınmasında Kullanılan Araçlar .....	35
2.6.1.14.	Metodun Geçerli Kılınması Nasıl Yapılır? .....	35
3.	KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	37
4.	MATERYAL VE YÖNTEM.....	41
4.1.	Genel Bilgi .....	41
4.2.	Kullanılan Cihazlar .....	41
4.2.1.	Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi Cihazı.....	41
4.2.2.	pH / İyon Metre.....	41
4.2.3.	UV Spektrofotometresi .....	42
4.2.4.	Döner buharlaştırıcı.....	42
4.2.5.	Ultrasonik Banyo .....	42
4.2.6.	Terazi.....	42
4.2.7.	Katı Faz Özütleme Düzeneği .....	42
4.2.8.	Vorteks Karıştırıcı.....	43
4.3.	Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	43
4.4.	Kullanılan Çözeltiler .....	45
4.4.1.	Patulinin YPSK Ayırımında Kullanılan Çözeltileri.....	45
4.4.2.	%5 (v/v) Asetonitril -Su İkili Karışımı .....	45
4.4.3.	%10 (v/v) Asetonitril -Su İkili Karışımı .....	45
4.4.4.	%15 (v/v) Asetonitril -Su İkili Karışımı .....	45
4.4.5.	%15 (v/v) Asetonitril -Su İkili Karışımı (15 mM Asetik Asit).....	45
4.4.6.	Potasyum Hidrojen Fitalat Çözeltisi .....	45
4.4.7.	Potasyum Bromür Çözeltisi .....	46
4.4.8.	Patulin ve HMF Stok Çözeltisinin Hazırlanması.....	46

4.4.9.Patulin Standart Çözeltisinin Hazırlanması .....	46
4.4.10.Patulinin Kalibrasyon Çözeltisinin Hazırlanması .....	47
4.5. Bebek Gıda Numunesinin Hazırlık Aşamasında Kullanılan Çözeltiler...	47
4.5.1.Asetik Asit Tampon Çözeltisi, pH 4 .....	47
4.5.2.Sodyum Karbonat Çözeltisi, %1,5 (w/v) .....	47
4.5.3.Sodyum Bikarbonat Çözeltisi, % 1 (w/v) .....	47
4.5.4.Asetik Asit Çözeltisi, % 0,1 (v/v) .....	48
4.6.Elüsyon Çözeltisi .....	48
4.6.1.Deneyde Kullanılan Numuneler.....	48
4.7. Yöntem.....	50
4.7.1.Sıvı Kromatografik Ayırmanın Optimizasyonu.....	50
4.7.2.Sıvı - Sıvı Özütlemesi .....	50
4.7.3.Katı – Sıvı Özütlemesi .....	51
5. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA .....	53
5.1. Kromatografik Ayırmanın Optimizasyonu .....	53
5.2. Metodun Geçerli Kılınması.....	58
5.2.1.Kalibrasyon Doğrusu ve Metot Performans Parametreleri (Validasyon Parametreleri) .....	58
5.3. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	67
KAYNAKLAR .....	69

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Seçicilik ve sistem etkinliğinin ayırma gücünü 1-1,5 aralığında değiştirmesi için gerekli değerler.....	18
Çizelge 2.2. Ters-faz sıvı kromatografisinde kullanılan tamponlar.....	21
Çizelge 2.3. Asetonitril su karışımında 0,05 m KHP için pH <sub>s</sub> değerleri .....	24
Çizelge 3.1. Elma ve Elma türevi gıdalarda ve bebek gıdalarında yapılan analizler.	40
Çizelge 4.1. Çalışılan kimyasallar ve özellikleri.....	44
Çizelge 4.2. Deneyde kullanılan numunelerin özellikleri.....	49
Çizelge 5.1. Kolonların karşılaştırılması.....	54
Çizelge 5.2 Kolon sıcaklık faktörünün etkisi (% 10 ACN, 0,1 mL perklorik asitli) .	54
Çizelge 5.3. Kolon sıcaklık faktörünün etkisi %15 (v/v) asetonitril-su ikili .....	55
Çizelge 5.4. Mobil faza pH'sının etkisi .....	56
Çizelge 5.5. Sistem uygunluk parametreleri (40°C'de % 15 ACN (15 mM asetik asitli) mobil faz ve Gemini C18 110 A° , 250 mm x 4,6 mm x 3µm kolon için).....	57
Çizelge 5.6. Patulin tayinine ait kalibrasyon verilerinin istatistiksel değerlendirilmesi.....	60
Çizelge 5.7. Patulin tayinine ait gün içi, günler arası bulguları .....	62
Çizelge 5.8. Cihazın tekrarlanabilirlik sonuçları.....	62
Çizelge 5.9. Geçeli kılınma parametreleri.....	63

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1.1. Patulinin kimyasal yapısı .....	2
Şekil 1.2. HMF'nin Kimyasal Yapısı.....	2
Şekil 2.1. Sıvı kromatografide bir kromatogram .....	14
Şekil 2.2. Ayırma gücü ( $R_s$ ) değerinin piklerin birbirinden ayrılmasına etkisi .....	17
Şekil 2.3. Mobil faz pH' sı ile asidik, bazik ve zwitter türlerin alıkonma faktörlerinin değişimi.....	20
Şekil 2.4. Kalibrasyon doğrusu ve eşitliği .....	30
Şekil 4.1. Katı faz özütleme şeması .....	52
Şekil 5.1. % 5 ACN'li patulin kromatogramı .....	53
Şekil 5.2. 40 °C'de % 15 ACN (0,1 mL perklorik asitli) patulin ve HMF.....	55
Şekil 5.3. 40 °C de % 15 ACN (15 mM asetik asitli) patulin ve HMF spektrumu ....	57
Şekil 5.4. Kalibrasyon doğrusu .....	58
Şekil 5.5. Patulinin UV-Spektrumu .....	59
Şekil 5.6. Kalibrasyon kromatogramı (0,05 ppm patulin 0,025 ppm HMF).....	60
Şekil 5.7. Geri kazanım çalışması yapılan numuneye ait kromatogram .....	61
Şekil 5.8. 8699745003548 barkod nolu ürünün kromatogramı .....	64
Şekil 5.9. 9062300117032 barkod nolu ürünün kromatogramı .....	64
Şekil 5.10. 9062300116844 barkod nolu ürünün kromatogramı .....	65
Şekil 5.11. 8697404760221 barkod nolu ürünün kromatogramı .....	65
Şekil 5.12. 8699745000363 barkod nolu ürünün kromatogramı .....	66
Şekil 5.13. 8692971556390 barkod no.lu ürünün kromatogramı .....	66

**RESİMLER DİZİNİ**

<b>Resim</b>	<b>Sayfa</b>
Resim 2.1. Deneyleerde kullanılan YPSK cihazı ve genel görünümü .....	7
Resim 4.1. Katı faz özütleme düzeneği.....	43

## SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

<b>Simgeler</b>	<b>Açıklama</b>
$t_R$	Alıkonma zamanı,
$k$	Kapasite faktörü,
$\alpha$	Seçicilik,
N	Etkin tabaka sayısı,
$R_s$	Ayırma gücü,
$t_f$	Kuyruklanma faktörü
<b>Kısaltmalar</b>	<b>Açıklama</b>
YPSK(HPLC)	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
ACN	Asetonitril
UV-DAD (Dioda Array Detector)	Görünür Bölge Dedektörü
ISO	Uluslararası Standartlar Organizasyonu
TS	Türk Standartları
EN	Avrupa Kriteri
PMTDI	Maksimum Günlük Alım Miktarı

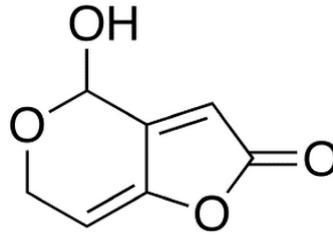
## 1. GİRİŞ

İnsan sađlıđını olumlu veya olumsuz şekilde etkileyebileceđi dűşünűlen birçok maddenin tespiti ve tayini her geçen gűn ۆnem kazanmaktadır. Eser dűzeylerde birçok maddenin tayini geliřen teknoloji ile son zamanlarda bařarı ile yapılabilmektedir. Besin deđerleri açısından oldukça ۆnemli bir yere sahip olan meyveler ise gűnlűk yařamın vazgeçilmez gıdalarıdır. Bazı meyve ve sebzelerde bulunabilen kahverengi űrűklerin varlıđı kűf oluřumunun bir gۆstergesi olup gıdalarda istenmeyen bir durumdur. ۆzellikle *Penicillium expansum* tűrű organizmalar tarafından ۆretilen patulinin ve karbon içerikli gıdalarda bulunan Hidroksimetil fulfural'ın analizi her geçen gűn ۆnem kazanmaktadır (Yılmazer, 2002; Varlova, 2006).

Patulin elmada, hububatta, ekmekte, peynirde, armut, kayısı, řeftali ve ۆzűmde de bulunabilir (Moake, 2005). Patulinin suda özűnme ۆzelliđi ve ısıya karřı dirençliliđi patuline elma suyu ve konsantresi ۆretiminde ayrı bir ۆnem kazandırmıřtır. Elma suyu ve konsantresine iřlenecek elmaların űrűk kısımlarının uzaklařtırılması, son ۆrűnű patulin açısından gűvenli kılmaktadır. Elma suyu ve konsantresi iřleyen fabrikalarda elma suyuna geçen patulinin uzaklařtırılmasında aktif kۆműr yaygın şekilde kullanılmaktadır. Aktif kۆműr dıřında elma suyuna askorbik asit ve/veya sorbatlar, sűlfidril bileřikleri veya çeřitli gıda katkı maddeleri (tarçın yađı, potasyum sorbat vb.) ilavesi ile dűřűk dozda radyasyon ve modifiye atmosfer uygulaması patulinin azaltılmasında etkili olmaktadır. Ancak lahana, turp, kereviz ve sođan gibi sebzeler, portakal ve portakal suyunda patulin sentezlenememekte veya kararlı halde kalamamaktadır.

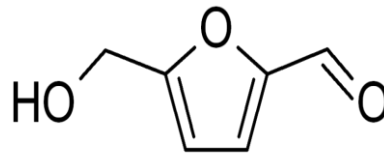
Belirtilen ۆrűnlerde patulinin sentezlenememesi veya kararlı halde kalamamasının meyve ve sebzelerin bileřimi ile yakından iliřkili olduđu ve bu ۆrűnlerde bulunan -SH gruplarının patulin sentezini etkilediđi veya kararlılıđını bozduđu ileri sűrűlmektedir. Sucuk, salam gibi et ۆrűnlerinde oluřan patulinin bir sűre sonra kararlılıđını kaybetmesi de aynı nedene bađlanmaktadır (Kadakal,1999).

Patulin (4-hidroksi- 4H- furol [3,2-c] pıran-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,1986).



**Şekil 1.1.** Patulinin kimyasal yapısı

Hidroksimetilfulfural, (HMF, 5 hidroksimetil,2 furaldehid) ise karbonhidrat içeren birçok gıda da mevcut olan, patulinde olduğu gibi ürününün kalitesini düşürücü etkisi olan bir maddedir. (Şekil 1.2) Bu halkalı aldehit asidik ortamda dehidrasyon sonucu, Maillard reaksiyonu veya karamalizasyon sonucu oluşur (Varlova, 2006).



**Şekil 1.2.** HMF'nin Kimyasal Yapısı

Patulinin etki mekanizmasını açıklayabilmek için, biyolojik etkisi ile fiziksel ve kimyasal özellikleri arasında ilişkiler kurulur. Bunun için de patulinin alınmasından atılımına kadar geçen süre içinde ne gibi kimyasal olayların meydana geldiğini bilmek çok önemlidir. Molekülün etkileşmeye yönelik özelliklerini, fizikokimyasal parametreler belirler.



Patulin, bazik hidroksi (-OH) grubu içerir, bu yüzden pK değerleri yaklaşık 11 civarındadır. Patulin ve HMF'nin pK<sub>a</sub> değerleri tautomeric hesaplamalar ile yapılmıştır; pK<sub>a</sub> (Patulin) = 11,052; pK<sub>a</sub> (HMF) = 12,821 (Anonim, 2002).

Patulin, önceleri antibiyotik olarak insanlar üzerinde kullanılmıştır. Gram (+) ve gram (-) bakterilerin gelişimini inhibe etmektedir, ancak daha sonraları vücutta ödem, gözde iritasyon ve kan basıncını düşürücü etkileri saptanmıştır. Kanserojen, mutagen ve teratojen özellikleri tespit edilen patulinin toksik olduğu belirlenmiştir (Yılmazer, 2002). Bundan dolayı Dünya Gıda ve Tarım Organizasyonu ve Dünya Sağlık Örgütü tarafından bebek ve çocuklar için maksimum günlük alım miktarının (PMTDI) 0,4 mg/kg vücut ağırlığı/gün olarak belirlenmiştir (Gökmen ve ark., 2005).

Bir üründe HMF'nin var olması ısıtılma işlemde fazla ısı harcanması veya uzun süre saklamayı zorlaştırıcı etkisi sonucunu ortaya koyar. Patulinde olduğu gibi HMF'nin sitotoksik, genotoksik ve kanserojen etkileri olduğu görüşleri mevcuttur. Amerika Halk Sağlığı Servisi, Uluslararası Zehir Programında (U.S. Public Health Servis, National Toxicology Program) zehirsiz çalışmalar listesine alınmıştır (Varlova, 2006).

Patulin miktarı ürünlerde ürünün kalitesini belirlemektedir. Patulin miktarının kabul edilebilir sınırları 10-50 ppb düzeyindedir. Birçok Avrupa Birliği ülkesi ve ülkemizde meyve suyu ve diğer meyve ürünlerinde patulin düzeyini en fazla 50 ppb olarak belirlemişlerdir. Bu değer, Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nün belirlemiş olduğu tolerans limiti olup, bu limitin üzerinde patulin içeren ürünlerin satışı yasaklanmıştır (Anonim, 2006) .

Türk gıda kodeksinin gıda maddelerindeki bulaşanların maksimum limitleri hakkında tebliğinde ise, meyve suları, meyve suyu konsantresi ve meyve nektarları ile distile alkollü içkiler, elma şarabı ile elmadan üretilen veya elma suyu içeren diğer fermente içkilerde maksimum patulin miktarı 50 ppb iken, katı haldeki elma ürünlerinde (elma kompostosu ve doğrudan tüketime sunulan elma püresi dâhil) 25 ppb, bebek ve küçük çocuklar için üretilen ve bu amaçla satışa sunulan/etiketlenen elma suyunda, katı haldeki elma ürünlerinde (elma kompostosu ve elma püresi dâhil) ve tahıl bazlı olmayan ek gıdalarda 10 ppb olarak belirlenmiştir (Gıda Maddelerindeki Bulaşanların Maksimum Limitleri Hakkında Tebliğ, 2009). Bunun yanında HMF'nin bal için Kodeks Alimentarius da izin verilen maksimum miktarı 40 mg/kg, elma sularında 50 mg/kg'dır. Ayrıca Uluslararası Meyve Suyu Üreticileri Konfederasyonu (The International Federation of Fruit Juice Processors (IFFJP)) meyve sularına 5-10 mg/L, meyve konsantrelerinde 25 mg/L olarak belirlemişlerdir (Elvira, 2009).

Bu çalışmamızda katı faz özütleme yöntemi ve sıvı sıvı özütleme yöntemi ile YPSK tekniği kullanılarak patulin tayini için metod optimizasyonu yapılmış, metod geliştirilmesi ve validasyonu yapılarak Türkiye'de satılan meyve özütü esaslı bebek gıdaları üzerinde uygulamalar gerçekleştirilmiştir.

## 2. KURAMSAL TEMELLER

Kromatografi, bir karışımda bulunan bileşenlerin birbirinden ayrılmasını gerçekleştiren ve bu sayede kalitatif ve kantitatif analizlerinin yapıldığı yöntemlerin genel adıdır. Bu yöntemlerde çalışma düzeneği temel olarak iki bileşenden oluşur. Bu bileşenlere sabit faz (stationary phase) ve hareketli faz ya da mobil faz (mobile phase) adı verilir. Mobil fazın içerisinde yer alan bileşenler, sabit faza ait dolgu maddesiyle etkileşmeleri sebebiyle, bir miktar tutulurlar. Bu tutulma, örnekteki farklı bileşenler için farklı miktarlarda olur. Böylece bileşenler sabit fazın sonlarına doğru, farklı hızlarda ilerledikleri için, birbirinden ayrılmış vaziyette sabit fazı farklı zamanlarda terk ederler.

Bu şekilde sabit fazdan çıkan bileşenlerin derişimleri uygun bir biçimde ölçülür ve zamana karşı y-ekseninde işaretlenerek “kromatogram” denilen grafikler elde edilir (Şekil 2.1). Sıvı-sıvı dağılım (partisyon) kromatografisinde çözülmüş maddenin ayırımı sıvı kromatografik teknikler içinde ters faz sıvı kromatografisi en yaygın kullanılanıdır. Sabit faz polaritesi, hareketli faz polaritesinden daha düşüktür. Bu kromatografi türü, apolar sabit fazda tutunmaları farklı olan türlerin ayırımında kullanılır. Kimyasal olarak bağlı alkil zincirlerinin sabit faz olarak kullanıldığı ters faz sıvı kromatografisinde, ODS (18 karbon atomu zincirinden oluşan oktadesil silan) en fazla kullanılan sabit fazdır. Ayrıca C8 ve daha kısa alkil zincirleri, sikloheksil ve fenil bağlanmış sabit fazlar da kullanılmaktadır. Ters faz kromatografisinde hareketli fazlar genellikle su veya sulu tampon çözeltileri ile suyla karışabilen organik çözücü karışımlarından oluşmaktadır.

Normal faz sıvı kromatografisinde sabit faz polaritesi hareketli faz polaritesinden daha yüksektir. Sabit faz genellikle silika veya alümina, kullanılan hareketli fazlar ise hekzan, metilen klorür, kloroform, dietil eter ve bunların karışımıdır. Silika jelin üzerine kimyasal bağlarla  $-CN$ ,  $-NO_2$  veya  $-NH_2$  gibi polar fonksiyonel gruplar bağlanarak farklı normal fazlar elde edilir. Normal faz ayırımlarında polaritesi yüksek olan maddeler, polar olan sabit faz ile daha fazla etkileşmekte, buna bağlı olarak kolonu daha geç terk etmektedir.

Yüksek performans sıvı kromatografisi (YPSK)'nin diğer kromatografi türlerinden üstünlükleri şunlardır:

- YPSK kolonu, rejenerasyon olmaksızın pek çok kez kullanılabilir.
- Bu teknik kullanıcının becerisine daha az bağımlıdır ve tekrarlanabilirlik daha yüksektir.
- Nitel ve nicel analiz amaçları için kullanılabilir.
- Analiz süresi oldukça kısadır.
- Duyarlık çok yüksektir. 10 µg lık bir örnek bile, floresans veya elektron yakalama detektörleri kullanılarak tayin edilebilir.

İlaç analizlerinde genel olarak ters faz sıvı kromatografisi normal faz sıvı kromatografisine göre tercih edilir. Bunun nedeni ilaçların genellikle daha apolar yapıda olmaları, ters faz sıvı kromatografisinin uygulamasının ve sistem kontrolünün daha kolay olması, hareketli faz bileşiminde kullanılan organik çözücülerin daha ucuz olması ve sulu tampon çözeltilerinin oranının yüksek tutulmasıdır.

