

ELMA SUYUNDA HPLC İLE PATULİN ANALİZ YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI¹

COMPARISON OF THE HPLC METHODS FOR PATULIN ANALYSIS IN APPLE JUICE¹

Mine UYGUN², Aziz EKŞİ³

²Ankara Üniversitesi Kalecik Meslek Yüksekokulu, ANKARA

³Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, ANKARA

ÖZET: Bu araştırmada, elma suyunda patulin analizi için yaygın uygulanan başlıca dört HPLC yöntemi tekrarlanabilirlik ve geri alınabilirlik açısından karşılaştırılmıştır. Yöntemlerin tekrarlanabilirliği varyasyon katsayısı ile değerlendirilmiştir. Aynı elma suyunda paralel patulin bulgularının varyasyon katsayısı, yöntemlere göre %7.1-%15.2 arasında değişmektedir. Geri alınabilirliğin belirlenmesi için elma suyuna 25.8, 51.6, 77.4 µg/L patulin katılmıştır. Ortalama geri alınma oranı analiz yöntemine göre %73.4-%100.5 arasında değişmektedir. Analiz süresi ise 50-140 dakikadır. Denen yöntemlerden en elverişli olanı ISO-8128'dir.

ABSTRACT: In this research; well-known four HPLC methods for patulin analysis were compared in case of repeatability and recovery. The repeatability of these methods was investigated by variation coefficient. In the same apple juice, variation coefficient of paralel patulin findings was found to be changed between 7.2-15.2 %. Different amounts of patulin, 25.8, 51.6, 77.4 µg/L, for the determination of recovery have been added into apple juice. The average recovery was found to be varied between 73.4-100.5%. The analysis period is 50-140 minute per sample. ISO-8128 was found to be the most suitable between the methods used in this study.

GİRİŞ

Dünyada elma suyu konsantresi ticareti giderek gelişmektedir. Türkiye bu ticarete, başlıca ihracatçı ülkelerden birisi olarak yer almaktadır (EKŞİ 1997). Ticaretin gelişmesine koşul olarak da kalite daha fazla önem kazanmaktadır. En önemli kriteri ise konsantrenin çürüksüz meyveden işlenmesidir. Bu da, konsantride patulin miktarının belirli limitin altında olması ile kontrol altına alınmaktadır (KARADENİZ ve EKŞİ 1995).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından gıdalarda bulunmasına izin verilen maksimum patulin miktarı 50 µg/kg'dır. (WOLLER ve MAJERUS 1982). Son yıllarda elma suyunda bu limitin 25 µg/kg'a düşürülmesine çalışılmaktadır (ANONYMOUS 1998).

Bu konuda önemli problemlerden birisi de, patulin analizi için farklı yöntemlerin kullanılmasıdır. Bu amaçla uygulanan başlıca HPLC yöntemleri GEIPEL ve ark. (1981), FORBITO ve BABSKY (1985), ANONYMOUS (1993) ve BRAUSE ve ark. (1996) tarafından tanımlanmıştır.

Problem ise aynı örnekte farklı yöntemler uygulandığında belirlenen patulin miktarının farklı olmasıdır ve bu durumun tartışmalara yol açmasıdır. Bu yöntemlerin birbiri ile karşılaştırıldığı herhangi bir çalışma yoktur. Bu çalışmada patulin analizinde uygulanan başlıca yöntemlerin özellikle tekrarlanabilirlik ve geri alınabilirlik açısından karşılaştırılması amaçlanmaktadır. Böylece değişik yöntemlerle bulunan analiz sonuçları arasındaki ilişki de dolaylı olarak ortaya konulmuş olmaktadır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

Bu araştırmada materyal olarak elma suyu konsantresi kullanılmıştır. Analiz için elma suyu konsantresi 11,2°Bx'e seyreltilmiştir. Geri alınabilirliğin belirlenmesi için elma suyuna 25.8, 51.6, 77.4 µg/L olmak üzere üç farklı konsantrasyonda patulin katılmıştır.

¹Prof. Dr. Aziz EKŞİ danışmanlığında Mine UYGUN tarafından hazırlanan yüksek lisans tezinden alınmıştır.

