

YÜKSEK PERFORMANS SIVI KROMATOĞRAFI YÖNTEMİ İLE ŞARAPLARDA SORBİK ASİT TAYİNİ

DETERMINATION OF SORBIC ACID IN WINE USING HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Yüksel DENLİ¹, Güleren ÖZKAN²

¹Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, ANKARA

²Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü, ANKARA

ÖZET: İzokratik yüksek performans sıvı kromatografi yöntemi, şarapta sorbik asit tayininde kullanılmıştır. HPLC sistemi oktadesil silika dolgu lu ters faz kolon (250x4,6 mm id) bulundurmaktadır, mobil faz metanol- 0,005 M NH₄CH₃COO (30:70, v/v); akış hızı 1,5 mL'dir ve dedeksiyon 254 nm gerçekleştirilmiştir. Numune hazırlama dahil tam bir tayin 15 dakikada tamamlanmaktadır. 0,5-5,0 ppm doğrusal çalışma aralığı kullanılmıştır, yöntemin varyasyon katsayısı %1,1'dir.

ABSTRACT: An isocratic high performance liquid chromatographic method has been used to determine sorbic acid in wine. The HPLC system consist of a reversed phase column (250x4.6 mm i.d), a solvent system of methanol -0,005 M NH₄CH₃COO (30:70, v/v) with a flow rate 1.5 mL/min and 254 nm detection. Including sample preparation, a complete determination can be accomplished in 15 min. Linear working range of the method is 0,5-5,0 ppm and the coefficient of the variation is %1.1.

GİRİŞ

Sorbik asit (2,4 - heksadienoik asit, CH₃-CH=CH-CH=CH-COOH), sulu ortamda pKa değeri 4.75 olan zayıf bir asittir. Sorbik asit ve tuzları, maya ve küflere karşı antimikrobiyal olarak kullanılan bileşiklerdir. Sorbik asit, gıdanın biyolojik olarak bozulmasını önler ve çoğu zaman kimyasal bozulmayı önleyen antioksidanlarla birlikte kullanılır (CALLUL ve ark. 1992). Farklı gıda ürünlerinde sıklıkla kullanılmasına karşın izin verilen düzeylerin üzerinde kullanıldığında zararlı olabilmektedir. Kullanılması düzenlenmiş ve belli sınırlar getirilmiş olan bu bileşiğin belirlenmesi ve kantitatif tayini oldukça önemlidir (WALDRON ve LI, 1996).

Sorbik asit, şaraplarda ve özellikle tatlı şaraplarda şeker stabilizasyonunun sağlanması için maya gelişmesini engelleyen bir koruyucu olarak kullanılır (TERREL ve ark. 1993). Laktik asit bakterileri 300 mg/L'nin altındaki sorbik asit derişimlerinde inhibe edilemez (EDINGER ve SPLITTSTOESSER, 1986). Bu nedenle sorbat (80 mg/L), potasyum sorbat halinde ve SO₂ (30mg/L) ile birlikte kullanılarak tatlı şaraplarda ikincil fermentasyon ve laktik asit bakterilerinin gelişimi engellenir (OUGH ve INGAAHAM, 1960; LUCK ve NUE, 1965; ANONYMOUS, 1989). Yüksek maya derişimlerinde ve daha yüksek pH'larda maya gelişmesi ve mikrobiyal gelişmeyi kontrol altında tutabilmek için kullanılan sorbik asit (200-250 mg/L) ve SO₂ (10-30 mg/L) miktarları da artmaktadır. Keza bozunma ürünü olarak da meydana gelebilmektedir (CHISHOLM ve SAMUELS, 1992).