## **2.1. Sıvı Kromatografi Cihazları**

Modern sıvı kromatografi sistemlerinde genel olarak kullanılan ve tanecik boyutu 2 ile 10 µm arasında olan dolgu maddeleri ile uygun sıvı akış hızları elde edebilmek için, yüzlerce atm' lik pompa basınçlarına gerek vardır. Bu yüksek basınçların bir sonucu olarak YPSK için gerekli donanım, diğer tip kromatografi sistemleri dikkate alındığında, daha ince işçilik gerektirir ve sonuçta daha pahalıdır. Resim 2.1'de tipik bir yüksek performanslı sıvı kromatografi cihazının çeşitli kısımları şematik olarak gösterilmiştir.



**Resim 2.1.** Deneylerde kullanılan YPSK cihazı ve genel görünümü

### 2.1.1.Hareketli Faz Hazneleri ve Çözücü Sistemleri

Modern bir YPSK cihazı, bir veya daha çok cam veya paslanmaz çelikten yapılmış hazne içermektedir. Bu hazneler çoğu zaman, çözücü haznelerde bulunabilecek tozları ve kolonda ve detektör sisteminde gaz oluşturarak bozucu etkilere sebep olan çözülmüş gazların (genellikle oksijen ve azot) giderilmesi için bir cihazla donatılmıştır. Bu çözülmüş gazlar kolonda kabarcıklar oluşturarak pik genişlemesine; ayrıca, çoğu zaman gerek gaz kabarcıkları gerekse tozlar, detektörle girişim yaparak performansında azalmaya sebep olurlar. Çoğunlukla bu sistemler, çözücü içinde bulunabilecek toz ve partikül halindeki maddelerin pompaya veya enjeksiyon sistemine zarar vermemesi veya kolonu tıkamaması için, toz ve partikül maddeleri süzmeye yarayan bir süzme düzeneği de içerirler. Çözücüyü hazneye doldurmadan önce uygulanacak diğer bir yol, çözücüyü, vakum altında bir milipor süzgeçten süzmektedir. Bu uygulama, süspansiyon halindeki maddeleri uzaklaştırmanın yanı sıra gazları da giderir.

Sabit bileşimdeki tek bir çözücü kullanılarak yapılan bir ayırma izokratik elüsyon olarak adlandırılır. Polarlıkları birbirinden farklı iki (veya bazen daha fazla) çözücü sistemlerinin kullanıldığı tekniğe gradient elüsyon adı verilir. Bu teknikte iki çözücünün oranı önceden programlanmış olarak bazen sürekli bazen de kademeli bir

şekilde değiştirilir. Elüsyon başladıktan sonra belli bir programa göre, bazen sürekli olarak, bazen de bir seri basamaklar şeklinde çözücülerin oranı değiştirilir. Modern YPSK cihazları, çözücülerin hacimsel oranı zamanla doğrusal olarak veya üstel olarak değiştirilebilecek şekilde, iki veya daha fazla hazneden aldığı çözücülerini bir karıştırma odasında sürekli olarak değişen oranlarda bir araya getiren sistemlerle donatılmıştır. İzokratik elüsyon ile ayrılamayan maddeler, gradient elüsyonla ayrılabilen, farklı kapasite faktörüne sahip madde karışımlarının alıkonma zamanları kısaltılabilmektedir.

### **2.1.2. Pompa**

Bir YPSK sisteminde pompanın görevi hareketli fazın kolon boyunca akışını sağlamaktır. Sistemde kullanılan pompalar sabit hacim pompaları ve sabit basınç pompaları olmak üzere iki ana başlıkta toplanabilir. Çalışma farklılığına bağlı olarak ise; pistonlu pompalar, şırınga pompalar ve pnömatik pompalar olmak üzere üçe ayrılırlar.

### **2.1.3. Enjektör**

YPSK analizlerinde ölçümlerin kesinliğini belirleyen faktör, numunenin kolon dolgu maddesine gönderilmesinin tekrarlanabilirliğidir. Aşırı numune yüklenmiş kolonlarda görülen bant genişlemesi de kesinliği etkiler. Bu yüzden kullanılan hacim çok küçük olmalıdır ve sistemin basıncını düşürmeden numunenin sisteme girişinin sağlanması gereklidir. Temel olarak, el ile (manüel) ve otomatik olmak üzere iki tip enjektör vardır.

### **2.1.4. Kolon**

Sıvı kromatografi kolonları bir YPSK cihazının en önemli parçasıdır ve genellikle paslanmaz çelikten imal edilir. Pek çok üretici tarafından üretilen analitik kolonlar 2-5 mm iç çaplı, 5-30 cm boyundadır. Tanecik çapları ise 2-10 µm arasında değişmektedir. Bu tip kolonların 1 metresinde 40000-60000 kadar tabaka bulunur.

Son yıllarda uzunluğu 3-7,5 cm ve iç çapı 1-4,6 mm olan yüksek performanslı mikro kolonlar da imal edilmeye başlanmıştır. Bu kolonların dolgu maddelerin parçacık boyutları 2-5 µm ve tabaka sayısı 10000 tabaka/m'ye kadar çıkmaktadır. Bu mikrokolonlar ile çok az miktarda çözücü ile hızlı bir şekilde ayırma yapabilmektedir. Sıvı kromatografisinde kullanılan çözücülerin saflıkları yüksek olmasından dolayı pahalıdır. Çözücüler kullanıldıktan sonra atıldığı için mikrokolon kullanımı çok önemli bir üstünlüktür. 15 saniye gibi çok kısa bir zamanda sekiz farklı madde birbirinden ayrılabilir.

Kolon dolgu maddeleri, film dolgular ve gözenekli dolgular olmak üzere iki tiptir. Film dolgular, gözenekli olmayan cam veya polimer tanelerinden oluşur. Yüzeylerine gözenekli yapıda silika, alümina veya iyon değiştirici reçineden oluşan ince bir gözenekli film kaplanmıştır. Gözenekli dolgular, silika, alümina ve iyon değiştirici reçineden yapılırlar. Sıvı kromatografisinde kullanılan en yaygın kolon dolgu maddeleri silisyum dioksittir. Mikrondan daha küçük boyutlardaki silisyum dioksit parçacıklarının aglomerasyonu, daha büyük ve yaklaşık aynı boyutlarda parçacıklar elde edilir. Hazırlanan, parçacıkların yüzeyi, genellikle bu yüzeye fiziksel veya kimyasal bağlarla bağlanmış ince bir organik filmle kaplanır. Silika temelli bağlı fazlar, yüzeyde bulunan silanol gruplarının organosilanlarla reaksiyonları sonucu elde edilir. En çok kullanılan, klorodimetilsilanların yüzey silanol grupları ile reaksiyonudur. Ters faz sıvı kromatografisi için kullanılan çeşitli alkil ve substitüe alkil silikalar bu yolla elde edilir. Alümina parçacıkları, gözenekli polimer parçacıkları ve iyon değiştirici reçineler de dolgu maddesi olarak kullanılabilir. Anyonları ve katyonları tutan iyon reçinelerin dolgu maddesi olarak kullanılması halinde, numunede iyon halinde bulunan türler birbirinden ayrılır. İyonların bu reçinelere olan ilgilerine etki eden faktörler, iyonun yükü, iyonun büyüklüğü, pH, iyon şiddeti, kullanılan reçinelerin gözenek büyüklüğü, çözücü cinsi, çözücü derişimi ve çalışma sıcaklığıdır. Kullanılan iyon değiştirici reçineler doğrudan kolona doldurulabilen katı reçineler olabileceği gibi, bir katı yüzeyine kaplanmış sıvı reçineler de olabilir. Katyon değiştirici reçinelerin ortak özelliği, kuvvetli bir asit olan sülfonik asit grupları ile zayıf bir asit olan karboksilik

asit gruplarını içermeleridir. Anyon değiştirici reĉineler ise, kuvvetli baz olan kuaterner amin grupları ile zayıf baz olan primer amin grupları içerirler.

Sıvı kromatografisinde kolon verimliliği, bir bileşiğin kolondan geĉiři sırasında meydana gelen bant genişliğinin derecesi tarafından etkilenir. Bant genişlemesi ve dolayısıyla kolon verimliliğinin kaybı, çözünen bileşenlerin kolondan aşağıya göçleri sırasında yer alan çok sayıda kütle-aktarım işlemlerinin sonucudur. Bu hızları etkileyen bazı değişkenler kontrol edilebilir ve ayırmalar için kullanılabilir.

Kolon Verimliliğine Etkiyen Değişkenler;

- Hareketli fazın doğrusal hızı,
- Hareketli fazda difüzyon katsayısı,
- Durgun fazda difüzyon katsayısı,
- Kapasite faktörü,
- Dolgu parĉacık çapı,
- Durgun fazda sıvı kaplamanın kalınlığıdır.

### 2.1.5. Dedektörler

Dedektör yüksek basınçlı sıvı kromatografisinde, cihazın en önemli kısımlarından birini oluşturur. Kolondan çıkan maddelerin derişimi kolon çıkışına yerleştirilen uygun bir dedektör ile ölçülür. Dedektör seĉimi doğru ve hassas bir analiz yapabilmek için son derece önemlidir. Genellikle tek dedektör sistemi kullanılmakla beraber, birden fazla dedektör sisteminin yer aldığı cihazlar da mevcuttur. Bir dedektörde bulunması gerekli önemli karakteristikler;

- Duyarlılık,
- Geniş bir doğrusal çalışma aralığı,
- İyi bir kararlılık ve tekrarlanabilirlik,
- Üniversal ve akış hızından bağımsız küçük cevap zamanı,
- Doğru cevap, koşulların değişiminden etkilenmeme,



- Numuneyi tahrip etmeme,
- Bant genişlemesini azaltmak amacıyla, minimum iç hacim,
- Ucuzluk ve kolay kullanımdır.

Genel olarak dedektörler iki grup altında toplanırlar. Bunlar maddeye yönelik dedektörler ve çözeltiye yönelik dedektörlerdir.

Maddeye Yönelik Dedektörler: Hareketli faz içindeki maddenin özelliklerini tayin ederler ve en yaygın kullanılan türleri aşağıda verilmiştir:

1. Fotometrik dedektörler (UV/GB, Floresans, Dizi diyot, Infrared),
2. Elektrokimyasal dedektörler,
3. Ayırım sonrası tepkime dedektörleri,
4. Radyoaktivite dedektörleri,
5. Kütle spektrometreleri.

Çözeltiye Yönelik Dedektörler:

Örnek özelliklerinin ölçülmesine yönelik dedektörlerdir ve aşağıdaki şekilde sınıflandırılabilir:

1. Refraktif indeks dedektörleri
2. Dielektrik sabiti dedektörleri
3. İletkenlik dedektörleri
4. Yoğunluk dedektörleri

Bu çalışmada UV/Görünür Bölge (DAD) dedektörü kullanıldığından, sadece bu dedektörden bahsedilecektir.

### 2.1.5.1. Ultraviyole-Görünür Bölge Detektörü

Absorbans ölçen detektörler olup YPSK'da kullanılan detektörlerin yaklaşık % 60'ını oluşturmaktadırlar. Lambert-Beer yasası geçerlidir. Spektrum taraması yapmak, farklı dalga boyunda çalışmak veya dalga boyunu zamana karşı programlamak mümkündür. Hareketli faz, UV/VIS fotometre ya da spektrofotometrenin bulunduğu Z şeklindeki küçük bir akış hücresinden geçirilir. Kolon dışı bant genişlemesini en aza indirmek için, bu gibi hücrelerin hacimleri mümkün olduğunca düşük tutulmaktadır. Hacimler, 1-10  $\mu$ L ve hücre uzunluğu 2-10 mm arasında sınırlandırılmıştır. Bu tip hücreler, yaklaşık 600 psi'den büyük basınçlarda çalışmazlar. Bunun sonucu olarak, bir basınç düşürme düzeneği genellikle gereklidir.

Hücreden geçen analit, bir miktar UV ışınını absorblar ve dedektör tarafından bu absorpsiyona bağlı olarak bir sinyal oluşturulur Bu sinyal, analit derişimi ile orantılıdır. Tek bir dalga boyunda çalışan dedektörler kullanılabildiği gibi bir monokromatör ile çeşitli dalga boylarını seçerek çalışan dedektörler de vardır. Tek dalga boyunda çalışan dedektörlerde ışık kaynağı olarak genellikle 254 nm' de ışımaya yapan Hg lambası, çeşitli dalga boylarını ölçebilen dedektörler de ise döteryum lambası kullanılır. Dalga boyunun her bir bileşene göre ayarlanabilmesi nedeni ile seçimli bir dedektör türü olan UV-görünür bölge detektör sisteminde seçilen çözücülerin UV-ışınlarını absorbladığı dalga boylarına dikkat edilmeli ve seçilen çalışma dalga boyu çözücünün absorpsiyon yaptığı dalga boyu değerinden yüksek olmalıdır. Bu durum özellikle düşük dalga boylarında absorpsiyon yapan örnekler için son derece önemlidir (CH<sub>3</sub>OH 205 nm, CH<sub>3</sub>CN 190 nm, v.b.). Ayrıca elue edicinin pH değerinin UV-görünür bölge spektrumunu etkileyeceği de göz önünde bulundurulmalıdır. En güçlü ultraviyole spektrofotometrik dedektörler diyod-serili cihazlardır. Bu cihazlar, spektrumun tamamı için gerekli olan verileri yaklaşık bir saniyede toplayabilmektedir. Böylece, her bir kromatografik pik için spektral veriler, analit kolondan çıkarken toplanıp saklanabilir. Türlerin teşhisine ve kantitatif tayin için şartların seçimine yardımcı olan bu spektrum şekli, üç boyutlu grafik olarak verilebilmektedir.

İdeal UV dedektörün karakteristikleri şunlardır:

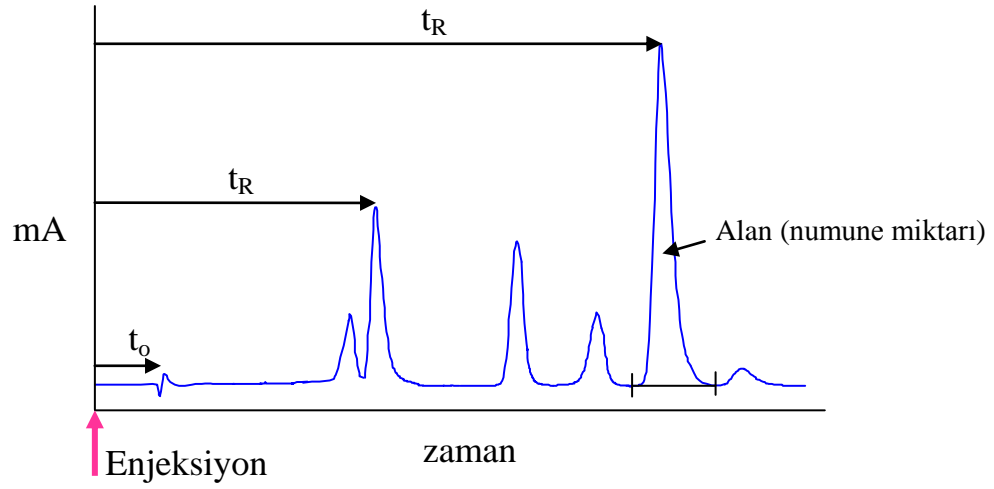
- Örneklerin UV- görünür bölgede absorpsiyon yapması gerekir.
- Hareketli faz akış hızı ve sıcaklık değişimlerinden etkilenmez.
- Band genişletme etkisi küçüktür.
- Çok güvenilirdir.
- Örnek çözeltiyi bozmaz.

### **2.1.6. Kaydedici**

Mikroişlemciler ve bilgisayarların kullanıldığı sistemlerde hareketli faz akış hızı, enjektör, kolon fırını, örnek alma sistemi, dedektör ve veri kaydı sistemi merkezi bir veri kayıt cihazı ile kontrol edilmektedir. Mikroişlemciler ve bilgisayarların kullanılması kromatografik sistemde tekrarlanabilirliği arttırmakta, sistem validasyon parametrelerinde daha doğru değerler elde edilmesine olanak sağlamaktadır.

## **2.2. Kromatografide Temel Parametreler**

Bir kromatografik sisteminde verilerin yorumlanmasında esas alınan kromatogramdır. Kromatogram; tayini yapılan örneğin her bir bileşeni için belirli zamanlarda derişim değerine karşı elde edilen cevabın uygun bir detektör ile saptanmasıyla elde edilmiş pikleri gösteren grafikdir. Şekil 2.1' de iki bileşenli bir örneğe ait kromatogram ve kromatografik gösterimler belirtilmiştir.



**Şekil 2.1.** Sıvı kromatografide bir kromatogram

Bir kromatogramın yorumlanmasında kullanılan başlıca parametreler şunlardır;

1. Alıkonma zamanı,  $t_R$
2. Kapasite faktörü,  $k$
3. Seçicilik,  $\alpha$
4. Etkin tabaka sayısı,  $N$
5. Ayırma gücü,  $R_s$

### 2.2.1. Alıkonma Zamanı ve Kapasite Faktörü

Kromatografide bir pik, alıkonma zamanı,  $t_R$ , ile tanımlanır. Kromatografik karşılaştırmalarda alıkonma zamanı yerine kapasite faktöründen,  $k$ , yararlanılır. Kapasite faktörü, aşağıdaki bağıntı ile hesaplanır.

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (2.1)$$

Burada  $t_R$  bileşene,  $t_0$ , kolonda tutunmayan türe ait alikonma zamanlarıdır.  $k$  değerinin büyük oluşu, bileşenin sabit fazda iyi tutulduğu için kolon boyunca yavaş ilerlediğini;  $k$  değerinin küçük olması, bileşenin mobil faza ilgisinin fazla olmasından dolayı kolon boyunca hızlı ilerlediğini gösterir. YPSK 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, mobil faz ve durgun faz bileşimlerinin değiştirilmesi ile sağlanır.

Kapasite faktörü uygulanan yöntemde, her maddenin kendi fiziksel ve kimyasal yapısına bağlı olarak farklılıklar gösterir ve özgül bir değerdir. Kromatografik parametrelerin optimizasyonunda dikkat edilmesi gereken en önemli parametrelerden biridir.

### 2.2.2. Seçicilik, $\alpha$

Seçicilik, esas olarak kullanılan sabit fazın özelliğine bağlı olarak değişiklik gösterse de hareketli faz bileşimi de, seçiciliği kısmen etkileyen faktörlerden biridir. Seçiciliğin matematiksel ifadesi Eşitlik 2.2' de gösterilmiştir. Burada kolonda daha uzun süre tutunan maddeye ait kapasite faktörünün kolonda daha kısa süre tutunan maddeye ait kapasite faktörüne oranlanması ile hesaplanır. Bu tanıma göre seçicilik daima 1'den büyüktür.

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_{R_2} - t_{R_0}}{t_{R_1} - t_{R_0}} \quad (2.2)$$

### 2.2.3. Teorik Tabaka Sayısı (N)

Kolonun en önemli parametresidir. Kolondan çıkan pikin sivri ve dar olması ve piklerin birbirlerinden iyi ayrılması ile ilgilidir. N'nin sayısal değeri, analizi yapılan maddenin cinsine bağlı olduğu gibi, deney koşullarına örneğin, akış hızı, sıcaklık, kolon kalitesi, dolumun tek biçimliliği gibi çeşitli faktörlere de bağlıdır. Tavsiye edilen değer  $N > 2000$  dir.

Bir kromatografik ayırmada etkin tabaka sayısı, aşağıdaki bağıntı ile belirlenir.

$$N = 5,54 \left( \frac{t_R}{W_{0,5}} \right)^2 \quad (2.3)$$

Burada;

N : Teorik tabaka sayısı

$t_R$  : Bileşene ait alıkonma zamanı

$W_{0,5}$  : Pikin yarı yüksekliğindeki pik genişliği

dir.