Yöntem

Patulin analizi için yaygın olarak GEIPEL ve ark. (1981), FORBITO ve BABSKY (1985), ISO 8128 (ANONYMOUS 1993), BRAUSE ve ark. (1996) tarafından tanımlanan yöntemler uygulanmaktadır. Bu nedenle karşılaştırma için bu dört yöntem seçilmiştir.

Karşılaştırılan yöntemler, alındıkları kaynaklara bağlı kalınarak aşağıda ayrıntılı olarak tanımlanmıştır. Analizlerde WATERS marka HPLC ve KNAUER marka Lichosorb RP 18 kolon kullanılmıştır.

GEIPEL ve ark. (1981) Yöntemi ile Patulin Tayini

Patulin ekstraksiyonu: Meyve suyu ve benzeri sulu ve homojen içeceklerden 5mL alınır (10 g konsantre + 40mL) su ve ayırma hunisinde 50 mL etil asetat ile 3 kez 1 dakika ekstrakte edilir. Organik faz Na_2SO_4 üzerinden filtre edilir ve bir balonda toplanır. Ayırma hunisi ve filtre toplam 50 mL etil asetat ile yıkanır ve süzüntü balona alınır.

Toplam ekstrakt döner evaporatörde ve 50°C'lik su banyosunda 25 mL'ye koyulaştırılır ve 75 mL toluol ile karıştırılır.

Ekstraktın kolon kromatografisiyle saflaştırılması: Kromatografi kolonu yaklaşık 20 mL toluol ile doldurulur. Kolona sırası ile önceden toluol ile karıştırılmış 15 g kizeljel, 15 g sodyum sülfat ve üzerine biraz biraz pamuk konulur. Üstteki toluollu pamuk kuru kalıncaya kadar akmaya bırakılır.

Daha önce hazırlanan ekstrakt kantitatif olarak kolona verilir. Üstteki solvent pamuğa kadar yavaşça akmaya (yaklaşık 50 dakika) bırakılır. Elde edilen elüat atılır.

Bunun arkasından patulin, 250 mL toluol + etil asetat karışımı (3+1) ile 2 saatte kolondan yıkanır. Kolonun kuruluğa kadar akmaya bırakılması ile elde edilen elüat döner evaporatörle (30 °C'lik su banyosunda) 5-10 mL'ye kadar koyulaştırılır ve sodyum sülfat üzerinden konik uçlu bir balona kantitatif olarak aktarılır. Yeniden yaklaşık 1 mL'ye koyulaştırdıktan sonra solvent kalıntısı azot gazı ile uzaklaştırılır. Kalıntı kantitatif olarak 1 mL metil alkol + etil asetat (9+1) karışımı ile alınarak analiz tüplerine alınır.

Standart çözeltinin hazırlanması: Patulin konsantrasyonu 0.34, 1.02, 1.70 µg/mL olan çözeltilerin herbirinden 20 µL enjekte edilerek standart eğri çizilir. Örnek ekstraktından 20 µL enjekte edilir ve patulin konsantrasyonu standart eğriden µg/kg (ppb) olarak bulunur.

HPLC ile analiz: 10 veya 20 mikrolitre saf ekstrakt HPLC kolonuna verilir. HPLC koşulları aşağıdaki gibidir.

Elüasyon sıvısı :	Su + asetonitril (9+1)
Akış debisi :	0.5-0.8 L/dakika
Kolon :	Lichosorb RP 18 (5 mikron, uzunluk 250 mm, iç çap 4.6 mm)
Dedektör :	UV (276 nm)