Sorbik asitin tayininde önceleri titrimetrik yöntemden yararlanılmıştır (LAU ve LUK, 1987). Son zamanlarda HPLC yöntemi (UV veya floresans dedektörle birlikte), bu bileşiğin tayini için kullanılan en yaygın yöntemdir (ARCHER, 1980; BENNET ve PETRUS, 1977; GUTFINGER ve ark. 1976; CALLUL ve ark. 1992; BENASSI ve CECCHI, 1998). Keza iyon çifti oluşturucu HPLC tekniği de sorbik asit tayini için kullanılabilir (TERADA ve SAKABE, 1985; CALULL ve ark. 1992). Sorbik asitin tayininde misellar elektrokinetik kapılar kromatografik yöntem de kullanılmaktadır (THOMPSON ve ark. 1995b). Bu bileşiğin tayininde kapiller elektroforez de ayırmadaki etkinliği ve analiz zamanını kısaltması nedeniyle tercih edilmektedir (KUO ve HSIEH, 1997; WALDRON ve LI, 1996; THOMSON ve ark. 1995a; KANIANSKY ve ark. 1994). Sorbik asit tayini, gaz kromatografisi ve kütle spektrometri yöntemi kullanılarak da yapılabilmektedir (KAKEMOTO, 1992).

Bu çalışmada, bazı şaraplarda sorbik asit tayini için izokratik yöntem geliştirilmeye çalışılmıştır. Sorbik asitle ilgili olarak yapılan çalışmalarda verilen pH değerleri sulu faz pH'sıyla ilgili değerlerdir. Bu çalışmada

mobil fazın bütününe ait pH değeri esas alınmıştır. Bu amaçla metanol su ortamında pH standardizasyonuna uygun şekilde çalışılmıştır. Mobil fazın organik modifiyeri metanol ortamı olduğu için standardizasyonda bu ortama uygun bağıntılardan yararlanılmıştır (LONGHI ve ark. 1986; RONDINI ve ark. 1987). Kapasite faktörünün belirlenmesinde %0.01'lik KBr çözeltisinden yararlanılmıştır. Sorbik asit sulu çözeltide konjuge çift bağ karbonil sistemi nedeniyle 258 nm de maksimum absorbands gösterir. Standard sorbik asit çözeltisinin bekletilmesi durumunda bu absorbands değeri önemli ölçüde azalır ve 215-225 nm arasında oldukça zayıf bir absorbands gösterir (ARYA, 1980). Bu nedenle bütün çalışma boyunca sorbik asit çözeltileri, çalışma anında hazırlanmış ve kullanılmıştır.

MATERYAL ve METOT

Kullanılan kimyasallar HPLC saflıktadır. Çözeltilerin hazırlanmasında çift destile su kullanılmıştır. Mobil faz 0.45 µm'lik membran filtreden süzölmüş ve kullanılmadan önce degaze edilmiştir.

Sorbik asit tayininde Schimadzu sıvı kromatografi pompası, SPD-10A UV dedektörü olan HPLC sistemi kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan kolon, Supelcosil™ LC-18 (250x4,6 mm I.D, 5µm) ters faz kolondur. HPLC çalışmalarında pH ölçümünde Jenway 3040 iyon analiz cihazı kullanılmıştır.

Mobil faz 5.10⁻³ M derişiminde amonyum asetatın metanol ile %30 (v/v) olacak şekilde modifiye edilmesi ile hazırlanmıştır. Mobil fazın pH'sı H₃PO₄ ile 4,78'e ayarlanmıştır. İzokratik çalışmada akız hızı 1,5 mL/dakikadır. Foto diyet dedektörün kullanıldığı çalışmada esas alınan iki dalga boyu 230 nm ve 254 nm dir.

Bu çalışmada 3 farklı şarap örneği (beyaz, kırmızı ve köpüklü) kullanılmıştır. Şaraplar piyasadan temin edilmiştir.

SONUÇLAR

Bu çalışmada 3 tip şarap örneğinde sorbik asit tayini ters faz yüksek performans sıvı kromatografi yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

Çalışma grafiğinin çiziminde 1000 ppm'lik sorbik asit stoğundan öncelikle 100 ppm'lik ara stok hazırlanmıştır. Kalibrasyon grafiği, ara stok standard çözeltiden uygun seyreltmelerle hazırlanan 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 ppm'lik sorbik asit çözeltileri kullanılarak belirlenmiştir. Bu çözeltilerin 5 µL'lik kısımlarının otomatik enjeksiyonları sonucu belirlenen alan değerleri Çizelge 1'de verilmiştir.