### 2.2.4. Ayırma Gücü, $R_s$

Kromatografik işlemlerde kolon etkinliği ve çözücü etkinliğinin ortak etkisi ayırma gücü (rezolüsyon) kavramıyla ifade edilir. Ayırma gücünün hesaplanmasında, kapasite faktörü, tabaka sayısı ve seçicilik kullanılmaktadır. Birbirini takip eden iki pik için R değeri 1,5 iken tam ayırım olmakta,  $R = 1,325$  iken maddelerden biri diğeri içine % 0,3 oranında girmiş durumda,  $R = 1$  iken, maddelerden biri diğeri içine % 4 oranında girmiş durumda, ve  $R = 0,75$ 'de ayırım olmamaktadır (Şekil 2.2). Ayırma gücü için geliştirilen bağıntı, aşağıda verilmiştir.

$$R_s = 1,18 \times \frac{(t_2 - t_1)}{W_{0,5} + W_{p0,5}} \quad (2.4)$$

Burada;

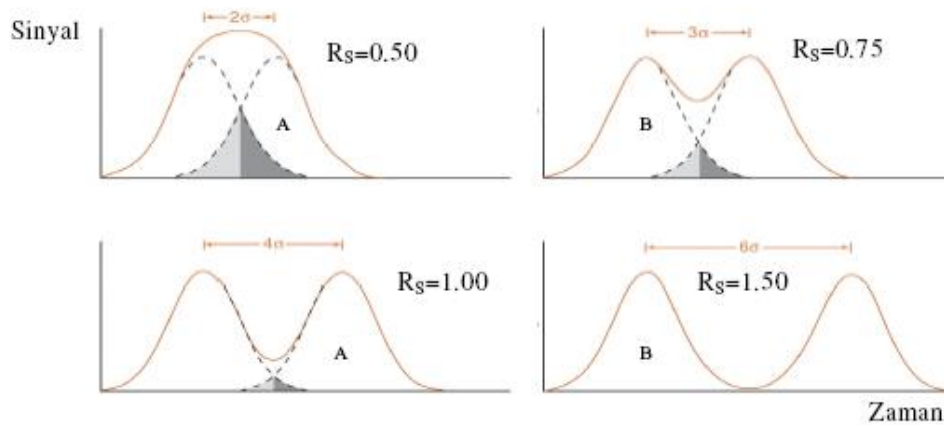
$R_s$  : Pik çifti için ayırma gücü,

$t_1$  : Birinci pikin alıkonma zamanı, s,

$t_2$  : İkinci pikin alıkonma zamanı, s,

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

$W_{p0,5}$  : İkinci pikin zaman ekseninde yarı genişliğidir.



**Şekil 2.2.** Ayırma gücü ( $R_s$ ) değerinin piklerin birbirinden ayrılmasına etkisi

Purnell (1960), birbirini takip eden iki pik için, pik genişliklerini eşit kabul ederek ikinci pikin kapasite faktörünün alınması gerektiğini vurgulamıştır. Bu yaklaşıma göre ayırma gücünün hesaplanmasında kullanılan eşitlik aşağıda verilmiştir.

$$R_s = (1/4) \sqrt{N} \quad [(\alpha-1)/\alpha] \quad [k_2/(1+k_2)] \quad (2.5)$$

Sistem etkinliği    Seçicilik faktörü    Alıkonma

Burada;

$R_S$  : Pik çifti için ayırma gücü,

$\sqrt{N}$  : Etkin tabaka sayısı,

$\alpha$  : Seçicilik faktörü,

$k$  : Kapasite faktörü'dür.

Said (1964), ayırma gücünün hesaplanmasında birbirini takip eden ilk veya ikinci pikin kapasite faktörünün hesaplamalarda kullanılmasının yerine ortalamasının alınmasının daha uygun olacağını önermiştir. Bu durumda eşitlik 2.5 şöyle yazılabilir:

$$R_S = (1/2) \sqrt{N} [(\alpha-1) / (\alpha+1)] [k_{ort}/(1+k_{ort})] \quad (2.6)$$

Kromatogramda kritik pik çiftleri arasındaki mesafenin küçük olması, hesaplanan ayırma gücünün gerçek değere olan yakınlığını arttırmaktadır.

Seçicilik ve sistem etkinliğinin ayırma gücünü 1-1,5 aralığında değiştirmesi için gerekli değerler Çizelge 2.1'de verilmiştir.

**Çizelge 2.1.** Seçicilik ve sistem etkinliğinin ayırma gücünü 1-1,5 aralığında değiştirmesi için gerekli değerler

Ayırma Gücü	Sistem etkinliği	Seçicilik faktörü
1	10,00	1,04
1,5	10,00	1,06
1,5	22,50	1,04



### 2.3. Ters Faz Sıvı Kromatografide pH ve Seçicilik

Ters faz sıvı kromatografi metoduyla analizi yapılan maddelerin çoğu, karboksilik asit, sülfonik asit veya amino grupları gibi, iyonlaşabilen gruplara sahiptir. Maddelerin alıkonma zamanı, büyük ölçüde fonksiyonel grupların iyonlaşmasına bağlıdır. Aynı analitin iyonlaşmış ve nötral şeklinin alıkonma zamanı arasında yaklaşık 30 kat farklılık olabilmektedir. İyonlaşma derecesi mobil fazın pH'sıyla belirlenir. Eğer iyi bir kromatografik seçicilik ve tekrarlanabilir alıkonma isteniyorsa, iyonlaşma derecesini etkileyen faktörleri anlamak gereklidir. Bu faktörlerden en önemlilerine aşağıda değinilmiştir.

#### 2.3.1. İyonlaşma ve pH

İyonlaşan analitlerin alıkonması iyonlaşma derecesine bağlıdır. Ters faz sıvı kromatografide, analitin iyonlaşmamış türü, iyonlaşmış türünden daha yüksek alıkonma zamanına sahiptir. Eğer analit birden fazla iyonlaşma basamağına sahipse; daha yüksek iyonlaşma derecesi basamağında, daha düşük alıkonma zamanı gösterir. Analitin iyonlaşma derecesi, çözeltinin pH'sına ve iyonlaşma basamaklarındaki pK değerine bağlıdır. Ters faz sıvı kromatografide iyonlaşmış tür daima düşük alıkonma zamanına sahiptir. Bu yüzden, bazik türler için, asidik ortamda, asidik türler için ise bazik ortamda alıkonma en düşüktür. Diğer yandan, yüksek alıkonma zamanı analit nötral formdayken de gözlenir. Analitlerin kapasite faktörleri ve iyonlaşma dereceleri arasındaki bağıntı,

$$k = k_0 + k_1 \cdot d / (1 + d) \quad (2.7)$$

olarak verilmektedir. Burada  $k$ , analitin kapasite faktörü,  $k_0$  ve  $k_1$  protonlanmış ve nötral formun kapasite faktörüdür.  $d$  ise deprotonasyon derecesini ifade eder,

$$d = 10^{\text{pH}-\text{pK}} \quad (2.8)$$

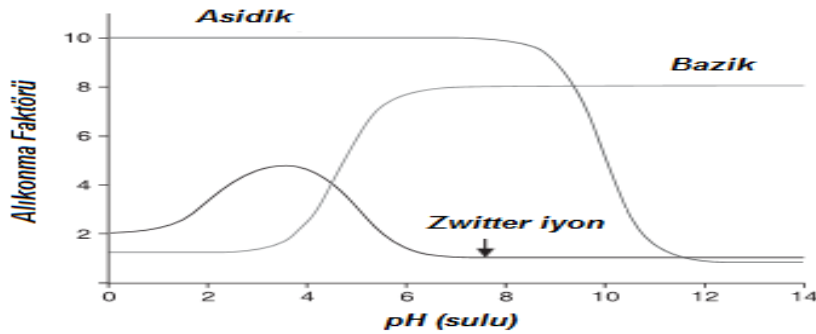
olarak ifade edilir. Bu eşitlikte pH, mobil fazın pH değeri ve pK<sub>a</sub> bileşiğin iyonlaşma basamığına ait pK değeridir. İki değerlikli bileşikler için eşitlik benzer şekilde yazılabilir. Asit, baz veya zwitter iyon için eşitlik,

$$k = (k_0 + k_1 \cdot d_1 + k_2 \cdot d_1 \cdot d_2) / (1 + d_1 + d_1 \cdot d_2) \quad (2.9)$$

olarak yazılabilir. Çalışılan bileşiklerin mobil fazdaki pK değerlerinin doğru olarak bilinmesi, alıkonmanın belirlenmesi açısından oldukça önemlidir. Bileşiğin pK'sının  $\pm 2$  pH biriminde, yapı yaklaşık % 99 iyonlaşmış veya moleküler formdadır. Bu pH aralığının dışında alıkonma pH değişimi ile fazla değişmez. Bundan dolayı pH kontrolü tekrarlanabilir alıkonma zamanlarının elde edilmesinde oldukça önemlidir.

### 2.3.2. Mobil Faz ve pH

Şekil 2.3'de mobil faz pH'sı ile alıkonmanın değişimi gösterilmektedir. Tekrarlanabilir pH değerleri için tampon çözeltiler tercihli olarak kullanılmaktadır. Çizelge 2.2' de ters faz sıvı kromatografisinde kullanılan tamponlar, pK değerleriyle birlikte verilmiştir.



Şekil 2.3. Mobil faz pH' sı ile asidik, bazik ve zwitter türlerin alıkonma faktörlerinin değişimi

**Çizelge 2.2.** Ters-faz sıvı kromatografisinde kullanılan tamponlar

Tampon	pK	Tampon aralığı	UV (nm)
TFA <sup>a</sup>	0,5	1,5'e kadar	210 nm (% 0,05 v/v)
Fosforik asit	2,1	1.1–3.1	<200 nm (10 mM)
Mono/dihidrojen fosfat	7,2 12,3	6,2 - 8,2 11,3 – 13,3	<200 nm (10 mM)
Formik asit <sup>a</sup>	3,8	2,8-4,8	210 nm (10mM)
Asetik asit <sup>a</sup>	4,8	3,8-5,8	210 nm (10mM)
	3,1	2,1-4,1	
Sitrat	4,7 5,4	3,7-5,7 4,4-6,4	230 nm (10mM)
Trisamino metan (TRIS)	8,1	7,1-9,1	205 nm (10mM.)
Borat	9.2	8,2-10,2	<200 nm (10 mM)
Dimetilamin	10.7	9,7-11,7	<200 nm (10 mM)
Trietilamin	10.8	9,8-11,8	<200 nm (10 mM)
Amonyum hidroksit <sup>a</sup>	9,3	8,3-10,3	<200 nm (10 mM)
Pirolidin	11,3	10,3-12,3	<205 nm (10 mM)
N-Metil pirolidin	10,3	9,3-11,3	<205 nm (10 mM)
Piperidin	11,1	10,1-12,1	<205 nm (10 mM)
	4,8	3,8–5,8 (asetat)	8,3–10,3
Amonyum asetat <sup>a</sup>	9,3 6,4	(amonyum) 5,4–7,4 (karbonat,1)	210 nm (10 mM)
Amonyum bikarbonat <sup>a</sup>	10,3 9,3	9,3–11,3 (karbonat,2) 8,3–10.3 (amonyum)	<200 nm (10 mM)

<sup>a</sup> uçucu tamponlar LC-MS çalışmalarında kullanılabilir.

YPSK de kullanılan tamponların literatürlerde verilen pK değerleri, çoğunlukla sudaki değerlerdir. Ters faz sıvı kromatografisinde analiz edilmek istenen analitlerin pK değerleri ve ortamın pH'ı, organik çözücü ilave edilmesi ile değişir. Genellikle organik çözücü ilavesiyle asitlerin pK değerleri artarken, bazların azalır. Yalnız unutulmamalıdır ki tampon kapasitesi, ortama ilave edilen organik çözücü ile değişmez. Bu yüzden etkin bir ayırım için tampon kapasitesi yüksek bir tampon ve derişim aralığı seçmek önemlidir

Çeşitli tamponların metanol-su ve asetonitril-su ikili karışımlarında pK değerlerinin değişimi incelendiğinde asitlerden oluşan tamponların pK değerlerinin organik çözücü artışı ile arttığı görülmüştür. Bazlardan oluşan tamponların pK değerleri ise geniş bir çözücü derişimi aralığında asidik bölgeye kaymaktadır. Organik çözücü ilavesi asitlerin ve bazların zayıflamasına neden olmaktadır (Şanlı, 2007).

#### **2.4. Sıvı Kromatografide Mobil Faz Optimizasyonu**

Sıvı kromatografik bir yöntemin geliştirilmesinde üzerinde durulacak en önemli husus, yeterli ayırmaya ulaşıldığının belirlenmesidir. Yüksek performans 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, mobil faz pH'sı gibi deneysel koşulların değiştirilmesiyle yönetilebilir. Bu faktörlerin ikisi sabit tutularak diğer değişkenin, analitin alıkonmasındaki etkisi incelenir. 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.

Mobil fazın bileşimi, ters faz sıvı kromatografide bileşiklerin alıkonmalarında en önemli rolü oynar (Dolan ve ark., 1979; Barwick, 1997). Mobil faz olarak kullanılan

su-organik çözücü karışımlarında polarite, mobil fazın bileşikleri elue etme gücünün bir ölçüsüdür ve çözünenin kolon ile etkileşimini belirleyen temel faktördür. Ters faz YPSK'da alıkonma, mobil fazın polaritesinin artmasıyla yani su ilavesiyle artar. Bu güç çoğu kez organik çözücü-su karışımlarında organik fazın yüzdesi ile ifade edilir.

## 2.5. Mobil Fazda pH Standardizasyonu

Kromatografik ayırmada mobil faz pH'sı, iyonlaşabilen bileşiklerin ayrılmasında önemli bir faktördür. Bilindiği gibi kapasite faktörü, çözünenin nötral ve iyonik formlarının kapasite faktörlerinin mobil fazda bu formların mol kesirlerine göre ağırlıklı ortalamasıdır.

Sıvı kromatografide kullanılan mobil fazların pH'sı, önceleri sulu çözeltinin pH'sı olarak alınmıştır. Oysa YPSK çalışmalarında su hiçbir şekilde tek başına mobil faz olarak kullanılamaz. Tampon çözelti halinde veya bir organik modifiyer ile birlikte kullanılır. Bundan dolayı organik modifiyer ilavesi ile pH değişimini göz önüne almak gerekir (Roses ve ark., 1996; Augiar de ve ark., 1997). RPLC mobil fazında organik modifiyer olarak genellikle asetonitril ve metanol tercih edilir. Bu ortamlarda pH standardizasyonu ile ilgili çalışmalar mevcuttur (Barbosa ve ark., 1999; Barbosa ve ark., 1995; Covington ve ark., 1985). Sulu faz pH'sının ölçümü çok daha kolaydır, ancak su organik çözücü karışımında elektrolitin iyonlaşması seçimli solvasyona çok bağımlıdır ve çözüneneye göre değişir. Bu nedenle YPSK mobil fazına ve su ortamına ait  $pK_a$  değerleri farklıdır (Bosch ve ark., 1998). 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 standart çözeltisi (RVS) olarak potasyum hidrojen fitalat (KHP) çözeltisi seçilmiş ve 0,05 mol/kg fitalat temel alınmıştır (Rondinini ve ark., 1987).

Asetonitril-su ortamında (%70'e kadar) potasyum hidrojen fitalat tamponu için çeşitli sıcaklıklarda standart pH değerleri belirlenmiştir ve değerler Çizelge 2.3'de verilmiştir (Rondinini ve ark., 1987).

**Çizelge 2.3.** Asetonitril su karışımında 0,05 m KHP için pH<sub>s</sub> değerleri

t, °C	Asetonitrilin ağırlıkça yüzdesi (% w/w) ve mol kesri, x				
	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

Asetonitril-su ve metanol-su gibi çözücü karışımlarında standart referans tampon çözeltilerinin bu ortamlara ait pH değerleri, pH<sub>s</sub>, bilindiği için bu karışımlarda pH ölçümleri pH'nın tanımına uygun olarak aşağıdaki bağıntı dikkate alınarak yapılır.

$$\text{pH}_x = \text{pH}_s + \frac{E_s - E_x}{g} \quad (2.10)$$

Burada pH<sub>x</sub>, X çözeltisinin pH değeri, pH<sub>s</sub>, referans standart çözeltinin pH değeri, E<sub>s</sub> ve E<sub>x</sub> sırasıyla referans standart çözeltinin ve X çözeltisinin e.m.k değerleri ve g, Nerst sabitidir (g = (ln10)RT/F).

Mobil fazın pH'sı, alıkonmanın anlaşılmasında son derece önemlidir. Mobil faz pH'sı, çözünenlerin iyonlaşma derecesini, durgun faz ve mobil faz katkılarının davranışlarını etkilediği için seçiciliğin optimizasyonunda dikkate alınmalıdır. 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 genişliği ve pik simetrisi de değişir. Bu nedenle ayırmanın hesabında pik simetrisinin de göz önüne alınması gerekir.

## 2.6. Metodun Geçerli Kılınması

### 2.6.1. Metodun Geçerli Kılınmasının Önemi ve Genel Tanımlar

Metodun geçerli kılınması, metodun validasyonu, metodun performans özelliklerinin anlaşılması ve metodun bilimsel olarak her şart altında uygulanabileceğinin garanti altına alınması için yapılan kontrollerdir veya diğer bir ifadeyle belirli şartların, yasal gerekler, müşteri beklentileri, üretim (proses) gereklilikleri, istenilen değerler için objektif delillerin ortaya konmasıyla ve deneylerle ispatlanmasıdır(Eurachem Working Groups, 1998). Validasyon sürecinin en önemli adımlarından biri metodun performans parametrelerinin belirlenmesidir ki bunlar aşağıda verilmiştir:

- Spesifiklik ve Seçicilik,
- Kesinlik,
  - ✓ Tekrarlanabilirlik,
  - ✓ Tekrar elde edilebilirlik,
- Doğruluk,
- Lineerlik ,
- Ölçüm aralığı,
- Referans standartlar ile karşılaştırma,
- Kararlılık,
- Tutarlılık,
- Tayin Limiti (LOD),
- Ölçüm Limiti (LOQ),
- Sağlamlık ,

#### 2.6.1.1. Spesifiklik ve Seçicilik

Spesifiklik, deney koşullarında örnek bir matriks içindeki diğer bileşenlerin analitle etkileşmeden doğru sonucun verilmesinin sağlanmasıdır (Eurachem Working Groups, 1998) . Yani bir metodun yalnızca istenilenin hesaplanması hususundaki



kabiliyetidir. Seçicilik ise belirli bir prosedüre göre bir maddenin belirlenmesinde diğer maddelerle nicel olarak etkileşme derecesidir.

Analizi yapılacak maddenin, numunede bulunan girişim yapma ihtimali bulunan diğer yardımcı veya etken maddeler yanında miktarının tam ve doğru olarak tayin edilebileceğini gösteren bir parametredir. Bu kompleks numune karışımlarının analizinde girişim derecesinin de bir ölçüsüdür. Etken madde yanında safsızlıkların, parçalanma ürünlerinin, benzer kimyasal maddelerin bulunduğu numune ile bulunmadıkları numunede yapılan miktar tayini analizlerde etkin maddenin bulunan konsantrasyonları arasındaki fark olarak ifade edilir. Özellikle stabilite tayini çalışmalarında yapılması kesinlikle zorunlu olan bir parametredir. Seçicilik yeterli düzeyde değilse, yöntemin doğruluğu, kesinliği ve doğrusallığı hakkında bir şüphe uyanır. Seçicilik, miktar tayini sırasında gerekli validasyon işlemleri yapılırken, teşhis testleri ve safsızlıkların tayini sırasında yapılmalıdır. Kütle spektrometri ile birleştirilmiş yöntemlerin kullanılması durumunda girişimin olmadığı kabul edilir.