FORBITO ve BABSKY (1985) Yöntemi ile Patulin Tayini

Patulin ekstraksiyonu: Seyretilmiş konsantre veya meyve suyundan 5.0 mL, 20.0 mL'lik vidalı kapaklı tüpe alınır. Üzerine 5.0 mL etil asetat eklenerek 2 dakika vorteks karıştırıcıda karıştırılır. Faz ayrımı gerçekleştikten sonra üstteki faz pastör pipeti ile 30.0 mL'lik vidalı kapaklı tüpe alınır ve bu işlem tekrarlanır. Üzerine 2.0 mL %1.5'lik sodyum karbonat ilave ederek 1 dakika çalkalanır. Fazlar birbirinden tamamen ayrıldıktan sonra etil asetat fazı evaporasyon balonuna aktarılır. Etil asetat fazının alttaki faz ile karışmamasına dikkat edilir. Sulu faz 5.0 mL etil asetat ile ekstrakte edilir. Birleştirilen etil asetat fazları 40 °C'de azot gazı altında neredeyse kuruluğa kadar evapore edilir. 1.0 mL etil asetat eklenerek 2.0 mL'lik konik uçlu tüpe alınır. Tüpler 40 °C'deki su banyosuna yerleştirilir ve etil asetat ekstraktı azot gazı altında tümüyle kurutulur. Etil asetat ile balon iki kez daha yıkanıp evaporasyon balonuna alınır. Kalıntı pH'sı 4.0'a ayarlı 200 µL su içinde çözüldürülür.

HPLC koşulları: Pompaların akış hızı 1.0 mL/dak'ya dedektörün dalga boyu ise 254 nm'ye ayarlanır ve duyarlık kontrolü 0.01 seviyesine getirilir. 0.34, 1.02, 1.70 µg/mL patulin içeren çözeltilerin herbirinden 20.0 µL enjekte edilir. Konsantrasyona karşılık patulin pik alanlarını çakıştırarak standart eğri hazırlanır. Aynı koşullar altında hazırlanan örnek ekstraktı enjekte edilir. Standart eğriden, enjekte edilen örnekteki patulin miktarı okunur.

Kolon : Lichosorb RP 18 (5 mikron, uzunluk 250 mm, iç çap 4.6 mm)
 Mobil faz : % 0.8'lik tetrahidrofurana
 Akış debisi : 1.0 mL/dak
 Dedektör : UV (254 nm)

ISO 8128 Yöntemi (ANON 1993) ile Patulin Tayini

Patulin ekstraksiyonu: Elma suyu konsantresi su ile hacimce 1:5 oranında seyreltildikten sonra aşağıdaki işlemler uygulanır.

5 mL örnek, 5.0 mL etil asetat ile en az 1 dakika ekstrakte edilir. Ekstraksiyon 5'er mL'lik etil asetat ile 2 kez daha tekrarlanır. Her üç etil asetat fazı birleştirilir ve 2.0 mL sodyum karbonat ile ekstrakte edilir. Karbonat fazı 5 mL etil asetat ile ekstrakte edilir ve önceki fazlar ile birleştirilir, karbonat fazı atılır. 5 damla asetik asit eklenir, karıştırılır ve evapore edilir.

Çözelti kantitatif olarak yaklaşık 5.0 mL hacmindeki bir kaba her biri 1 mL olan etil asetat ile bir kaç kez yıkanarak aktarılır.

Sonra yaklaşık 40 °C'de azot gazı ile kuruluğa kadar evapore edilir. Kalan kısım 500µL'lik (0.5 mL) mobil faz solventi veya asetat puffer içerisinde çözülür.

Fazlar birleştirildikten sonra, sodyum karbonat ile olan ekstraksiyon en kısa sürede (1-2 dakika) bitirilmelidir. Çünkü patulin, alkali ortamda stabil değildir.

Konsantrasyonun hesaplanması: Patulin standart çözeltisinin 276 nm'deki absorpsansı, ışık yolu 10.0 mm olan kuvarz küvet kullanılarak spektrofotometre ile ölçülür.

Patulin çözeltisinin konsantrasyonu µg/mL olarak ifade edilir ve aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanır.

$$P_s = M \times M_r \times 1000 \times C / A_{276}$$

A = Patulin standart çözeltisinin absorpsansı

A₂₇₆ = Patulin çözeltisinin spektrumunun maksimum dalga boyundaki moleküler absorpsansı

M_r = Patulinin bağıl molekül ağırlığı

C = Cihaz sabiti (genellikle 1)

Standart eğrinin hazırlanması: HPLC'de akış hızı 1.0 mL/dakika'ya, duyarlık ise 0.01'e ayarlanır.