Çizelge 1. Kalibrasyon Grafiği İle İlgili Derişim-Alan Verileri

Derişim, ppm	Alan
0,5	15550
1,0	32190
1,5	48500
2,0	64620
3,0	97355
4,0	132839
5,0	166730

$$y=(33575 \pm 222,47)C + (-1857,8 \pm 637,61)$$

$$r=0,9999; SD=895,82; N=7$$

Yöntemin standard sapması 0,0267; varyasyon katsayısı %1,1'dir. Tespit sınırı 0,1 ppm olarak belirlenmiştir.

Çalışma grafiğinin çiziminden sonra 1/100 veya 1/10 oranında seyreltilen şarap örnekleri 4'er kez kalibrasyon grafiğindeki koşullarda ve aynı hacimde enjekte edilerek alan değerleri belirlenmiştir. Sorbat pikinin kalitatif tespiti, kapasite faktörü, absorbands oranı ve standard sorbat çözeltisi ilave edilerek hazırlanan çözeltiler enjekte edilerek gerçekleştirilmiştir. Sulu çözeltilerden yararlanılarak hazırlanan kalibrasyon grafiği ile dış standard yöntemine uygun şekilde numunelerin 4'er enjeksiyonu ile elde edilen değerler kullanılarak sonuçlar belirlenmiştir. Her bir numuneye 5 kez farklı derişimlerde standard katılarak her bir durum için alan verileri belirlenmiş ve bu değerlerden yararlanarak her bir numune için ortalama geri kazanma verimi bulunmuştur. Standard ilave yönteminde elde edilen lineer kalibrasyon grafiğinin eğimleri ile sulu çözeltilerin kullanıldığı dış kalibrasyon grafiğinin eğimleri arasında fark t testi kullanılarak incelenmiş ve

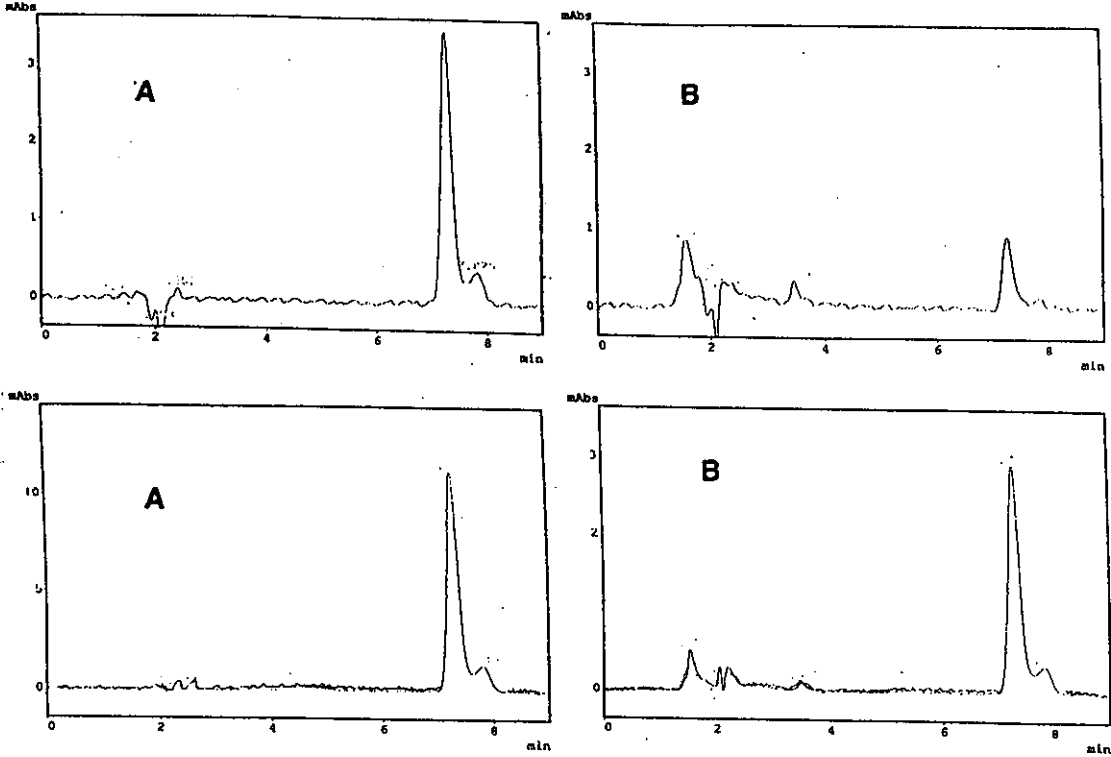
önemli farkın olmadığı belirlenmiştir. Sonuçlar dış kalibrasyon grafiğine göre 4 tekrür dikkate alınarak hesaplanmış, geri kazanma verimi için gerekli düzeltme yapıldıktan sonra %95 güven seviyesindeki güven aralığı ile verilmiştir (Çizelge 2).