Seçicilik 2 yolla saptanır:

- 1) Tayini yapılan bileşik ile girişim yapma olasılığı bulunan maddelerin girişim yapma oranına veya ayırma yöntemlerinde, “Ayrım gücü” ( $R_s$ ) değerlerine bakılır. Bu değer ayırma yöntemleri için  $R_s \geq 2.0$  olmalıdır.
- 2) Ayırma yöntemlerinde duyarlı bir dedektör seçilebilir. İncelenecek bileşiğe cevap verme yeteneğine sahip olan dedektörler elektrokimyasal veya radyoaktivite dedektörleridir. Bu dedektörler belli maddelere duyarlıdır ve başka maddelerin girişim yapma ihtimalini yok ederler.

1. basamaktaki işlem için:

- a) Bütün bilinen veya girişim yapmasından şüphe edilen maddeler aynı anda geliştirilen yöntemle analiz edilir ve cevaptaki değişim incelenir. Ayırma yöntemlerinde bilinen veya girişim yapmasından şüphe edilen maddeler aynı anda kolona etken madde ile birlikte enjekte edilir ve ayırım gücü değerlerine bakılır ( $R \geq 2.0$  olmalıdır).

b) Geliştirilen yöntemin şartlarında ufak değişiklikler oluşturulur (pH, tampon, iyon şiddeti, sıcaklık gibi). Bu değişiklikler sonucu cevapta bir farklılık olup olmadığı, ayırma yöntemlerinde herhangi bir ilave pik olup olmadığı ve bunun madde pikini etkileyip etkilemediği saptanır.

c) Ayırma yöntemlerinde kütle spektrometresi dedektörleri gibi duyarlı ve hassas tekniklerle veya DAD (Fotodiyot dizisi) dedektörü ile değişik dalga boyunda deney anında taramalar yaparak herhangi ilave bir pik olup olmadığını kontrol edilir (Gümüştaş M., 2009).

#### **2.6.1.2. Kesinlik**

Geliştirilen yöntemin çalışılan koşullar altında tekrarlanabilirliğinin ölçüsüdür. Başka bir ifade ile bir numuneye aynı yöntem birden çok sayıda uygulandığında analit için bulunan sonuçların birbirine yakınlığının bir ölçüsüdür (Gümüştaş M., 2009).

#### **2.6.1.3. Tekrarlanabilirlik**

Kısa zaman aralığı içerisinde aynı işlem koşulları altındaki kesinliği ifade eder. Analizi yapılacak maddenin çalışma ortamındaki çözeltisi hazırlanır ve bu çözeltilerden en az 10 ölçüm yapılır. Bu tekrar edilebilirlik gün içi veya çalışma sırasındaki kesinlik olarak da adlandırılır. Sonuç olarak tekrarlanabilirlik bağlı standart sapma ile ifade edilir (Gümüştaş M., 2009).

#### **2.6.1.4. Tekrar Elde Edilebilirlik**

Tekrar elde edilebilirlik özellikle ortak çalışma yapan farklı laboratuvarların uygulamaları sonucu elde edilen ve deneysel farklılıkları belirten bir kesinlik derecesidir. Özellikle yöntem standardizasyonu çalışmalarında kullanılan bir kesinlik değeridir. Geliştirilecek yöntem farklı laboratuvarlarda da aynı anda kullanılacaksa bu kesinliğin hesaplanması ve değerinin raporda belirtilmesi gerekir. Analizi yapılacak maddenin çalışma ortamındaki çözeltisi ayrı ayrı laboratuvarlarda, farklı zamanlarda ve farklı analizciler tarafından, en az bir kaç gün ara ile, hazırlanır ve bu çözeltilerin her birinden en az 3'er ölçüm yapılır (Gümüştaş M., 2009).

#### **2.6.1.5. Doğruluk**

Analiz sonucu elde edilen değer gerçeğe yakınlığının ölçüsüdür. Sonuçlar ortalama % geri kazanım olarak verilir. Ortama ilave edilen analitin analiz yapılan ortamdan hangi oranda geri alınabildiğini gösterir.

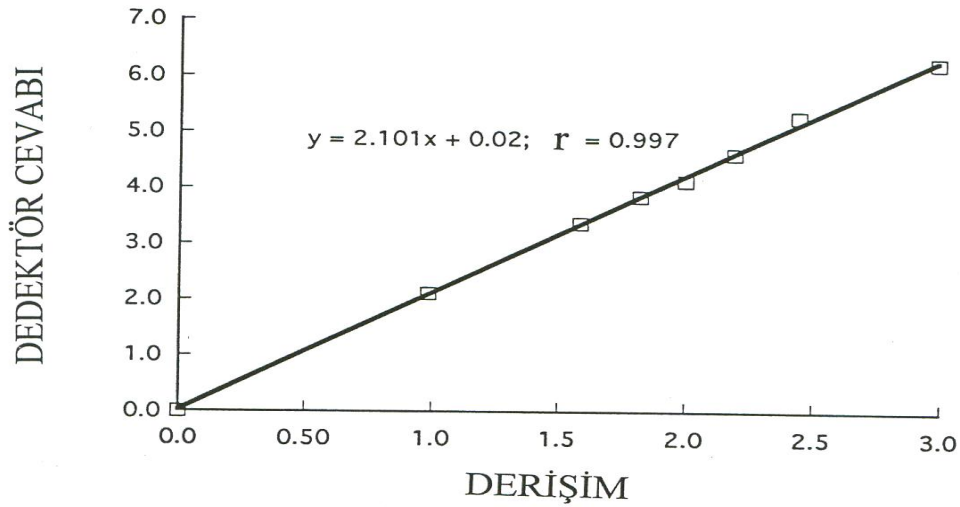
Kullanılan cihazlardan yapılan ölçümlere dayalı olarak hesaplanır. Geri kazanım çalışmaları en az 3 değişik derişim için yapılır; alçak (tayin alt sınırında veya yakın konsantrasyonunda), orta (çalışma konsantrasyon aralığının ortasında yer alan bir konsantrasyonda) ve yüksek (çalışma konsantrasyon aralığının üst sınırlarında veya yakınında yer alan bir konsantrasyonda) derişim değerleri seçilerek kullanılır. Seçilen her bir konsantrasyon için minimum 5 tayin yapılmalıdır.

Bu tayinlerden minimum 3 tanesi, ortalama değer %15'inden daha fazla sapma göstermemelidir. Tayin alt sınırındaki konsantrasyon için bu sapma % 20' yi geçmemelidir.

Geri kazanım çalışmaları için 3 yol izlenebilir. Bunlar, referans standart ile karşılaştırmak, kör matriks ortamına analizi yapılan maddeyi ilave etmek ve standart ekleme yöntemi ile saf madde ilavesidir (Gümüştaş M., 2009).

### 2.6.1.6. Kalibrasyon Doğrusu

Analitin bilinen derişimleri ile cihazlarda ölçülen değerler arasındaki ilişkidir. Bir kalibrasyon eğrisi hazırlanırken seçilen derişimler daha önce yapılan çalışmalarla belirlenir. Doğrusal veya doğrusal olmayan sonuçlar elde edilebilir. Tayin alt sınırı ve tayin üst sınırı derişimleri de dahil olmak üzere çalışma aralığında en az 5 derişim için cihazdan ölçülen değerlere göre hazırlanır. Doğrusal olmayan eğriler için daha fazla standart derişimin seçilmesi uygun olur.



Şekil 2.4. Kalibrasyon doğrusu ve eşitliği

### 2.6.1.7. Doğrusallık

Bir analitin konsantrasyonu ile test sonuçlarının doğru orantılı olma eğilimidir. Yani derişime karşı cevabın doğru orantılı olarak artması ve çizilen grafikte noktaların düz bir çizgi üzerinde yer almasıdır. Eğim (m), kesişim (n) ve korelasyon katsayısı (r) doğrusallığı veren parametrelerdir. Bunlar analit derişiminin ölçülen değerlere karşı regresyon analizleri ile matematiksel olarak hesaplanır. Doğrusallık, korelasyon katsayısı  $r = 0,999$  ve üzerinde ise sağlanmış demektir. Doğrusallığı belirleyebilmek için stok çözeltiden en az 5 değişik derişimin hazırlanması ve analiz edilmesi gerekir. Bu derişimin alt sınırı hedef seviyenin % 50' sinden düşük ve üst sınır da %150'sinden yüksek olacak aralıkta seçilmelidir. Bu 5 değerle yapılan doğrusallığın saptanması işleminin en az 3 defa tekrarlanması gerekir. Doğrusallığın tam validasyonu için ayrıca eğim ve kesim değerlerinin % bağıl standart sapmalarını veya standart hataları da hesaplanmalı ve raporda verilmelidir (Gümüştas M., 2009).

### 2.6.1.8. Ölçüm Aralığı

Yeterli doğruluk ve duyarlıkta doğrusallığa sahip yöntemin geçerli olduğu alt ve üst sınırlar arasında yer alan derişim aralığıdır. Derişim aralığı genellikle seçilen yöntemin tipine göre değişir. Bu aralık yöntemin doğrusallığı bulduktan sonra belirlenir. Ana maddenin analizinde standartların derişimleri genellikle hedeflenen seviyede veya ona yakın ölçülür. Bu derişimin alt sınırı hedef seviyenin % 50 sinden düşük ve % 150 sinden yüksek olacak aralıkta seçilmelidir. Hedef miktarın % 50, 75, 100, 125 ve 150 olacak şekilde aralık düzenlenebilir.

### 2.6.1.9. Referans Standartlar ile Karşılaştırma

Geliştirilen analiz yöntemi ile 3 farklı derişimde, 3'er ölçüm alınır ve bu değerler % geri kazanım değerlerine çevrildikten sonra tümü bir araya getirilir. Sonuçlar

referans kabul edilen veya basılı olan başka bir yöntem sonuçları ile istatistiksel olarak karşılaştırılır. Bu karşılaştırma işlemi için student-t ve Fisher (F) testleri kullanılır.

Student-t testi ile iki yöntemin ortalamaları arasındaki, F testi ile de standart sapmaları arasındaki farklılık karşılaştırılır. Hesapla bulunan t ve F değerleri çizelgelerde verilen teorik t ve F değerleri ile kıyaslanır. Hesapla bulunan değerlerin çizelgede yer alan değerlerden küçük oluşu geliştirilen yöntemin en az referans olarak kabul edilen yöntem kadar hassas olduğunu gösterir. Sonuçların ortalamaları, % bağıl standart sapma (% BSS) ve % bağıl hata (BH) ile beraber verilir.

$$\text{Bağıl Standard Sapma (\%)} = \frac{SS}{\bar{x}} \times 100 \quad (2.11)$$

$$\text{Bağıl Hata (\%)}: \frac{GD - \bar{x}}{GD} \times 100 \quad (2.12)$$

Burada, GD: Gerçek Değer, SS: Standart Sapma ve  $\bar{x}$ : Ortalama Değeri ifade eder.

#### 2.6.1.10. Teşhis Sınırı, Gözlenebilirlik Sınırı ( LOD)

Analitin ölçülen en küçük konsantrasyonudur. Doğrudan, yapılan deneylerden veya hesapla bulunabilir. Rehber dokümanında verilen formüle göre aşağıdaki gibi bulunabilir (Eurachem Working Groups, 1998).

$$X_L = X_{bl} + k \cdot S_{bl} \quad (2.13)$$

$X_L$  :Tayin Limiti,

$X_{bl}$  :Ölçülen körün ortalaması,

$S_{bl}$  :Ölçülen körün standart sapması

k : Sayısal katsayı, % 95 güven aralığı için k=2,

Analitik cihazlar için;

Doğrudan yapılan deneylerden, gözlenerek yapılan hesaplamalarda genel olarak Sinyal/Gürültü oranı 3 olarak alınır. Hesaplama yolu ile teşhis sınırı saptanmasında;

$$LOD = 3.3 \times \frac{SS}{m} = 4. S_{x_0} \quad (2.14)$$

eşitliği kullanılır. Bu eşitlikte SS= Standart çözeltilerde (en az 5 adet) yöntem uygulandığında elde edilen sonuçların veya ilgili kalibrasyon doğrusunun kesişim değerinin standart sapması, m = ilgili kalibrasyon doğrusunun eğim değeri,  $S_{x_0}$  = Kalibrasyon standart sapmasıdır.

#### 2.6.1.11. Tayin Alt Sınırı (LOQ)

Analizi yapılan maddenin kabul edilebilir düzeyde kesin ve doğru olarak miktarının tayin edilebileceği, doğrusallık sınırları içerisine girmeyen veya kalibrasyon eğrisinin en alt derişimini oluşturan konsantrasyon düzeyidir. Doğrudan yapılan deneylerden veya hesapla bulunabilir. Doğrudan yapılan deneylerden gözlenerek TAS tespiti için genel olarak Sinyal/Gürültü oranı 10 olarak alınır. Hesaplama yolu ile tayin alt sınırı saptanmasında,

$$LOQ = 10 \times \frac{SS}{m} \quad (2.15)$$

Eşitliği kullanılır. SS = Standart çözeltilerde (en az 5 adet) yöntem uygulandığında elde edilen sonuçların veya y eksenindeki kesişim değerinin standart sapması, m = ilgili kalibrasyon doğrusunun eğim değeridir. SS ve m değerleri LOD eşitliğinde kullanılan değerlerle aynıdır.

IUPAC'a göre ölçüm limiti, örneğin kabul edilebilir kesinlik ve doğruluktaki ölçülen en düşük derişimidir.

$$L_Q = k_Q \cdot \sigma_Q \quad (2.15)$$

IUPAC'a göre  $k_Q$ 'nin başlangıç değeri 10'dur.  $\sigma_Q$  ise örneğin belirlenen noktadaki standart sapmasıdır.

#### **2.6.1.12. Sağlıklık Testleri,**

##### **2.6.1.12.1. Kararlılık**

Yöntemin, analiz parametrelerindeki (sıcaklık, pH, hareketli faz yüzdesi vb.) ufak değışimlerden etkilenmeden kalabilme kapasitesidir. Bu parametreler organik çözücü yüzdesi, pH, iyonik güç, sıcaklık gibi etkenlerdir. Kararlılık yöntemin normal kullanımındaki güvenilirliğinin bir ölçüsüdür ve yöntem geliştirilirken değerlendirilmesi gereken bir parametredir.

##### **2.6.1.12.2. Tutarlılık**

Yöntemin gerçek kullanım koşulları altında tekrar edilebilirliğinin saptanmasıdır. Bunun için çalışmanın: aynı laboratuvarında farklı analizciler tarafından; aynı laboratuvarında farklı cihazlar tarafından gerçekleştirilmesi; Reaktif ve çözücülerin



markalarının değiştirilmesi; farklı günlerde ve sıcaklıklarda yapılması gibi normal test şartlarının değiştirilmesi; ayırma yöntemlerinde aynı marka ve modele sahip yeni bir kolon kullanarak tekrarlanması gereklidir.

#### **2.6.1.13. Metodun Geçerli Kılınmasında Kullanılan Araçlar**

- Standart rnek
- Kalibrasyon Standardı
- Katkılı (Spike) rnek
- Paralel Analiz
- Kalite Kontrol
- Sertifikalı Referans Maddeler (CRM)
- İstatistiki yöntemler

#### **2.6.1.14. Metodun Geçerli Kılınması Nasıl Yapılır?**

Kaynak araştırması sonucunda bazı çalışmalarda metodun geçerli kılınması aşamaları incelendiğinde metodun geçerli kılınması dört aşamada gerçekleştiği görülmektedir.

- Tanımlama: Yukarıda tanımlanan 1., 2. ve 3. adımlarda yapılan işlemler bu aşamada yapılır. Ne hesaplanacak, hesaplamalarda hangi araçlar, hangi sarf malze- meler kullanılacak bu aşamada belirlenir.
- Çevresel şartların ve deneysel şartların belirlenmesi: Deneyin yapıldığı çevresel şartlar, sıcaklık, nem, basınç vb. gibi çevresel şartlar belirlenir. Deneyin yapıldığı yer ve ortamla ilgili spesifik özellikler mevcutsa bu gibi şartlar ortaya konur.
- Metot performans parametrelerinin belirlenmesi: metot performans parametreleri belirlenir.

- Metot geçerlilik deneylerinin yapılması ve sağlamlık testi: Belirlenen Őarlarda metot geçerlilik deneyleri yapılır ve metot performans parametrelerine göre değerlendirmeler yapılır. Metodun ispatı için sağlamlık testleri ve diğer kalite kontrol testleri, karşılaştırma deneyleri v.s. yapılır. Sonuçlar raporlanır.

### 3. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Meyve, sebze ve özellikle elma ve elma türevi ürünlerde patulinin tayini için sıklıkla YPSK yöntemi kullanılmaktadır. Bu metot AOAC tarafından kabul edilmiş 5 µg/L tayin limitli UV-görünür bölge detektörlü olan YPSK yöntemidir. Ayırmalar genellikle kapalı uçlu oktadesil silika kolonlar kullanılarak yapılmaktadır. Analiz dalga boyu olarak 276 nm tercih edilmektedir. Gıdalarda patulin sentezi asidik ortamda gerçekleşmektedir. Optimum pH değeri 3,0-6,5 arasındadır. Patulinin düşük pH değerlerinde daha kararlı olduğu belirtilmiştir. Bundan dolayı analizlerde asidik ortamlar tercih edilmektedir. Mobil fazlarda organik çözücü olarak % 3 - % 10 aralığında asetonitril tercihli olarak kullanılmıştır. Ortamdaki patulinin kararlılığını pH değeri önemli düzeyde etkileyebilmektedir. (Moake, M.M, 2004) Patulin kaybı, pH değeri 6-8 arasında değişen tampon çözeltilerde farklı olmaktadır (Artık, N.B, 1992).

Bazı çalışmalarda kütle spektrometresi (MS), sıvı kromatografisi (LC) ve gaz kromatografisi (GC) kullanılarak patulin tayini yapılmıştır. Llovera ve arkadaşları 2000 yılında yaptıkları çalışmada, elektronik basınç kontrollü gaz kromatografisi ile yaptıkları patulin tayininde, tayin limitini 4 µg/L olarak tespit etmişlerdir ( Llovera, M., 1999). Roach ve arkadaşları da 2002 yılında yaptıkları çalışmada TMS (Trimetil silal) olarak patulin kullanmış ve patulin tayini yapmışlardır ( Roach J.A.G., 2002).

Diğer bir çalışmada ise Sewran ve arkadaşları (2000), YPSK ve MS kullanarak tayin limitini 4 µg/L olarak belirlemişler ve YPSK/UV ile yapılan karşılaştırmada tam benzerlik (R=0,99) tespit etmişlerdir (Sewram V., 2000).

Uygun ve Ekşi 2000 yılında yaptıkları çalışmada Geipel ve arkadaşları (1981), Babsky (1985), ISO 8128 (1993), Brause ve ark. (1996 ) tarafından belirlenen 4 adet YPSK yöntemini karşılaştırmışlardır. Yöntemlerin tekrarlanabilirlikleri, varyasyon

katsayıları, uygulanabilirlik ile değerlendirmeler yapılmış ve en yeterli yöntemin ISO 8128 (1993) olduğu sonucuna varılmıştır (Uygun M. ve ark, 2000).