Standart çözeltinin patulin konsantrasyonu yaklaşık 8.596 µg/mL'dir. Patulin standart çözeltisinden 1.0 mL, 3.0 mL, 5.0 mL'lik kısımlar 25.0 mL'lik üç ayrı ölçü balonuna alınarak asetat buffer ile çizgisine tamamlanır.

Herbir standart çözeltiden 20 µL HPLC'ye enjekte edilir. Standart eğri, pik yükseklikleri (yada alanları) ne karşı patulin konsantrasyonları (µg/mL) işaretlenerek hazırlanır.

Analiz: Deney çözeltisinden 20.0 µL enjekte edilir. Bu çözeltinin piki, standart çözeltilerinin pikleriyle kıyaslanarak tanımlanır. Burada hidroksimetilfurfural pikinin patulin pikinden ayrılması önemlidir.

BRAUSE ve Ark. (1996) Yöntemi ile Patulin Tayini

Patulin ekstraksiyonu: Seyreltilmiş konsantreden veya elma suyundan 5.0 mL 20x150 mm cam tüpe alınır. Üzerine 10.0 mL etil asetat konularak 1 dakika karıştırılır. Faz ayrımı gerçekleştikten sonra üstteki fazı pastör pipeti ile 16x150 mm tüpe aktarılır.

Eğer emülsiyon bulanık ise üreticinin kontrolüne bağlı olan pektin miktarıyla ilgili olarak meyve suyuna ön işlem uygulanır. Ekstraksiyon için santrifüj edilmiş ömektan 5.0 mL alınır.

İkinci defa 10.0 mL etil asetat 20 x 150 mm tüpe konulur. 1 dakika vorteks karıştırıcıda karıştırılır. Faz ayrılması gerçekleştikten sonra iki organik faz 16x150 mm'lik tüpte birleştirilir. Üzerine 2.0 mL %1.5'lük sodyum karbonat çözeltisi eklenir ve vorteks karıştırıcıda karıştırılır. Faz ayrılması gerçekleştikten sonra pastör pipeti ile üstteki tabaka temiz bir tüpe alınır. Alttaki sodyum karbonat fazı 5.0 mL etil asetat ile ekstrakte edilir ve aynı tüpe alınır. Sodyum karbonat fazı atılır.

1.0 g sodyum sülfat eklenir. Tüpün ağzı sıkıca kapatıldıktan sonra 30 saniye çalkalanır. Etil asetat ekstraktı sodyum sülfat ile kurutulmalıdır. Etil asetat ekstraktı sulu olduğu zaman evaporasyon sırasında patulin par-

çalanabilmektedir. 40 °C'lik su banyosunda azot gazı altında 1-2 mL kalıncaya kadar evapore edilir. Bunun kantitatif olarak 7-8 mL'lik kaba 1.0 mL etil asetat ile yıkanarak alınır ve kuruyuncaya kadar evapore edilir. Kalıntı 0.5 mL asetik asit içinde çözündürülür.

Konsantrasyonun hesaplanması: Uygulamada 3 konsantrasyonda hazırlanmış patulin standart çalışma çözeltilerinden 20 µL enjekte edilir ve patulin konsantrasyonlarına (µg/mL) karşılık gelen pik alanlarını işaretleyerek standart eğri çizilir 20 µL test çözeltisi enjekte edilir. Test çözeltisindeki patulin konsantrasyonu standart eğriden okunabileceği gibi pik yüksekliğinden de hesaplanabilir.

HPLC koşulları: Kolon : Lichosorb RP 18 (5 mikron, uzunluk 250 mm, iç çap 4.6 mm)

Akış : 0.5 mL/dak

Dedektör : UV (276)

Mobil faz : %10'luk asetonitril

Uygulanan yöntemlerin başlıca işlem basamakları Çizelge 1'de özetlenmiştir.