Çizelge 2. Farklı Şarap Örneğinin Sorbik Asit Derişimi

Şarap Tipi	Sorbik Asit Derişimi, ppm
Beyaz	152±8.40
Kırmızı	12.6±0.84
Köpüklü	<0.1

Gerı kazanma yüzdeleri; beyaz şarap için %93,0; kırmızı şarap için %95.5 ve köpüklü şarap için %94.2 dir.

Bu çalışma koşullarında biri standarda diğeri örneğeye ait 2 kromatogram Şekil 1'de verilmiştir.



Şekil 1. Sorbik asit standardına ve örneğeye ait kromatogram: A) Sorbik asit standardı (ppm) B) Beyaz şarap (1/100 seyreltme)

Kolon : Supelcosil™ LC-18 (250x4.6 mm I.D, 5mm)
Mobil faz : $5 \cdot 10^{-3}$ M $\text{NH}_4\text{CH}_2\text{COO}^-$ metanol ile %30 (V/V) (pH H_3PO_4 ile 4,78'e ayarlanmıştır)
Akış hızı : 1.5 mL/dakika
Çalışmada esas alınan iki dalga boyu : 230 nm ve 254 nm

Çalışmada susuz ortamda pH standardizasyonunda 0.05 m potasyum asit ftalat referans değeri standardı olarak kullanılmış ve öncelikle pH metrenin kalibrasyonu ortamın metanol derişimine uygun şekilde yapılmıştır. Kapasite faktörlerinin hesaplanması için bileşimin alıkonma zamanı ve 0.01M derişimdeki KBr'nin alıkonma zamanları üçer enjeksiyonla belirlenmiştir.

Sorbik asitin ayrımının ve tayininin incelendiği çalışmalarda üzerinde durulan bir husus, sorbatın yoğun absorbansı sebebiyle benzoik asit tayininde bozucu etki yapabileceğidir (GUTFINGER ve ark. 1996). Benzoik asit, şaraplarda kullanılmasına müsaade edilmeyen bir bileşik olmasına rağmen bu çalışmada iki bileşimin ayrımı da incelenmiş ve KBr ve bu iki bileşiğe özgü alıkonma zamanları dikkate alınarak kapasite faktörleri belirlenmiştir. İki bileşimin kapasite faktörleri, bunların birbirinden ayrılabilceğini doğrulamıştır.

Sorbik asit oldukça düşük derişimlerde bile 254 nm'deki yüksek molar absorpsiyon katsayısı nedeniyle belirlenebilmektedir. Bu katsayının büyük olması şarap numunesinin seyreltilmesine olanak tanımakta ve böylece şarapta bulunan ve bu dalga boyunda absorpsiyon yapan fenoliklerin bozucu etkileri elimine edilmiş olmaktadır.