Elvira M.S.M. ve ark. 2008 yılında asidik (su-asetonitril-HClO<sub>4</sub> ((97:3):0.01%, v/v, pH ~3)) ve asidik olmayan (su-asetonitril(97:3,v/v,pH~8)) mobil faz kullanarak furfuraldehitleri (2-furfural (2-F), 5-methylfurfural (5-MF) and 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF) ve patulin tayini yapmışlardır. Asidik olmayan mobil fazda 2-furfural ile patulinin üst üste geldiği gözlenmiştir. Asidik mobil fazda ayrılmaların etkin olduğu tespit edilmiş ve devamında Hollanda balında, kesme şekerde, doğal şekerde v.s. 2-F,5-MF,5-HMF ve patulin tayinleri yapılmıştır. (Elvira M.S.M, 2009)

Li J.K. ve arkadaşları 2005 yılında katı faz özütlemeli YPSK yöntem ile sıvı faz özütlemeli YPSK yöntemini karşılaştırmışlar ve katı faz özütlemeli YPSK yönteminin geri kazanım açısından daha iyi, daha hızlı ve güvenilir bir yöntem olduğunu ortaya koymuşlardı (Li J.k. ve ark, 2005).

Bir diğer araştırmada 2005 yılında Baert K. ve arkadaşları bulanık elma sularında ve elma sularında patulinin katı parçacıklardaki proteinlere bağlanarak geri kazanım yüzdesinin düşmesine neden olduğu ve YPSK-UV'de bağlanan patulinin tespit edilemediği üzerinde durulmuştur. Bu bağlanmanın ortamı asidik yaparak en aza indirilebileceği belirtilmiştir. Bu bağlanmanın LC-MS ile tespitinin yapılabileceği sonucuna varılmıştır (Baert, K. 2005).

Bir diğer araştırmada Katerere, D.R. ve arkadaşları 2006 yılında katı kurutulmuş elma parçalarında patulinin elde edilmesi hususunda dipektinizasyon yöntemini kullanarak yeni bir metot geliştirmiş ve geliştirilen yöntem geçerli kılınmıştır (Katerere, D.R., 2006).

Moake, M.M., ve ark.'na göre Dünya sağlık örgütü (WHO), Avrupa Birliği mevzuatları çerçevesinde belirlenen uluslararası kriterlerin ortaya koyduğu patulin miktarı (50 ppb) ve bu miktarın günlük alımı (0,4 µg/kg; vücut ağırlığı/gün) konusunda bebekler, çocuklar ve yetişkinler üzerindeki etkilerini inceleyen çalışmalar yapılmıştır. Elma suyu ve elma kaynaklı gıdaların çocuklarda tüketim oranı 6,4 g/kg; vücut ağırlığı/gün iken, yetişkinlerde bu oran 1,0 g/kg; vücut ağırlığı/gün'dür. Dolayısıyla bu durum çocukların patulin zehirlenmesi riski ile karşı karşıya olduklarını ortaya koymaktadır (Brondon E.F.A., 2006; Plunket L.M, 1992).

Bu çalışmaların yanında kaynakların bir kısmı da piyasada üretilen meyve suyu, elma ve elma türevi meyve sularında bulunma ihtimali olan patulin miktarlarının hesaplanması hususundaki çalışmalardır. Bebek gıdalarında yapılan analizlerde LOD 1-2 µg/kg arasında, LOQ'nun ise 3-3,9 µg/kg arasında olduğu görülmektedir. G. Cano-Sancho (2009) tarafından İspanyanın Katalonya eyaletinde yapılan bir araştırmada maksimum patulin miktarı 9,6 µg/kg olarak tespit ettikleri görülmektedir.

Yapılan diğer çalışmalar Çizelge 3.1'de özetlenmiştir.

**Çizelge 3.1.** Elma ve Elma türevi gıdalarda ve bebek gıdalarında yapılan analizler ile bulunan değerler

Yapılan Çalışmalar	Alıkonma zamanı	LOD (µg/kg)/ LOQ (µg/kg)	Geri kazanım (%)	Patulin miktarı (µg/kg)
Bonerba, E. ve Ark.,2010, (İtalya)*	--	1 /3	% 95	3 - 10
Marín,S. ve ark, 2011 (İspanya) *	HMF: 8-9, Patulin:9-10 dakika	2,1/-	% 94,6, % 80,9,% 72,7	0
Barreira,M.J. ve ark., 2010 *	Patulin 11- 12 dakika	1.2/3.9	% 53-% 74	5,5
Sancho, G.C. ve ark., 2009 *	--	2,08/6,25	90,9, 72,7,81,5, 80,9	9,6
Piemontese,L.ve ark., 2005	13,71 dakika	0,2/0,5-1,2		13
Elvira M.S.M, 2009	13,5 dakike	0,09/0,26	% 91-94	13,6
Li J.k. ve ark, 2005	9,482 dakika	0,005/--	% 91-114	--

\* Bebek gıdalarında yapılan analizler

## **4. MATERYAL VE YÖNTEM**

### **4.1. Genel Bilgi**

Bu bölümde bebek gıdalarında YPSK yöntemiyle patulin tayininde kullanılan cihazlar, kimyasallar ve yöntem hakkında bilgi verilmiştir.

### **4.2. Kullanılan Cihazlar**

#### **4.2.1. Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi Cihazı**

Bebek gıdalarında YPSK yöntemiyle patulin tayininde, Shimadzu marka YPSK cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sistemde, sistem kontrol ünitesi (CBM 20A), pompa (LC20 AD), dedektör (SPDM 20A Foto Diyod Array), kolon fırını (CTO 20 AC) ve gaz giderme ünitesi (DGU 20 A) bulunmaktadır.

Yapılan çalışmada, Phenomenex Synergy (4 µm, 250 mm x 4,6 mm ID), Phenomenex Luna C18 (2) 100A° (5 µm, 250 mm x 4,6 mm ID) ve Phenomenex Gemini C18 110 A (3 µm, 250 mm x 4,6 mm ID) kolonları kullanılmıştır. Bu çalışmada kolonların alıkonma zamanları incelenmiş ve kolon sıcaklığı 25, 30, 35 ve 40 °C' de incelenerek kolon seçimi yapılmış, en uygun kolon sıcaklığı belirlenmiştir. Bu çalışmalar neticesinde Phenomenex Gemini C18 110 A (3 µm, 250 mm x 4,6 mm ID) kolonunda gerçekleştirilmiştir. Bu kolon, asidik ve bazik bileşikler için sıklıkla kullanılan yeni jenerasyon bir kolondur. Çalışma pH aralığı 1-12'dir.

#### **4.2.2. pH / İyon Metre**

YPSK mobil fazının pH ölçümlerinde Metleer Toledo MA 235 pH/ iyon analiz cihazı kullanılmıştır. Hanna HI 1332 Ag/AgCl kombine cam elektrottan yararlanılmıştır.

#### **4.2.3. UV Spektrofotometresi**

Spektroskopik titrasyonlar, Perkin Elmer Lambda 25 model cihaz kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

#### **4.2.4. Döner buharlaştırıcı**

Örneklerin özütleme aşamasından sonra buharlaştırılmaları stuard markalı döner buharlaştırıcı (rotavapor) ile yapılmıştır.

#### **4.2.5. Ultrasonik Banyo**

Hazırlanan mobil fazlar ultrasonik banyo ile degaze edilmiştir. Standardların çözünmesinde kullanılmıştır.

#### **4.2.6. Terazı**

Numune tartımları Mettler Toledo markalı terazide yapılmıştır. (0,0001 gr.)

#### **4.2.7. Katı Faz Özütleme Düzeneği**

Supelco markalı, Katı faz özütleme düzeneği ve Waters marka OASIS HLB 1 cc katı faz kartuşu kullanılmıştır.





**Resim 4.1.** Katı faz özütleme düzeneği

#### **4.2.8. Vorteks Karıştırıcı**

Biosan markalı, Vorteks V1-Plus karıştırıcı numune hazırlama aşamasında ve enjeksiyon öncesinde kullanılmıştır.

#### **4.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler**

Deneylerde kullanılan bütün kimyasal maddeler, analitik veya YPSK saflıktadır.

**Çizelge 4.1.** Çalışılan kimyasallar ve özellikleri

Kimyasalın Adı	Kullanım amacı	Açıklama
Patulin (4-hidroksi-4H-furo[3,2-c]piran-2(6H)-1)	Standart olarak	UV @ 276 nm, C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub> MA: 154,12 g/mol
Hidroksi metil furfural (5-HMF)	İç standart olarak	UV @ 280 - 285 nm, C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> , MA:126,1 g/mol
Sodyum hidroksit	Mobil faz pH'sının ayarlanmasında,	Merck, analitik saflıkta
KBr	Kolonda tutunmayan türün kolonu terk etme zamanını belirlemede,	Merck, analitik saflıkta
Susuz Sodyum Sülfat	Çözelti içindeki suyu almak için,	Merck (Referans Değer Standardı)
Asetonitril	Hareketli faz olarak kullanılmıştır.	Merck , YPSK saflığında
Metanol	Standartları çözme işleminde,	Merck , YPSK saflığında
Kloroform	Patulinin çözülmesinde,	Merck, YPSK saflığında
n-Hexan	Katı faz özütlemesinde kartuşta tutunan patulinin alınmasında,	Merck, YPSK saflığında
Etil asetat	Numunelerin hazırlanması aşamasında	Merck, analitik saflıkta
Asetik asit	Mobil fazın pH'sını ayarlamak için	Merck, analitik saflıkta
Sodyum karbonat	Yıkama ile safsızlıkları ayırmak için	Merck analitik saflıkta
Perklorik asit	Ortamı asidik tutmak için	Merck analitik saflıkta
Sodyum Bikarbonat	Fenolik safsızlıkları uzaklaştırmak için	Merck analitik saflıkta
Potasyum hidrojen fitalat	pH metre için kalibrasyon çözeltisi	Merck (Referans Değer Standardı)

#### **4.4. Kullanılan Çözeltiler**

##### **4.4.1. Patulinin YPSK Ayırımında Kullanılan Çözeltileri**

##### **4.4.2. %5 (v/v) Asetonitril -Su İkili Karışımı**

100 mL'lik stok ortam için 95 mL saf su alınmış, üzerine 0,1 mL perklorik asit ve 5 mL asetonitril ilave edilmiştir.

##### **4.4.3. %10 (v/v) Asetonitril -Su İkili Karışımı**

100 mL'lik stok ortam için 90 mL saf su alınmış, üzerine 0,1 mL perklorik asit ve 10 mL asetonitril ilave edilmiştir.

##### **4.4.4. %15 (v/v) Asetonitril -Su İkili Karışımı**

100 mL'lik stok ortam için 85 mL saf su alınmış, üzerine 0,1 mL perklorik asit ve 15 mL asetonitril ilave edilmiştir.

##### **4.4.5. %15 (v/v) Asetonitril -Su İkili Karışımı (15 mM Asetik Asit)**

100 mL'lik stok ortam için 85 mL saf su alınmış, üzerine 15 mL asetonitril ilave edilmiştir. Bu ortama 15 mM olacak şekilde derişik asetik asit ilave edilmiştir. pH ayarlamalarında su-asetonitril karışımında hazırlanmış NaOH'den (1M) gerekli miktar ilave edilmiştir.

##### **4.4.6. Potasyum Hidrojen Fitalat Çözeltisi**

$C_6H_4(COOK)(COOH)$ , primer standart pH referans çözeltisi olarak kullanılmıştır. 2 saat  $110^{\circ}C$ 'da kurutulmuştur. 0,05 molal derişimde kullanılmıştır.Çalışmalarda gerekli çözeltiler, kullanılacakları gün hazırlanmışlardır.

#### 4.4.7. Potasyum Bromür Çözeltisi

Çalışılan koşullarda kapasite faktörlerinin belirlenmesi için kullanılan KBr çözeltisi, derişimi % 0,01 (w/v) olacak şekilde suda hazırlanmıştır. KBr'nin hazırlanan bu çözeltisinden 20 µL enjekte edilerek kolonda tutunmayan türe özgü  $t_0$  alıkonma zamanı belirlenmiştir. Çalışma dalga boyu 200 nm'dir.

#### 4.4.8. Patulin ve HMF Stok Çözeltisinin Hazırlanması

TS EN 15890/Ocak 2011 sayılı Türk Standardına göre 5 mg patulin standardı etil asetatla çözülür. Çözelti 25 mL'lik ölçülü balona aktarılır ve hacmi yaklaşık 200 g/mL patulin içeren bir çözelti hazırlama için etil asetatla işaret çizgisine tamamlanır. Stok çözeltisi -20 °C derecede saklanır.

10 mg HMF 50 mL ultra saf suda çözülerek hazırlanmıştır.

#### 4.4.9. Patulin Standart Çözeltisinin Hazırlanması

TS EN 15890/Ocak 2011 sayılı Türk Standardına göre stok solüsyondan azot gazı altında 1000 µl (1 ml) buharlaştırılır ve 10 µg/mL patulin elde etmek için 20 ml. etanol'de çözülür. Çözeltin kesin konsantrasyonu belirlemek için 250 nm ve 350 nm arasında 1 cm lik kuartz hücrelerde referans olarak etanol kullanılarak absorbans grafiği elde edilir. Maksimum absorbansı elde etmek için dalga boyu tayin edilir.

$$\rho_{pat} = \frac{A_{maks} \times M \times 100}{\epsilon \times b} \quad (4.1)$$

$A_{maks}$ : Absorbans grafiğinde maksimum absorbansı,

M: patulinin molar kütlesi (M=154 g/mol),

$\epsilon$ : Etanoldeki patulinin molar absorbans katsayısı (burada 1460 m<sup>2</sup>/mol)

b: kuvartz hücrenin eni,

Bu çözeltiyi yaklaşık -20 °C de buzdolabında saklanır. Bu saklama koşullarında birkaç ay boyunca saklanabilir. Çözelti 6 haftadan daha eski ise çözeltinin konsantrasyonunu tekrar tayin edilir. Çözelti kullanılmadan önce oda sıcaklığına geldiğinden emin olunur.

#### **4.4.10. Patulinin Kalibrasyon Çözeltisinin Hazırlanması**

Patulin stok çözeltisinden 0,5 ppm'lik patulin çözeltisi hazırlandı. HMF'nin stok çözeltisinden 1 ppm. lik çözelti hazırlandı. 0,5 ppm. lik patulin stok çözeltiden 0,001 ppm., 0,0025 ppm., 0,005 ppm., 0,01 ppm., 0,015 ppm., 0,02 ppm. 0,05 ppm. Patulin, 1 ppm.lik HMF çözeltisinden 0,025 ppm HMF olacak şekilde kalibrasyon çözeltileri hazırlandı. 0,025 ppm. HMF iç Standart olarak kullanılmıştır.

#### **4.5. Bebek Gıda Numunesinin Hazırlık Aşamasında Kullanılan Çözeltiler**

##### **4.5.1. Asetik Asit Tampon Çözeltisi, pH 4**

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

##### **4.5.2. Sodyum Karbonat Çözeltisi, %1,5 (w/v)**

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

##### **4.5.3. Sodyum Bikarbonat Çözeltisi, % 1 (w/v)**

1,0 g tartılmış sodyum karbonattan 100 mL'lik ölçülü balona alınmış, az miktarda ultra saf suda çözülmüş ve ölçü çizgisine kadar tamamlanmıştır.

#### **4.5.4. Asetik Asit Çözeltisi, % 0,1 (v/v)**

0,1 mL asetik asit 100 mL'lik ölçülü balona alınmış ve ultra saf su ile ölçü çizgisine kadar tamamlanmıştır.

#### **4.6. Elüsyon Çözeltisi**

Etil asetat ve n-hexan % 60:40 (v/v) olacak şekilde hazırlanmıştır.

##### **4.6.1. Deneyde Kullanılan Numuneler**

Deneylerde marketlerde satılan toplam 6 adet ürün numune olarak alınmıştır. Bunlardan 3 adedi elma püresi içeren bebek gıdası, 3 ise bebekler için elma suyu ve elma oranı yüksek karışık meyve sularından oluşmaktadır.

**Çizelge 4.2.** Deneide kullanılan numunelerin özellikleri

Numunenin Tanımı	Son Kullanma Tarihi	Meyve Oranı
8699745003548 barkod no.lu Bebek ve Küçük çocuk ek gıdası Bebelac markalı Havuç Elma Püresi	14.09.2013	% 62 elma, % 33 havuç% 5 konsantre elma suyu
9062300117032 barkod no.lu Bebek ve Küçük çocuk ek gıdası Organik elmalı havuç püresi (Hipp markalı)	30.08.2013	% 25 elma, % 70 havuç
8699745000363 barkod nolu Bebek ve Küçük çocuk ek gıdası organik meyveli karışımlar (milupa markalı)	31.01.2014	% 34,03 üzüm suyu, % 17 elma, % 10 havuç % 4 muz
9062300116844 barkod nolu Bebek ve Küçük çocuk ek gıdası organik elma suyu (Hipp markalı)	31.05.2013	% 100 elma suyu
8697404760221 barkod nolu bebek ve küçük çocuk ek gıdası Organik karışık meyve suyu (Bambini markalı)	07.06.2012	--
8692971556390 barkod no.lu Bebek ve Küçük çocuk ek gıdası organik elma suyu (herobaby markalı)	08.03.2012	% 100 elma suyu

## 4.7. Yöntem

### 4.7.1. Sıvı Kromatografik Ayırmanın Optimizasyonu

Bu çalışmada %5 ACN (0,1 mL perklorik asitli) mobil faz hazırlanmış ve alıkonma zamanı ve pik simetrisi ve ayrılmalar incelenmiştir.

Bazı bileşiklerde kolon seçiminin önemli olmasından dolayı % 10 ACN (0,1 mL Perklorik Asit'li) mobil fazda Phenomenex -Gemini C18 110 A°, 250 mm x 4,6 mm x 3 µm (1.Kolon), Phenomenex-Synergy Hydro RP 80 A°, 250 mm x 4,6 mm x 4 µm (2.Kolon), Phenomenex – Luna C18 (2) 100 A° , 250 mm x 4,6 mm x 5 µm (3.Kolon) kolonlar karşılaştırılmış ve en uygun kolon seçilmiştir.

Yine aynı mobil fazda kolon sıcaklıkları karşılaştırılmıştır. En uygun sıcaklığın 40 °C belirlenmesinin ardından % 15 (v/v) Asetonitril -Su İkili Karışımı (perklorik asitli) mobil fazda 30, 35, 40 °C kolon sıcaklığında aynı çalışma tekrarlanmıştır.

Kromatogramlarda piklerin etkin ayrılmamaları üzerine pH'ın mobil fazın üzerindeki etkileri incelenmiş ve pH=2,5, pH=3,0, pH=3,5, pH=4,0'de ayrılmaların etkinliği incelenmiştir.