Çizelge 1. HPLC İle Patulin Analiz Yöntemlerinin Başlıca İşlem Basamakları

İşlem Basamağı	BRAUSE ve Ark. (1996)	ISO 8128 (ANON 1993)	FORBITO ve BABSKEY (1985)	GEIPEL ve Ark. (1981)
Etil asetat ekstrak. -(MS/EA) -Süre, dak -Sayı (Eks.)	5/10 1 2	5/5 1 3	5/5 2 2	50/50 1 3
Na₂CO₃ Ekstrak. -Miktar	2 ml(%1.5)	2 ml (14g/l)	2 ml(%15)	-
Na₂SO₄ Uygulaması	20-30 Saniye çalkalama	-	-	Na ₂ SO ₄ üzerinden filtre
Safılaştırma Kolonu	-	-	-	Slikajel + Na ₂ SO ₄
Evaporasyon 1. Evaporasyon 2. Evaporasyon 3. Evaporasyon	N ₂ ,40°C N ₂ , 40°C -	Rotary, 40°C N ₂ , 40°C -	N ₂ , 40°C N ₂ , 40°C -	Rotary, 30°C Rotary, 30°C N ₂ , 30°C
Kalıntı -Solvent - Hacim	Su (pH4.0) 0.5 ml	Asetonitril (%10) 500 µl	Su (pH 4.0) 200 µl	Metil a. + Etil a. 1.0 ml
HPLC Koşulları - Dalga Boyu -Akış -Mobil Faz	276 nm 0.5 ml/dak Asetonitril (%10)	276nm 1.0 ml/dak Asetonitril (%10)	254 nm 1.0 ml THF (%0.8)	276 nm 0.8 ml/dak Asetonitril (%10)

İstatistik Metot

Metodların tekrarlanabilirlik (ANONYMOUS 1988) açısından birbiri ile karşılaştırılması için, aynı örnekte elde edilen analiz bulgularının standart sapması ve varyasyon katsayısı (DÜZGÜNEŞ ve ark. 1981) hesaplanmıştır. Hesaplama için MINITAB data analiz programı kullanılmıştır.

BULGULAR ve TARTIŞMA**Patulin Analiz Yöntemlerinin Tekrarlanabilirlik Açısından Karşılaştırılması**

Başlıca patulin analiz yöntemlerinin tekrarlanabilirlik açısından karşılaştırılması için konsantreden hazırlanan ve briks derecesi 11.2 olan aynı elma suyu örneğinde her bir yöntemle paralel patulin analizi yapılmıştır. Bu yolla elde edilen 12 paralel analiz bulguları Çizelge 2'de verilmiştir.

Karşılaştırma kolaylığı açısından Çizelge 2'deki değerlerin değişim aralığı ortalama, standart sapma ve varyasyon katsayısı gibi tanımlayıcı değerleri Çizelge 3'de ayrı olarak verilmiştir.

Çizelge 2. Aynı Elma Suyunda (11.2 °Bx) Farklı Analiz Yöntemleri İle Belirlenen Patulin Miktarı (ppb)

Sıra No	GEIPEL ve ark. 1981	FORBITO ve ark. 1985	ISO 8128 1993	BRAUSE ve ark. 1996
(01)	44.0	23.7	35.4	36.9
(02)	45.6	20.5	38.9	25.9
(03)	41.1	21.2	37.2	31.9
(04)	46.2	29.5	34.2	34.2
(05)	47.9	20.8	39.8	28.3
(06)	47.0	32.1	42.6	34.3
(07)	44.3	23.8	37.0	28.9
(08)	43.5	25.0	37.6	32.2
(09)	45.0	26.6	36.2	31.6
(10)	38.4	28.8	32.2	32.3
(11)	39.9	27.5	38.3	33.2
(12)	39.3	21.5	37.0	32.1

Çizelge 3. Aynı Elma Suyunda Farklı Yöntemlerle Elde Edilen Patulin Bulgularının Tanımlayıcı Değerleri

Analiz Yöntemi	Değişim Aralığı Min-Max	Ortalama (x)	St. Sapma (s)	C.V. %
GEIPEL ve ark. 1981	38.4-47.9	43.5	3.2	7.3
FORBITO ve BABSKEY 1985	20.5-32.1	25.0	3.8	15.2
ISO 8128 1993	32.2-42.6	37.2	2.7	7.2
BRAUSE ve ark. 1996	25.6-36.9	31.8	2.9	9.1

Aynı örnekte saptanan ortalama patulin miktarı GEIPEL ve ark. (1981) tarafından tanımlanan yöntemle göre 43.5 ppb iken, ISO 8128 (ANONYMOUS 1993) yöntemi ile 37.2 ppb, BRAUSE ve ark. (1996) tarafından tanımlanan yöntemle 31.87 ppb, FORBITO ve BABSKEY (1985) tarafından tanımlanan yöntemle 25.0 ppb'dir.