KAYNAKLAR

- ANONYMOUS. 1989. Şaraplarda kimyasal analitik yöntemler ve şarap işletmeleri denetimi. Tekel Enstitüleri. Yayın No. 33.
- ARCHER, A.W. 1980. Determination of benzoic and sorbic acid in orange juice by high performance liquid chromatography. *Analyst*. 105, 407-410.
- ARYA, S.S. 1980. Stability of sorbic acid in aqueous solutions. *J. Agric. Food Chem.* 28, 1246-1249.
- BENASSI, M.T. and CECCHI, H.M. 1998. Method development for the simultaneous determination of carboxylic acids, phenolic compounds, and sorbic acid in white wines. *J.Liq. Chrom.&Rel. Technol.* 21(4). 491-501.
- BENNET, M.C. and PETRUS, D.R. 1977. Quantitative determination of sorbic acid and sodium benzoate in citrus juice. *J. Food Sci.* 42: 1220-1224.
- CALULL, M., MARCE, R.M., SANCHEZ, G. and BORRULL, F. 1992. Determination of additives in wine by high-performance liquid chromatography, 607, 339-347.
- CHISHOLM, M.G. and SAMUELS, J.M. 1992. Determination of additives in wine by high-performance liquid chromatography, 607, 339-347.
- CHISHOLM, M.G. and SAMUELS, J.M. 1992. Determination of the metabolites of sorbic acid on the odor of a spoiled red wine. *J. Agric. Food Chem.* 40, 630-633.
- EDINGER, W.D. and SPLITTSTOESSER, D.F. 1986. Sorbate tolerance by lactic acid bacteria associated with grapes and wine. *J. Food Sci.* 51, 1077-1078.
- GUTFINGER, T., ASHKENAZY, R., and LETAN, A. 1976. Determination of benzoic and sorbic acid in orange juice. *Analyst*. 101, 49-54.
- KAKEMOTO, M. 1992. Simultaneous determination of sorbic acid, dehydroacetic acid and benzoic acid by gas chromatography - mass spectrometry. *J. Chromatogr.* 594, 253-257.
- KANIANSKY, D., MASAR, M., MADAJOVA, V., MARAK, J. 1994. Determination of sorbic acid in food products by capillary zone electrophoresis in a hydrodynamically closed separation compartment. *J. Chromatogr. A.* 677, 179-185.
- KUO, K.L. and HSIEH, Y.Z. 1997. Determination of preservatives in food products by cyclodextrin modified capillary electrophoresis with multiwavelength detection. *J. Chromatogr. A.* 768, 334-341.
- LAU, O.W. and LUK, S.F. 1987. Iodometric method for the determination of sorbic acid in soft drinks. *Analyst*. 112, 1269-1272.
- LONGHI, P., MUSSINI, T. and RONDININI, 1986. Predicting standard pH values for reference buffer solutions in solvent mixtures with water. *Anal. Chem.* 58, 2290-2292.
- LUCK, E. and NUE, H. 1965. Prevention of secondary fermentation of sweet wines with sorbic acid. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 126, 325-335.
- OUGH, C.S., INGRAHAM, J.L. 1960. Use of sorbic acid and sulfur dioxide in sweet table wines. *Am. J. Enol Vitic.* 11, 117-122.
- RONDININI, S., MUSSINI, P.R., and MUSSINI, T. 1987. Reference value standards and primary standards for pH measurements in organic solvents and water+organic solvent mixtures of moderate to high permittivities. *Pure&Appl. Chem.* 59(11), 1549-1560.
- TEREDA, H. and SAKABE, Y. 1985. Studies on the analysis of food additives by high performance liquid chromatography. Simultaneous determination of preservatives and saccharin in foods by ion pair chromatography. *J. Chromatogr.* 346, 333-340.
- TERREL, F.R., MORRIS, J.R., JOHNSON, M.G., GBUR, E.E. and MAKUS, D.J. 1993. Yeast inhibition in grape juice containing sulfur dioxide, sorbic acid, and dimethyl-dicarbonate. *J. Food. Sci.* 58(5), 1132-1134.
- THOMPSON, O.C., TRENERRY, V.C. and KEMMERY, B. 1995a. Determination of cyclamate in low joule foods by capillary zone electrophoresis with indirect ultraviolet detection. *J. Chromatogr. A.* 704, 203-210.
- THOMPSON, O.C., TRENERRY, V.C. and KEMMERY, B. 1995b. Micellar electrokinetic capillary chromatographic determination of artificial sweeteners in low joule soft drinks and other foods. *J. Chromatogr. A.* 694, 507-514.
- WALDRON, K.C. and LI, J. 1996. Investigation of a pulsed-laser thermo-optical absorbance detector for the determination of food preservatives separated by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. B.* 683, 47-54.