### 4.7.2. Sıvı - Sıvı Özütlemesi

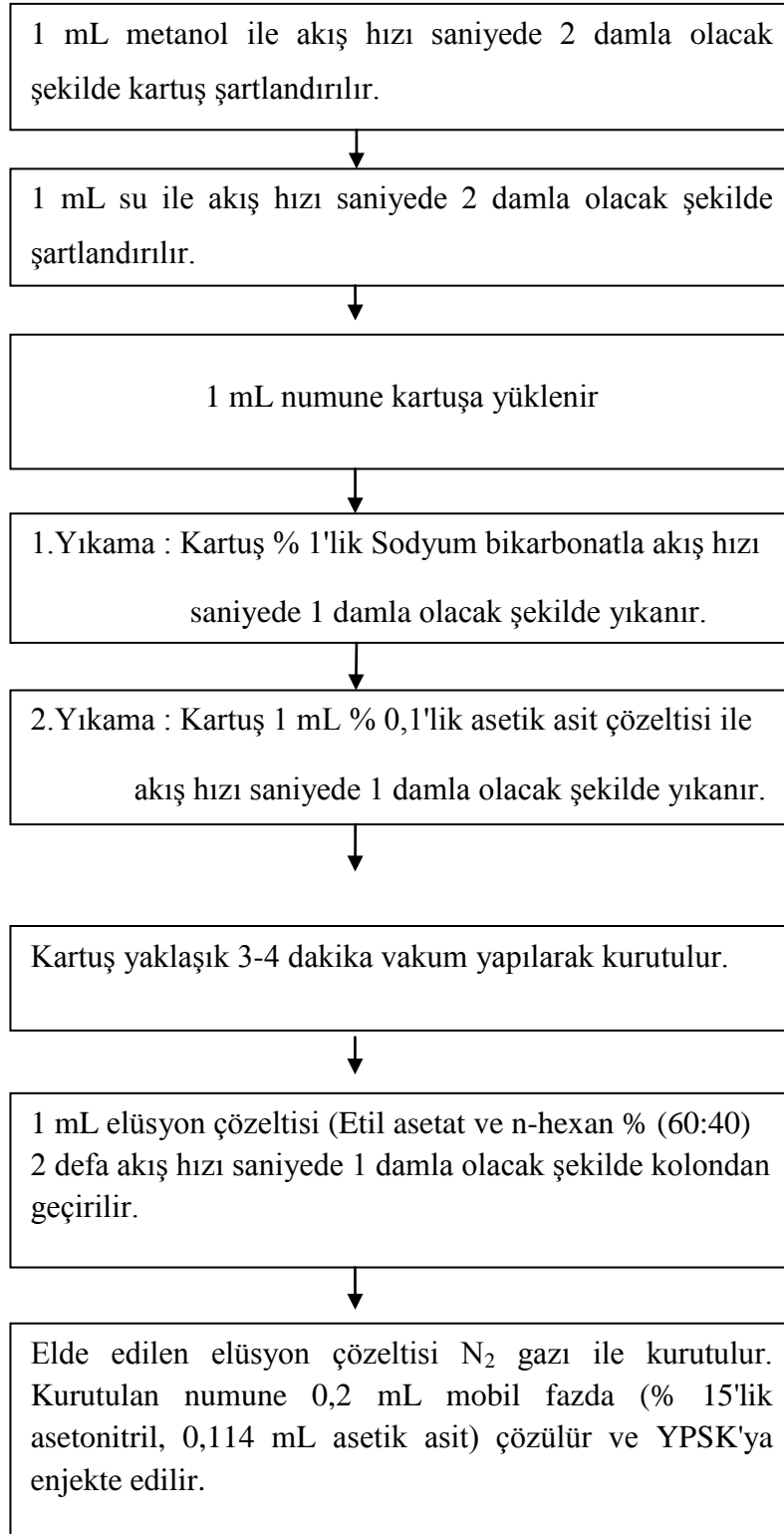
Numunedan 5 gram alınır. 10 mL saf su üzerine eklenir. 3 kez 25 mL etil asetat ile ayrılır. Her bir ayırma şiddetli bir şekilde 1 dakika çalkalanır. Organik fazlar bir araya toplanır ve 10 mL % 1,5' lık Sodyum Karbonat çözeltisi ile yıkanır. Yıkama işlemi 10 sn sürer. Organik faz en kısa sürede ayrılır. Sulu faz tekrar 10 mL etil asetat ile ayırma tabii tutulur. Organik fazlar birleştirilir ve üzerine 5 damla saf asetik asit eklenir. Organik faz 40 °C su banyosunda nitrojen gazı altında kurutulur. Kurutulan numune derhal 1 mL asetik asit tampon çözeltisinde çözünür. YPSK cihazına enjeksiyon yapılır (Li, J.K., 2007).



### 4.7.3. Katı – Sıvı Özütlemesi

Bonerba (2010) ve arkadaşlarının kullanmış oldukları metot bazı değişimle birlikte kullanılmıştır. 10 gram numune alınır üzerine 10 mL ultra saf su eklenir. Numune 15, 25, 50 mL farklı hacimde etil asetat ile ayırma tabi tutulur. Yaklaşık 10 dakika şiddetli bir şekilde karıştırılır. Organik fazlar bir araya toplanır. 9 mL % 1,5'luk sodyum karbonat çözeltisiyle yıkanır. şiddetli bir şekilde karıştırılır ve sodyum karbonatlı çözelti tekrar 10 mL etil asetat'la çalkalanır. Organik fazlar bir araya toplanır ve üzerine 4 gram sodyum sülfat (susuz) eklenerek karışım içindeki su alınır. Suyu alınan organik faz rotavapor ile kurutulur. Kuruyan numune 2 mL kloroformda çözülr.

Waters Oasis HLB 1 cc'lik katı faz kartuşu kullanım kılavuzuna göre katı faz özütlemesi aşağıdaki gibi şekil 4.1'deki şemaya göre yapılır.



**Şekil 4.1.** Katı faz özütleme şeması

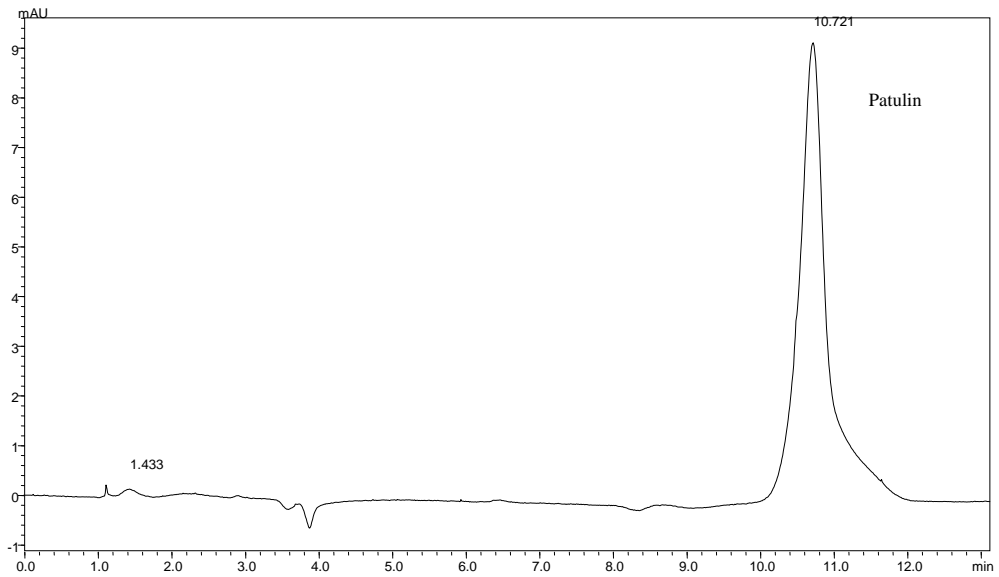
## 5. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

### 5.1. Kromatografik Ayırmanın Optimizasyonu

% 5 ACN (0,1 mL perklorik asitli) mobil faz hazırlanmış ve Şekil 5.1'de olduğu gibi patulinin alıkonma zamanı 10,271 dakika olduğu tespit edilmiştir. Şekil 5.1'den de görüldüğü gibi patulin pikinin şeklinin bozuk olduğu ve kuyruklanma faktörünün hesaplanamadığı görülmüştür.

TS EN ISO 15890/Ocak 2011 sayılı Türk Standardına göre mobil faz yüzdesi ayarlanmış ve yapılan çalışmada perklorik asidin pik şekli, pik simetrisi, alıkonma zamanı, kuyruklanma faktörleri açısından uygun olmadığı Şekil 5.1 ve Şekil 5.2'deki kromatogramlardaki patulin ve HMF pik şekillerinden de anlaşılmaktadır.

Bu alıkonma zamanının yüksek olmasından dolayı mobil fazda ACN oranının % 10'a çıkarılmasına karar verilmiştir.



Şekil 5.1. % 5 ACN'li patulin kromatogramı

**Çizelge 5.1.** Kolonların karşılaştırılması

	<u>HMF</u>			<u>Patulin</u>		
	1.Kolon <sup>a</sup>	2.Kolon <sup>b</sup>	3.Kolon <sup>c</sup>	1.Kolon	2.Kolon	3.Kolon
t <sub>R</sub>	6,692	6,771	6,652	10,304	8,644	8,942
N	23672	18374	1,688	10889	5479	204
T <sub>f</sub>	1,241	1,223	1543	0,777	--	0,580

a 1.Kolon: Phenomenex – Gemini C18 110 A° ,250mmx4,6mmx3µm

b 2.Kolon: Phenomenex – Synergy Hydro RP 80 A° ,250mmx4,6mmx4µm

c 3.Kolon: Phenomenex – Luna C18(2) 100 A° ,250mmx4,6mmx5µm

Çizelge 5.1'den görülen çalışma % 10 ACN (0,1 mL perklorik asitli) anlaşılacağı gibi teorik tabaka sayısı ve kuyruklanma faktörü dikkate alındığında en iyi kolonun Gemini C18 110 A° , 250 mm x 4,6 mm x 3 µm olduğu anlaşılmıştır.

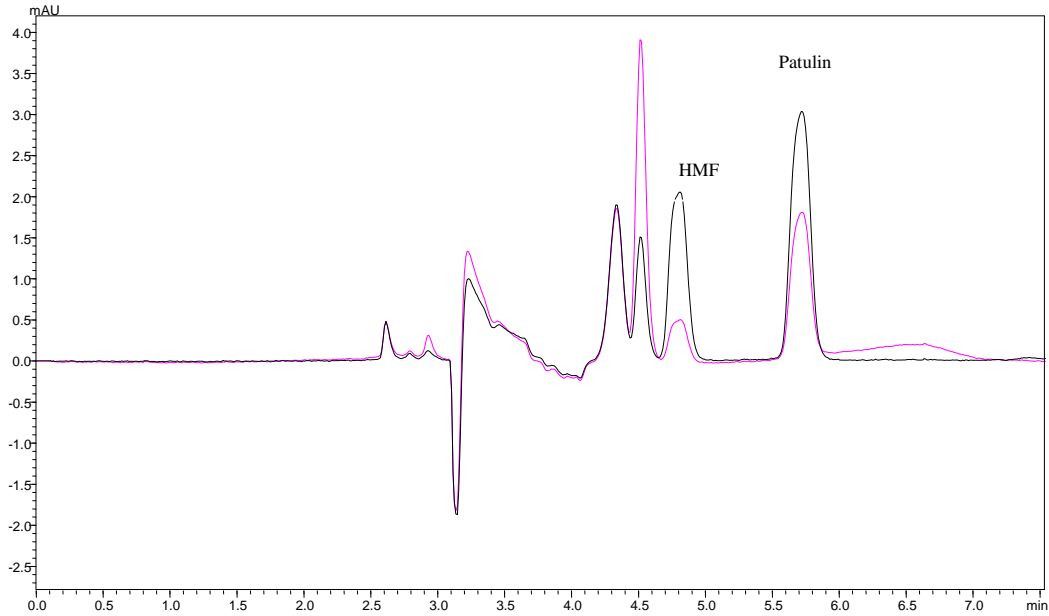
Çizelge 5.2'de görüldüğü gibi % 10 ACN (0,1 mL perklorik asitli) mobil fazda kolon sıcaklıkları karşılaştırılmış ve alıkonma zamanı açısından en uygun kolon sıcaklığının 40 °C olması gerektiği sonucuna varılmıştır.

**Çizelge 5.2** Kolon sıcaklık faktörünün etkisi (% 10 ACN, 0,1 mL perklorik asitli)

	<u>HMF</u>			<u>Patulin</u>				
	25 °C	30 °C	35 °C	40 °C	25 °C	30 °C	35°C	40 °C
t <sub>R</sub>	6,651	6,716	6,294	5,959	8,579	8,638	7,77	7,244
N	23576	23356	24015	20691	1044	5848	5149	5211
tf	1,203	1,244	--	1,164	--	--	--	--

Çizelge 5.2'de görüldüğü gibi % 15 (v/v) Asetonitril -Su İkili Karışımı (Perkloric Asit'li) mobil faz hazırlanarak 30, 35, 40 °C kolon sıcaklığında ve % 15 ACN içeren

mobil fazda alıkonma zamanları, etkin tabaka sayısı ve kuyruklanma faktörleri incelenmiş ve alıkonma zamanı açısından bu mobil fazın deney süresini etkin bir şekilde azalttığı gözlenmiştir. Bu çalışma sonucunda mobil fazın % 15' lik ACN çözeltisi ve kolon sıcaklığının da 40 °C olması gerektiği sonucuna varılmıştır. Bu durum Şekil 5.2' de açıkça görülmektedir.



**Şekil 5.2.** 40 °C'de % 15 ACN (0,1 mL perklorik asitli) patulin ve HMF kromatogramı

**Çizelge 5.3.** Kolon sıcaklık faktörünün etkisi % 15 (v/v) asetonitril-su ikili karışımı (perklorikasitli)

	<u>HMF</u>			<u>Patulin</u>		
	30 °C	35 °C	40 °C	30 °C	35 °C	40 °C
$t_R$	5,090	4,962	4,859	6,226	6,005	8,638
N	19961	19657	19482	440,673	3135	5848
$t_f$	1,268	1,311	1,344	--	--	--

Kolon sıcaklık faktörünün etkisi % 15 (v/v) asetonitril -su ikili karışımı (perklorik asitli) mobil fazda kromatogramların piklerin ayrılmaması ve kuyruklanma

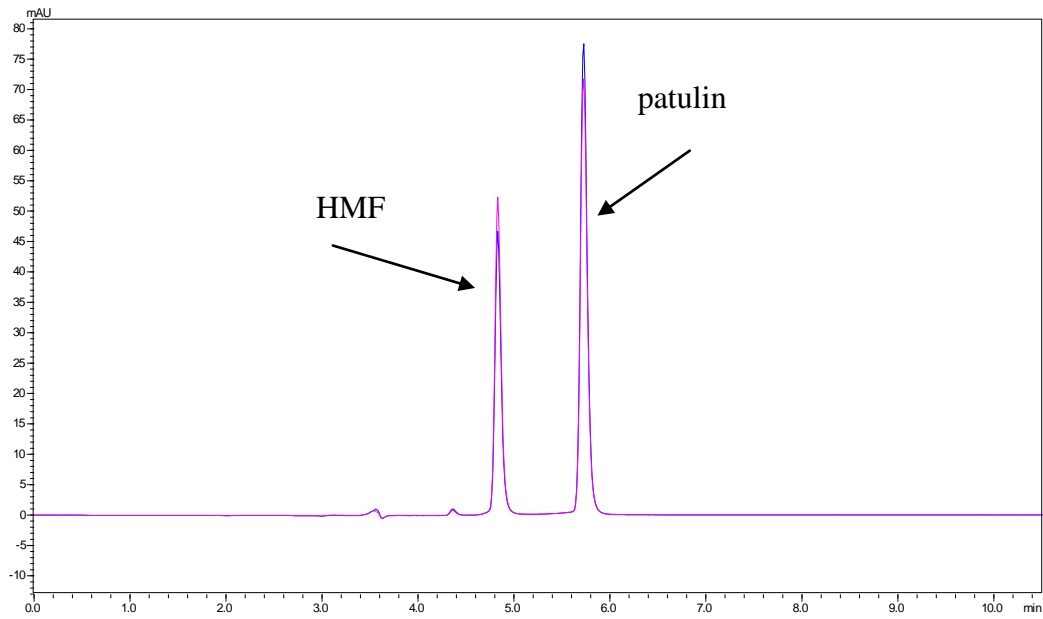
faktörlerinin patulin ve HMF'nin birbirinden ayrılmadığı ve piklerin üst üste geldiği görülmüştür. Bu durum pH=2,5'da da aynı şekilde olduğu Çizelge 5.3'den de anlaşılmaktadır.

Daha sonra mobil fazın pH=4'e getirildiğinde en etkin ayrılmaya ve en etkin alıkonma zamanına sahip olduğu görülmüştür.

Sonuç olarak mobil faz için % 15 (v/v) asetonitril -su ikili karışımı (15 mM asetik asit) çözeltisi üzerinde çalışmanın uygun olacağına karar verilmiştir. Bu durumda Şekil 5.3'de de görüldüğü gibi piklerin ayrılma etkinliklerinin iyi olması ve alıkonma zamanının şu ana kadar patulin üzerinde yapılan deneyler literatürde incelendiğinde en iyi alıkonma zamanı olduğu söylenebilir.

**Çizelge 5.4.** Mobil faza pH'sının etkisi

	<u>HMF</u>			<u>Patulin</u>		
	2,5	3,0	4,0	2,5	3,0	4,0
t <sub>R</sub>	7,435	6,869	4,816	7,353	6,798	5,720
N	7077	7024	20864	5928	5529	23484
Tf	0,862	0,889	1,312	--	--	1,299



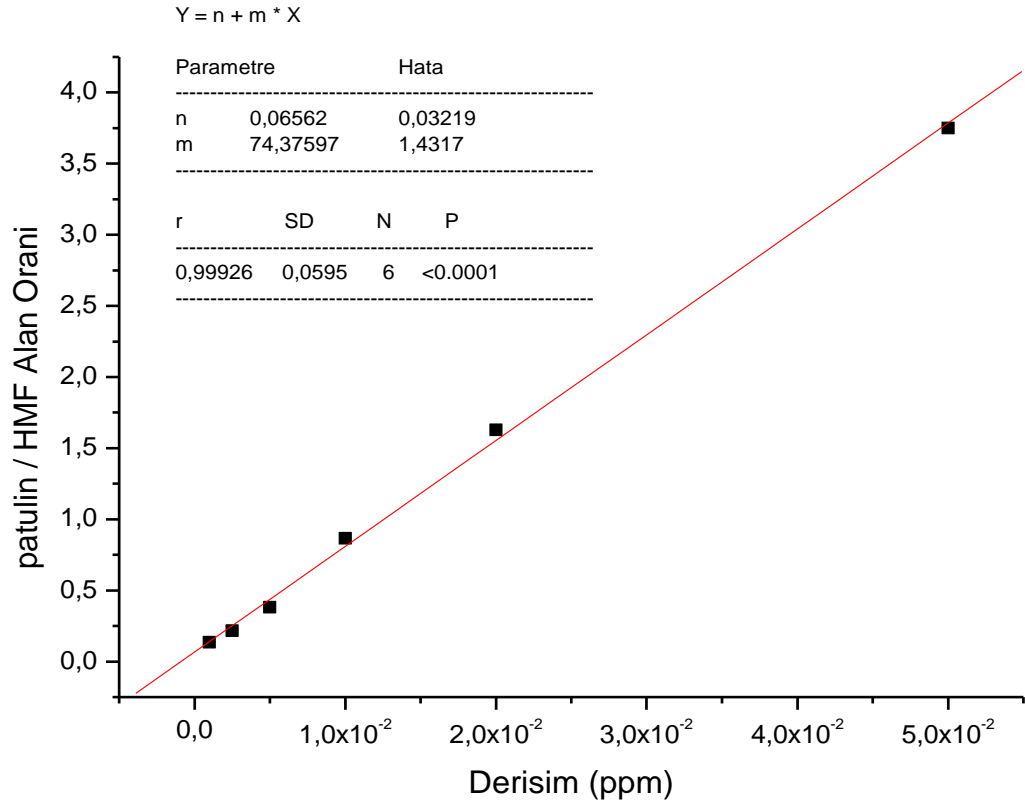
**Şekil 5.3.** 40 °C de % 15 ACN (15 mM asetik asitli) patulin ve HMF spektrumu

**Çizelge 5.5.** Sistem uygunluk parametreleri (40 °C’de % 15 ACN (15 mM asetik asitli) mobil faz ve Gemini C18 110 A° 250 mm x 4,6 mm x 3 µm kolon için)

Bileşik Adı	Alıkonma zamanı ( $t_R$ )	Kapasite Faktörü (k)	Seçicilik ( $\alpha$ )	Kolon Etkinliği (N)	Ayırma Gücü (R)	Kuyruklanma Faktörü
Patulin	5,720	0,594	1,737	23484	4,197	1,299
HMF	4,816	0,342	--	20864	--	1,312

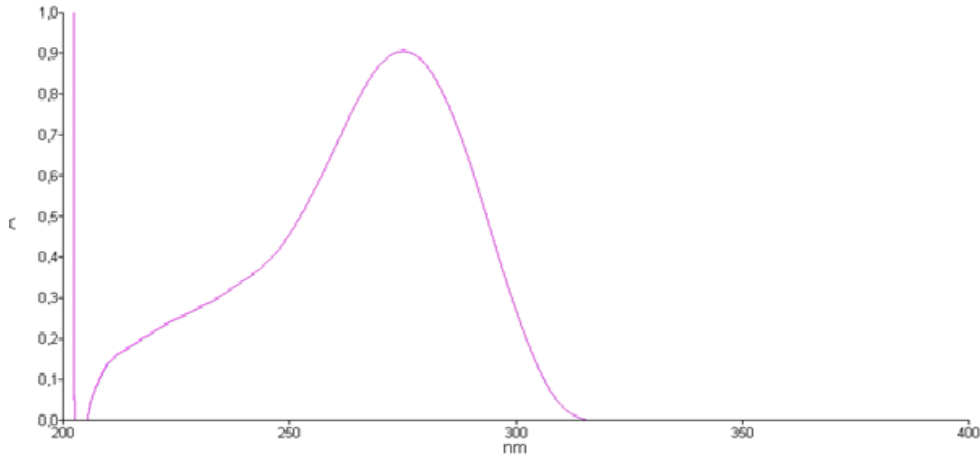
## 5.2. Metodun Geçerli Kılınması

### 5.2.1. Kalibrasyon Doğrusu ve Metot Performans Parametreleri (Validasyon Parametreleri)



Şekil 5.4. Kalibrasyon doğrusu

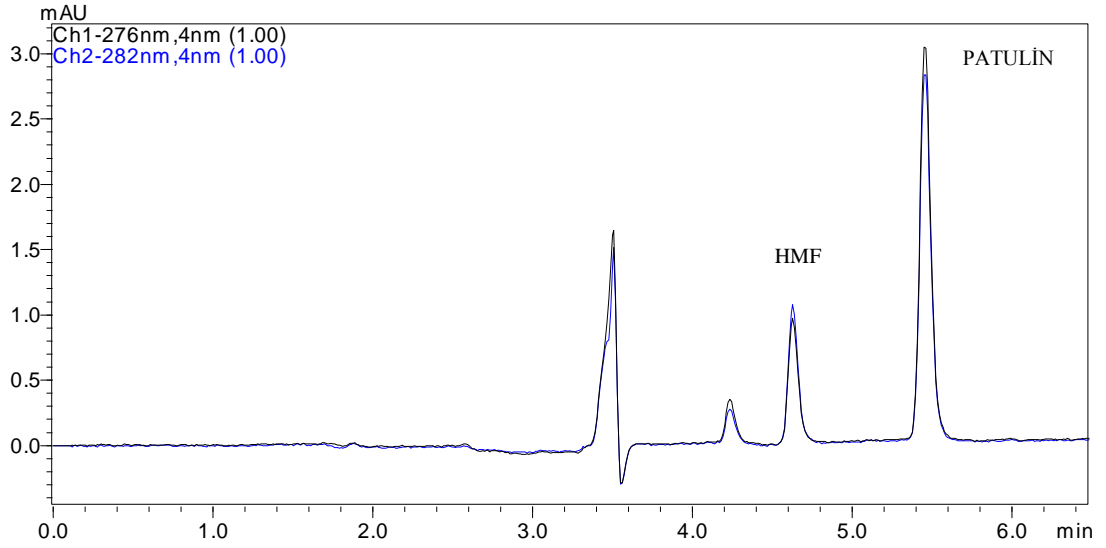




**Şekil 5.5.** Patulinin UV-Spektrumu

Bu çalışmada yukarıda bahsedildiği gibi stok çözeltilerden 1000 µl (1 mL) azot gazı altında kurutulmuş ve 10 ppm'lik patulin elde etmek için 20 mL etanolde çözülmüş ve UV spektrofotometrede ölçüm yapılmış ve 10 ppm'lik patulinin 9,1 ppm olduğu tespit edilmiştir.

Kalibrasyon doğrusunun hazırlanması için iç standard olarak HMF kullanılmıştır. Patulin 0,001 ppm ile 0,05 ppm arasında altı noktadan değer alınarak kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. HMF ise 0,025 ppm olarak alınmıştır. Kalibrasyon doğrusu, her bir derişim değeri için elde edilen patulin ve HMF pik alanının HMF (iç standart) pik alanına oranının, patulin derişimi değerine karşı grafiği oluşturulmuştur. Örnek olarak elde edilen kromatogram Şekil 5.6'da aşağıda verilmiştir. Patulin analizi için oluşturulan kalibrasyon fonksiyonu  $y=74,376x+0,06562$ ;  $r^2=0,9984$  olarak saptanmıştır.



**Şekil 5.6.** Kalibrasyon kromatogramı (0,05 ppm patulin 0,025 ppm HMF)

**Çizelge 5.6.** Patulin tayinine ait kalibrasyon verilerinin istatistiksel değerlendirilmesi

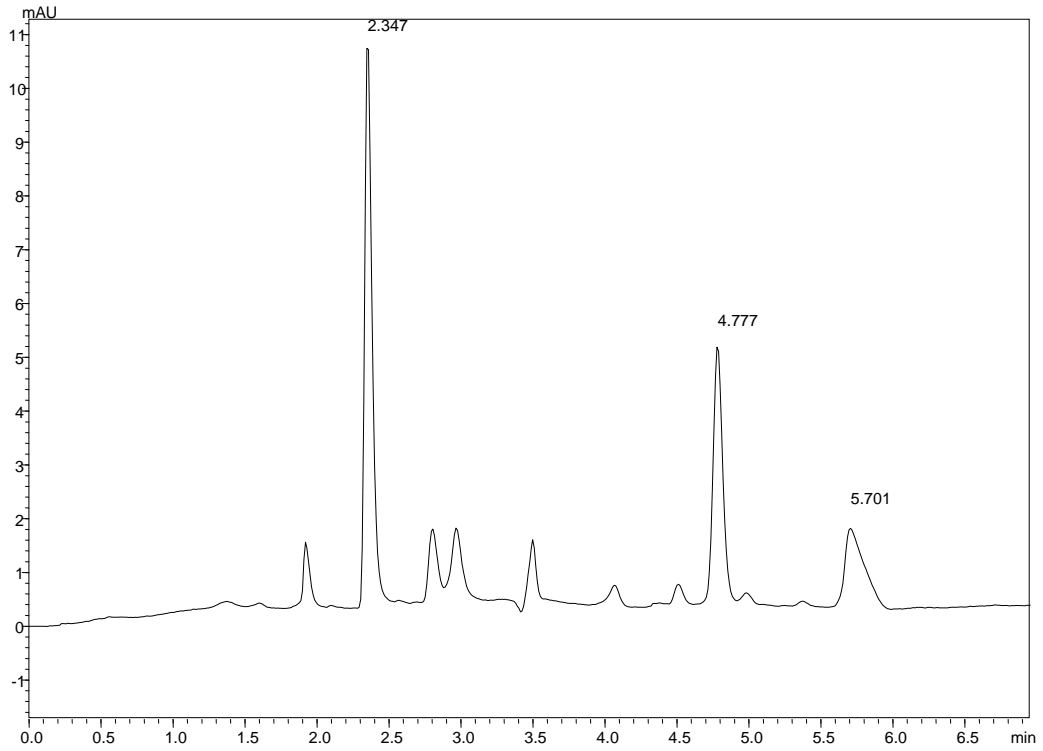
Regresyon Denklemi*	$Y = 74,376x+0,06562$
Eğimin Standart Hatası	1,4317
Kesişimin Standart Hatası	0,03219
Korelasyon Katsayısı (r)	0,9992
Kalibrasyon Aralığı (ppm)	0,001-0,05
Teşhis Sınırı (ppm)	0,000502
Tayin Alt Sınırı (ppm)	0,001521

\*  $y = n+ mx$ ; x : ppm biriminde derişim, y : patulin/HMF (iç standart alan oranı değerleri), n: kesişim, m : eğim

Patulin analizinde kesinlik ve doğruluk çalışmaları için yapılan gün içi tekrarlanabilirlik değerinden en küçük derişimin standart sapmasından teşhis sınırı

(LOD) ve tayin alt sınırı (LOQ) hesaplanmıştır. Patulin için; teşhis sınırı (LOD) 0,000502 ppm, tayin limiti (LOQ) kabul edilen patulin için; 0,001521 ppm (Çizelge 5.6) olarak saptanmıştır.

Geri kazanım çalışmaları için 0,1 ppm'lik (UV-tayini sonrası patulin miktarı=0,095 ppm) patulin özütlemeye öncesi eklenmiş ve geri kazanım % 94,84 olarak hesaplanmıştır. Geri kazanım çalışmasına yönelik kromatogram Şekil 5.7'de verilmiştir.



**Şekil 5.7.** Geri kazanım çalışması yapılan numuneye ait kromatogram

Kesinlik ve doğruluk çalışmaları için yapılmış patulinin 0,005 ppm ve 0,02 ppm'lik değerleri için gün içi ve günler arası çalışmalar yapılmış ve sonuçlar Çizelge 5.7'de verilmiştir.

**Çizelge 5.7.** Patulin tayinine ait gün içi, günler arası bulguları

Çalışılan bileşiklerin derişimleri ( $\mu\text{g/ml}$ ) Patulin	Gün içi	Günler arası
	% Ortalama Geri Kazanım $\pm$ %BSS	% Ortalama Geri Kazanım $\pm$ %BSS
0,005 ppm	98,4 $\pm$ 1,22	92,85 $\pm$ 4,22
0,02 ppm	100,45 $\pm$ 1,13	95,8 $\pm$ 8,58

Cihazın tekrarlanabilirliği için ise 5'er adet ölçüm alınmış ve sonuçlar Çizelge 5.8.'de verilmiştir.

**Çizelge 5.8.** Cihazın tekrarlanabilirlik sonuçları

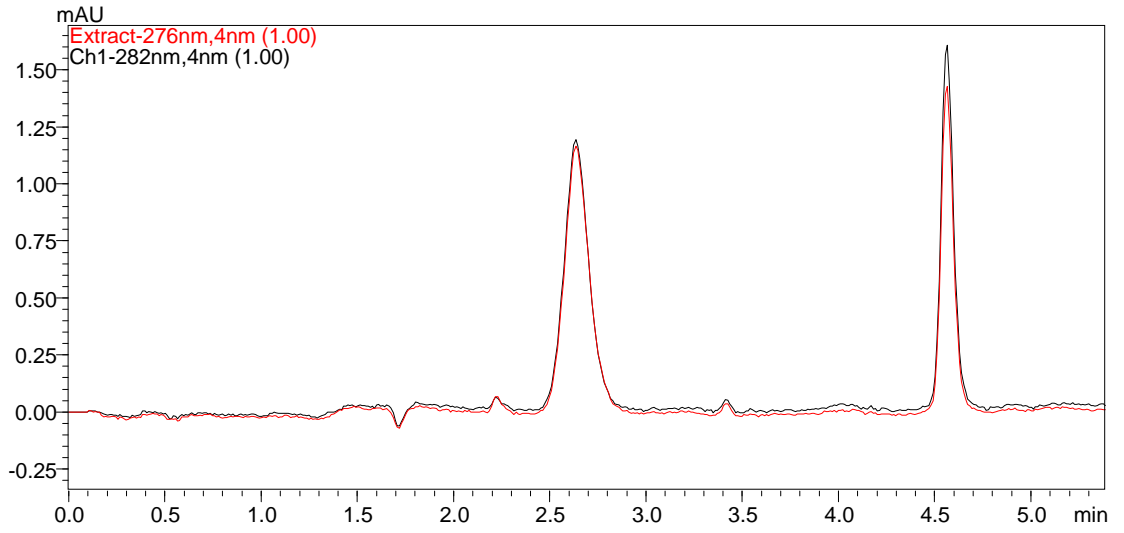
0,005 ppm. lik Patulin		0,02 ppm. lik Patulin	
Numune alanı/iç standart alanı oranı	Bulunan patulin	Numune alanı/iç standart alanı oranı	Bulunan patulin
0,43033	0,00491	1,56694	0,02019
0,40068	0,00451	1,54046	0,01984
0,43580	0,00499	1,60224	0,02067
0,42702	0,00487	1,54161	0,01985
0,40432	0,00456	1,57831	0,02035
Ortalama	0,00477	Ortalama	0,02018
Standart Sapma	0,00022	Standart Sapma	0,00035
BSS	4,51125	BSS	1,73492

Geçerli kılma parametreleri Çizelge 5.9'da verilmiştir.

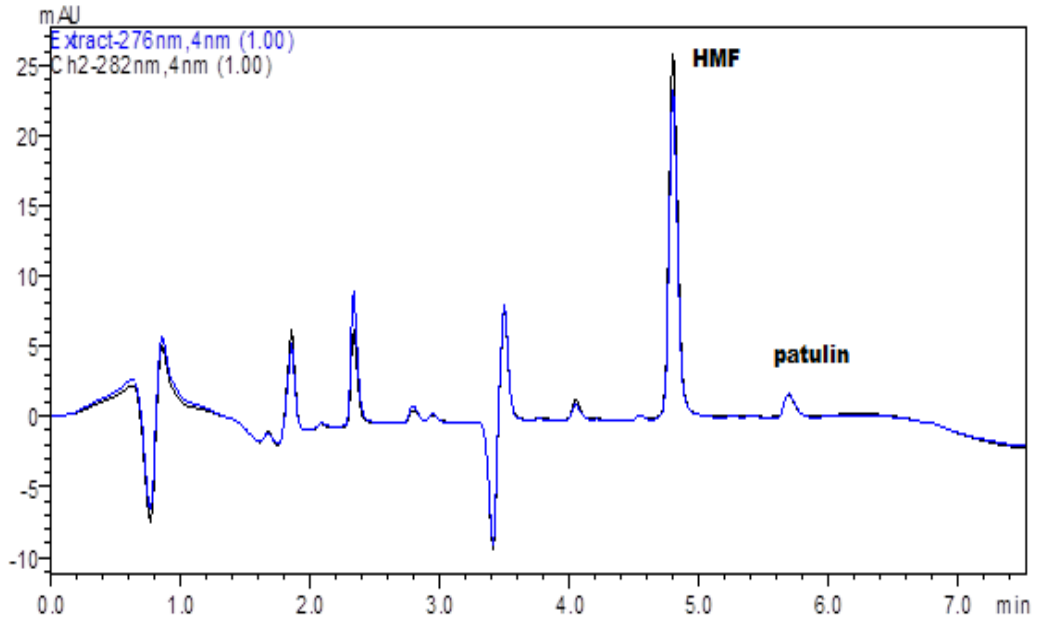
**Çizelge 5.9.** Geçerli kılınma parametreleri

	Regresyon Denklemi*	$Y = 74,376x + 0,06562$
Doğrusallık	Eğim	74,376
	Eğimin Standart Hatası	1,4317
	Kesişimin Standart Hatası	0,03219
	Korelasyon Katsayısı (r)	0,9992
	Kalibrasyon Aralığı (ppm)	0,001-0,05
	Tayin/Teşhis Limiti	Teşhis Sınırı (ppm)
	Tayin Alt Sınırı (ppm)	0,001521
Kesinlik (Gün içi)	0,005 ppm. lik Patulin için % Ortalama Geri Kazanım ± % BSS	98,4 ± 1,22
	0,02 ppm. lik Patulin için % Ortalama Geri Kazanım ± % BSS	100,45 ± 1,13
	0,005 ppm. lik Patulin için % Ortalama Geri Kazanım ± % BSS	92,85 ± 4,22
	0,02 ppm. lik Patulin için % Ortalama Geri Kazanım ± % BSS	95,8 ± 8,58
Kesinlik (Gün arası)	0,005 ppm. lik patulin için % BSS	4,51
	0,02 ppm. lik patulin için % BSS	1,73
Cihazın	0,005 ppm. lik patulin için % BSS	4,51
Tekrarlanabilirliği	0,02 ppm. lik patulin için % BSS	1,73
Seçicilik Faktörü( $\alpha$ )	Patulin	1,737

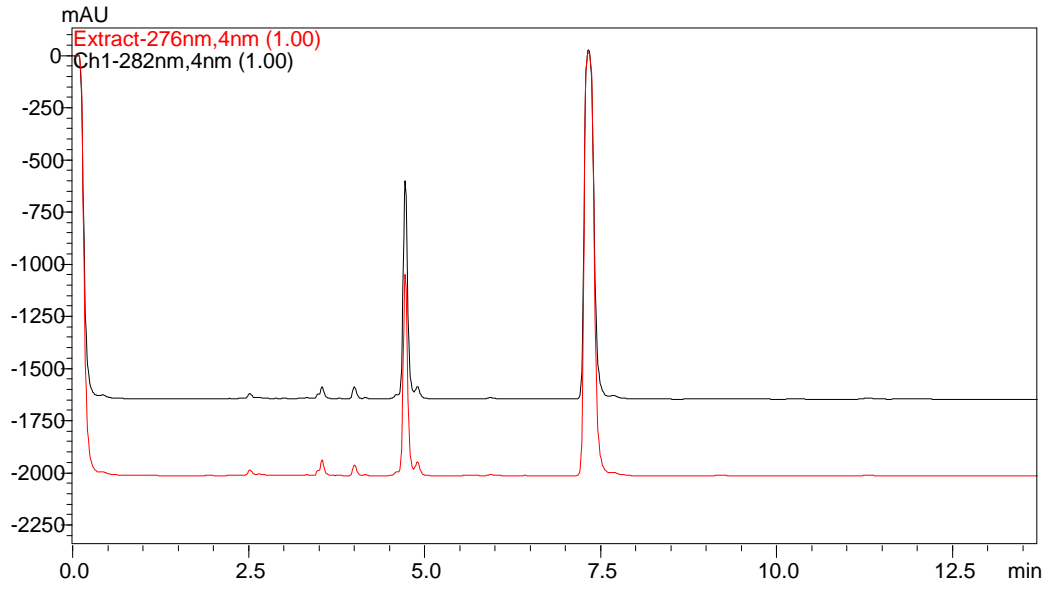
Geçerli kılma çalışmasından sonra Çizelge 4.2’de belirtilen piyasada bulunan bebek gıdaları üzerinde analizler yapılmıştır. 3 adet katı faz özütlemesi ve 3 adet de sıvı faz özütlemesi olmak üzere toplam 6 adet bebek gıdası üzerinde analizler yapılmıştır. Yapılan analizlerde patuline rastlanmamışken bebek gıdalarında HMF’nin mevcut olduğu gözükmemektedir. Yapılan analizlere ait kromatogramlar Şekil 5.8, Şekil 5.9, Şekil 5.10, Şekil 5.11, Şekil 5.12 ve Şekil 5.13’de aşağıda verilmiştir.



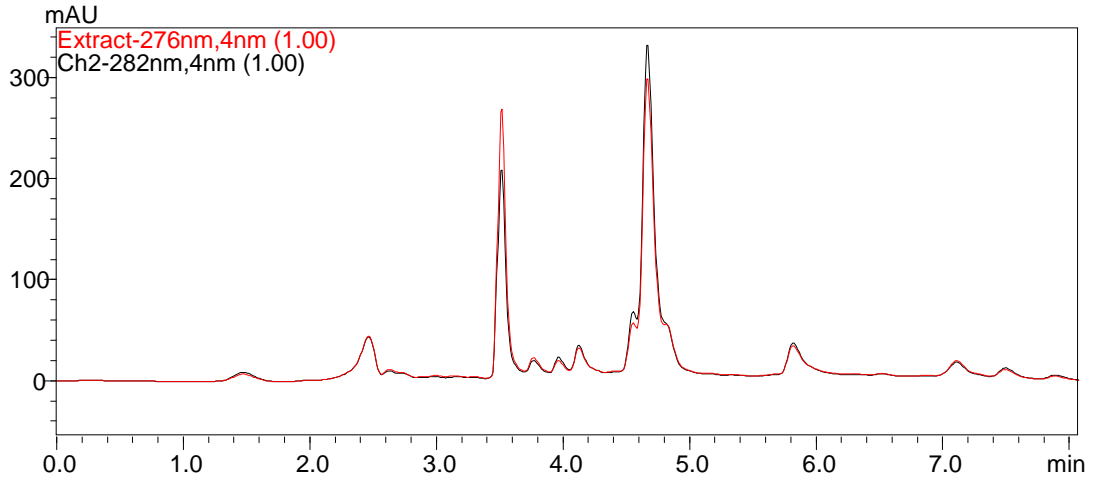
Şekil 5.8. 8699745003548 barkod nolu ürünün kromatogramı



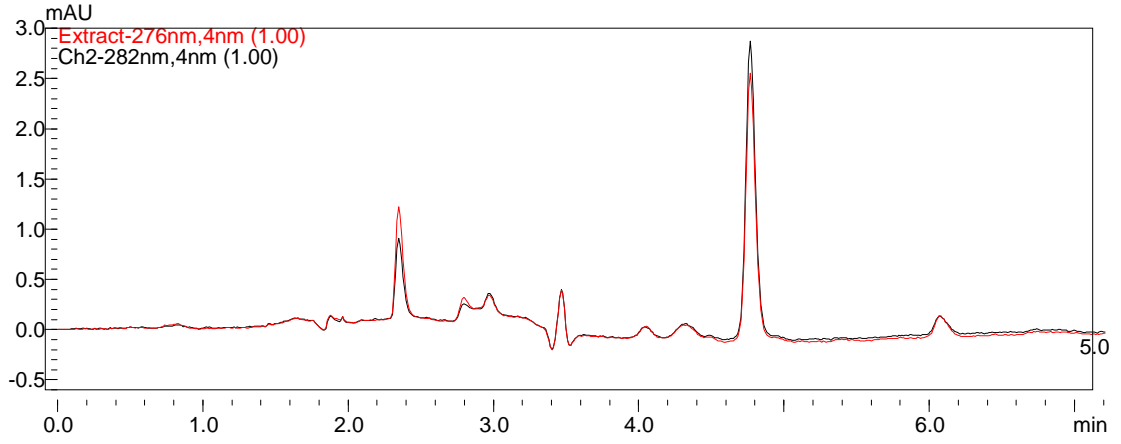
Şekil 5.9. 9062300117032 barkod nolu ürünün kromatogramı



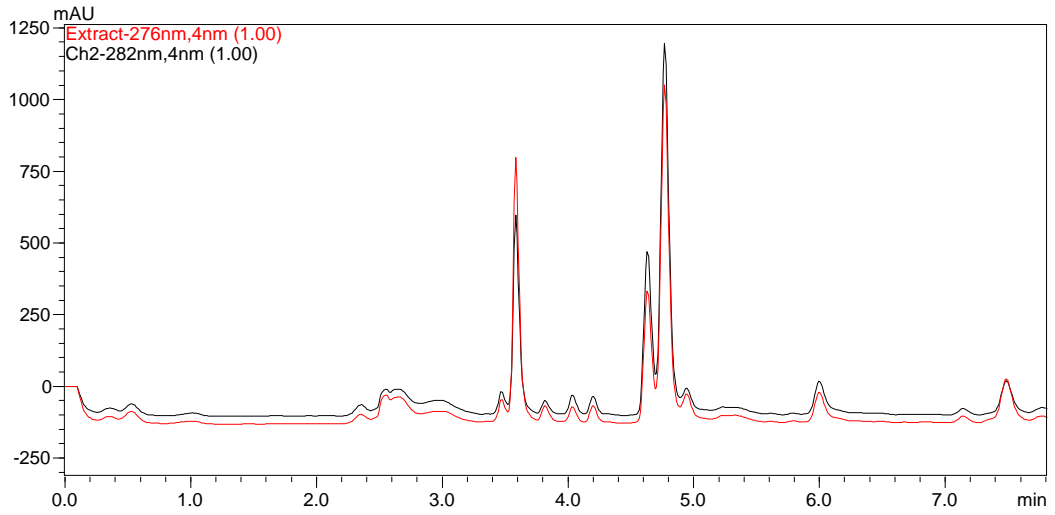
Şekil 5.10. 9062300116844 barkod nolu ürünün kromatogramı



Şekil 5.11. 8697404760221 barkod nolu ürünün kromatogramı



**Şekil 5.12.** 8699745000363 barkod nolu ürünün kromatogramı



**Şekil 5.13.** 8692971556390 barkod no.lu ürünün kromatogramı



### 5.3. SONUÇ VE ÖNERİLER

Stok çözeltinin belli sürelerde miktar tayinin yapılması gerektiği TS EN ISO 15890/Ocak 2011 sayılı Türk Standardında belirtilmiştir. Bu süre 4-6 hafta olarak belirlenmiştir. Ancak patulinin saklama koşullarının zorluğu ve çalışma esnasında oda koşullarından etkilenmesinden dolayı spektroskopik yöntem ile hazırlanan ana Standart çözeltinin derişimi haftalık olarak kontrol edilmelidir.

Yapılan çalışmalarda iç standart olarak kullanılan HMF pikinin perklorik asit kullanıldığı durumda piklerde ikiye yarıma gözlenmiştir. Varlova ve arkadaşlarına göre (2009), HMF asidik ortamda levunelik asit (4-oksopentanoik asit) ve formik asite kolayca dönüşebilmektedir. Mobil fazın optimizasyonunda % 10 ACN (0,01 mL.Perklorik asit'li) mobil fazda karşılaşılan bu durum, 15 mM asetik asit tamponu kullanarak (pH 4) HMF asimetri faktörü yaklaşık 1 olacak şekilde düzgün pik verdiği görülmüştür.

Mobil faz olarak % 5 ACN (0,01 mL perklorik asit) ve % 10 ACN (0,01 mL perklorik asit) kullanıldığı durumlarda patulin pikinin düzgün olmadığı Şekil 5.1 ve Şekil 5.2'den de görülmektedir. Bu durum mobil fazın asetik asitle tamponlanarak pH'sının 4'e ayarlandığı durumda pik şekillerinin düzeldiği ve alıkonma zamanlarının ve asimetri faktörü daha iyi olduğu gözlenmiştir. Bu durumda TS EN ISO 15890/Ocak 2011 standardında mobil faz olarak perklorik asitli mobil faz kullanımı perklorik asitin patulinin yapısına etki ettiğinden dolayı kullanılması uygun olmamaktadır.

Mobil faz yüzdesi belirlendikten sonra 1.Kolon: Phenomenex – Gemini C18 110 A° , 250 mm x 4,6 mm x 3 µm kolon seçimi ile birlikte % 15 ACN (15 mM Asetik Asit'li) mobil faz kullanarak, en uygun kolon sıcaklığını 40 °C olarak tespit edip, akış hızını 1 mL/dk olarak ayarlandığında alıkonma zamanının 6 dakikanın altına

düŖeceđi ve bu durumun kaynaklarda belirtilen alıkonma zamanlarının yaklaşık olarak yarısı kadardır. Dolayısıyla deney süresi yarıya indirilmiştir.

Kaynaklar incelendiğinde Çizelge 3.1'de görüldüğü gibi bebek gıdalarında patuline 3-10 ppm düzeyinde rastlanmış olmasına rağmen, Türkiye'de satılan bebek gıdalarından alınan numuneler üzerinde yapılan analizlerde 8697404760221 ve 9062300117032 barkod nolu ürünlerde tayin limitinin altında patuline rastlanmamış diğer ürünlerde patuline rastlanmamıştır. Fakat HMF miktarının oldukça fazla olduğu görülmüştür.

## KAYNAKLAR

- Akbulut M., 2005. Türkiye'de üretilen bazı meyve suyu ve konsantresinde patulin miktarının HPLC ile belirlenmesi, S.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi, 19(35), 84-86.
- Al- Hazmi, N.A., 2010. Determination of Patulin and Ochratoxin A using HPLC in apple juice samples in Saudi Arabia, Saudi Journal of Biological Sciences, 17, 353–359.
- Anonim, 2002, ACD/Labs (6.0), Advanced Chemistry Development Inc., 90 Adelaide Street, West Toronto, Ontario, M5H3V9, Canada (<http://www.acdlabs.com/ilab/>).
- Artık, N.,B., Cemeroğlu, G., Aydar, N.S., 1995. TUBİTAK TOAG-753 TBGAG-9 no'lu Proje Sonuç Raporu: Elma suyu konsantresinde Aktif Kömür Kullanımı Üzerinde Araştırmalar. Aktif Kömür Kullanarak Elma Suyu Konsantresinde Patulin Miktarını Azaltma Olanakları, Ankara.
- Augiar de P. F., Bourguignon B., Massart D. L., 1997. Comparision of models anddesings for optimisation of the pH and the solvent strength in HPLC. Analitica Chimica Acta, 356, 7-18.
- Baert, K., De Meulenaer, B., Kasase C., Huyghebaert, A., Ooghe,W., Devlieghere F., 2007. Free and bound patulin in cloudy apple juice, Food Chemistry, 100, 1278–1282,
- Baert, K., De Meulenaer, B., Verdonck, F., Huybrechts, I., De Henauw, S., Vanrolleghem, P.A., Debevere, J., Devlieghere, F., 2007. Variability and uncertainty assessment of patulin exposure for preschool children in Flanders,Food and Chemical Toxicology, 45, 1745–1751.
- Barbosa, J., Berges, R., Sanz-Nebot, V., I., Toro, 1999. Chromatographic behaviour of ionizable compounds in liquid chromatography. Part 2. Standardization of potentiometric sensors and effect of pH and ionic strength on the retention of

- analytes using acetonitrile-water mobile phases. *Analytica Chimica Acta*, 389, 43-52.
- Barbosa, J., Sanz-Nebot, V., 1995. Assignment of Reference pH-Values to Primary Standard Buffer Solutions for Standardization of Potentiometric Sensors in Acetonitrile-Water Mixtures. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 353, 148-155.
- Barreira, M.J.P. C. Alvito, Cristina M.M., 2010. Occurrence of patulin in apple-based-foods in Portugal, *Food Chemistry*, 121, 653–658.
- Barwick, V., J., 1997. Strategies for solvent selection – a literature review. *Trends in Analytical Chemistry*, 16(6), 293-308.
- Boonzaaijer, G., Bobeldijk, I., Van Osenbruggen W.A., 2005. Analysis of patulin in dutch food, an evaluation of a SPE based method, *Food Control* , 16, 587–591.
- Bosch, E., Espinosa, S., Roses, M., 1998. Retention of ionizable compounds on high performance liquid chromatography. III Variation of pK values of acids and pH values of buffers in acetonitrile-water mobile phases. *Journal of Chromatography A*, 824, 137-146.
- Brondon E.F.A.,Baars A.J.,Biesebeek J.D.te,Blokland M.H.,Oomen A.G.,Bakker M.I.,Heer C.de, Risk assessment of patulin intake from apple containing products by young children. ([www.aid.nl/txmpub/files/?p\\_file\\_id](http://www.aid.nl/txmpub/files/?p_file_id)) (19.11.2011)
- Cheraghali, A. M., Mohammadi, H. R., Amirahmadi,M., Yazdanpanah,H., Abouhossain,G., Zamanian,F., Khansari, M.G.M., 2005. Incidence of patulin contamination in apple juice produced in Iran, *Food Control*, 16, 165–167.
- Covington, A. K., Bates R. G., Durst, R. A., 1985. Definition of pH Scales, Standard Reference Values, Measurements of pH and related terminology. *Pure and Applied Chemistry*, 57, 531.

- Dolan, J. W., Gant, J. R., Snyder R., 1979. Gradient elution in high performance liquid chromatography. II: Practical application to reversed-phase systems. *Journal of Chromatography*, 165, 31-58.
- Elvira M.S.M., Gaspar, A. Lucena, F.F., 2008. Improved HPLC methodology for food control furfurals and patulin as markers of quality, *Food Chemistry*, 114, 1576–1582
- Eurochem Working Groups, 1998. The Fitness for purpose of analytical methods a laboratory guide to method validation and related topic.
- Freitas-Silva O., Venâncio, A., 2011. Brazil nuts: Benefits and risks associated with contamination by fungi and mycotoxins, *Food Research International*, 44, 1434–1440.
- Funes, G.J., Resnik, S.L., 2009. Determination of patulin in solid and semisolid apple and pear products marketed in Argentina, *Food Control*, 20, 277–280.
- Gokmen, V., Acar, J., Sarioğlu, K., 2005. Liquid chromatographic method for the determination of patulin in apple juice using solid-phase extraction, *Analytica Chimica Acta*, 543, 64–69.
- Gümüştaş M., 2009. ADE inhibitörü ve kalsiyum kanal blokörü kombinasyonu ilaçların YPSK yöntemi ile aynı anda analizi, Y.Lisans Tezi.
- Iha, M.H., Sabino, M., 2008. Incidence of patulin in Brazilian apple-based drinks, *Food Control*, 19, 417–422.
- Kadalkal Ç., Nas S., 2000. Elma ve elma ürünlerinde patulin miktarını etkileyen faktörler, *Pamukkale Üniversitesi-Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 6(1), 87-96.
- Katerere, D.R., Stockenström, S., Shephard, G.S., 2008. HPLC-DAD method for the determination of patulin in dried apple rings, *Food Control*, 19, 389–392.
- Li J.-K., Wu C.R.-N., Hu B.Q.-h., Wang J.h., 2007. Solid-phase extraction and HPLC determination of patulin in apple juice concentrate, *Food Control*, 18, 530–534.

- Llovera, M., Viladrich, R., Torres M., Canela R., 1999. Analysis of underivatized patulin by a GC-MS technique. *Journal of Food Protection*, 62(2), 202–205.
- Marín, S., Eva M., M., Sanchis, Valle-Algarra, V. F., Ramos, A. J., Jimenes, M., 2011. Patulin contamination in fruit derivatives, including baby food, from the Spanish market, *Food Chemistry*, 124, 563–568.
- Misericordia Jiménez, Patulin contamination in fruit derivatives, including baby food, from the Spanish market, *Food Chemistry*, 124, 563–568.
- Moake, M. M., Padilla, O. I., Worobo, Z. and Worobo, R. W., 2005. Comprehensive review of patulin control methods in foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 1, 8-21.
- Murillo, M. -Arbizu, S., Amézqueta, E. González-Peñas, A.L. de Cerain, 2009. Occurrence of patulin and its dietary intake through apple juice consumption by the Spanish population, *Food Chemistry*, 113, 420–423.
- Plunkett L.M., Turnbull D., Rudricks J.V., 1992. Differences between adults and children affecting exposure assessment. In: Guelian PS, Henry CJ, Olin SS, editors. *Similarities and differences between children and adults*. Washington: ILSI Press., 79–94.
- Purnell, J.H., 1960. Correlation of separating power efficiency of gas-chromatographic columns, *Journal of Chemical Society*, 1268-124.
- Roach J.A.G., Brause A.R., Eisele T.A., Rupp H.S., 2002. HPLC determination of patulin in apple juice with GC/MS confirmation of patulin identity, *Mycotoxins and food safety*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 135–140.
- Rondinini, S., Mussini, P. R., Mussini, T., 1987. Reference Value Standard and Primary Standard for pH Measurements in Organic Solvents and Water , *Organic Solvent Mixtures of Moderate to High Permittivities*. *Pure and Applied Chemistry*, 59(11), 1549-1560.

- Rondinini, S., Nese, A., 1987. Standard pH Values for Potassium Hydrogenphthalate Reference Buffer Solutions in Acetonitrile-Water Mixtures up to 70 wt % at Various Temperatures. *Electrochimica Acta*, 2(10), 1499-1505.
- Roses, M., Canals, I., Allemann, H., Katrin, S., Bosch, E. 1996. Retention of ionizable compounds on HPLC. 2. Effect of pH, ionic strength and mobile phase composition on retention of weak acids. *Analytical Chemistry*, 68, 4094-4100.
- Said, A. S., 1964. Resolution, sperability and conditions for fraction collection in preparative gas chromatography. *Journal of Gas Chromatography*, 60-71.
- Sancho, G.C., Marin, S., Ramos, A.J., Sanchis, V., 2009. Survey of patulin occurrence in apple juice and apple products in Catalonia, Spain, and an estimate of dietary intake, *Food Additives and Contaminants: Part B*, 2, 59-65.
- Sewram V., Nair J.J., Nieuwoudt T.W., Leggott N.L., Shephard G.S., 2000. Determination of patulin in apple juice by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J Chromatography A*, 897, 365-74.
- Shephard, G., Van der Westhuizen, D.S., Katerere, L.R., Herbst, M., Pineiro, M., 2010. Preliminary exposure assessment of deoxynivalenol and patulin in South Africa, *Mycotoxines Research*, 26, 181-185
- Spadaro, D., Ciavarella, A., Frati, S., Garibaldi, A., Gullino, M.L., 2007. Incidence and level of patulin contamination in pure and mixed apple juices marketed in Italy, *Food Control*, 18, 1098-1102.
- Sanlı, N., 2007. Bazı sülfonamitlerin sıvı kromatografi yöntemi ile tayini. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Doktora tezi. Isparta.
- Uygun, M, Ekşi, A., 2000. Elma Suyunda HPLC ile patulin analiz yöntemlerinin karşılaştırılması, *Gıda*, 25(2), 133-140.

Woller R, Majerus P, 1986. Patulin on grapes and grape musts – occurrence and conditions of formation. *Die Weinwissenschaft*, 41, 205-210.

Yılmazer, M., 2002. Meyve sularında patulinin yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile tayini, Yüksek lisans tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.

16.02.2009 tarih ve 27143 sayılı resmi gazetede yayınlanan 2009/22 tebliğ no'lu Gıda Maddelerindeki Bulaşanların Maksimum Limitleri Hakkında Tebliğ, Ek 2 ( Madde 2.3.1-2.3.5).



## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Soyadı, Adı : KARAKÖSE, Arslan  
Uyruğu : T.C.  
Doğum tarihi ve yeri : 01.02.1976-Çorum/Osmancık  
Medeni Hali : Evli  
Telefon : 0 (364) 254 90 41  
E-Posta : akarakose@tse.org.tr

### Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Lisans	ODTÜ-Kimya Bölümü	2000
Lise	Çorum Atatürk Lisesi	1993

### İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2003-	Çorum	TSE Çorum Yapı Malzemeleri Laboratuvarı Müdürlüğü

### Yabancı Dil

İngilizce