Eğer ISO 8128 (ANONYMOUS 1993) yöntemi ile belirlenen patulin miktarı 100 alınrsa, bu değer GEIPEL ve ark. (1981) yöntemi ile 117, BRAUSE ve ark. (1996) yöntemi ile 85, FORBITO ve BABSKEY (1985) yöntemi ile 67 olarak bulunur.

Yöntemlerin değişkenlik ya da tekrarlanabilirlik açısından karşılaştırılması için, standart sapmada ortalamanın etkisini gidermek amacıyla standart sapmanın ortalamaya yüzdesini gösteren varyasyon katsayısı en uygun ölçüttür. Çizelge 3'deki değerlere göre, paralel analizler arasındaki değişkenliği en az olan yöntem %7.2 C.V. değeri ile ISO 8128 (ANONYMOUS 1993)'dir. Bulguların düzeyi farklı olmakla birlikte GEIPEL ve ark. (1981) yöntemi ile elde edilen bulguların değişkenliği (C.V. %7.3) buna çok yakındır. Bunları %9.1 C.V. değeri ile BRAUSE ve ark. (1996) yöntemi izlemektedir. Buna karşılık FORBITO ve BABSKEY (1985) ile elde edilen bulguların değişkenliği diğerlerinden oldukça yüksektir ve varyasyon katsayısı %15.2'dir.

Kısaca tekrarlanabilirlik açısından yöntemlerin en yeterli ISO 8128 (ANONYMOUS 1993)'dir.

Patulin Analiz Yöntemlerinin Geri Alınabilirlik Açısından Karşılaştırılması

Analiz yöntemlerinin duyarlılığının değerlendirilmesinde en çok kullanılan ölçütlerden birisi de geri alınabilirlik veya geri kazanma oranıdır. Bu değer, analiz örneğine katılan belirli madde miktarının analitik olarak belirlene miktarı ve bunun katılan miktarına göre yüzdesidir.

Bu amaçla önce elma suyu örneğinde, başlangıçtaki patulin miktarı dört farklı yöntemle belirlenmiştir. Daha sonra bu elma suyuna sırasıyla 25.8, 51.6, 77.4 µg/L konsantrasyonunda patulin katılmış ve her bir örnekteki

patulin miktarı her bir yöntemle yeniden belirlenmiştir. Analizle belirlenen patulin miktarından, elma suyunda başlangıçta bulunan patulin miktarı çıkarılarak, katılan patulin konsantrasyonunun analizle belirlenen miktarı bulunmuştur. Geri alınma oranı, analizle bulunan patulin miktarının katılan patulin miktarına göre % oranı olarak hesaplanmıştır.

Gerİ Alınma Oranı (%) : $A - B / K \times 100$

A : Elma suyunda belirlenen patulin miktarı ($\mu\text{g/L}$)

B : Elma suyunda başlangıçtaki patulin miktarı ($\mu\text{g/L}$)

K : Elma suyuna katılan patulin miktarı ($\mu\text{g/L}$)

Bu yolla her bir yöntem ve herbir patulin dozu (25.8, 51.6, 77.4 $\mu\text{g/L}$) için belirlenen patulin miktarları ve hesaplanan geri alınma oranları Çizelge 4 (GEIPEL ve ark. 1981), Çizelge 5 (FORBITO ve BABSKEY 1985), Çizelge 6 (ANONYMOUS 1993) ve Çizelge 7 (BRAUSE ve ark. 1996)'de verilmiştir.

Çizelge 4. GEIPEL ve Ark. (1981) Yöntemi İle Patulinin Elma Suyunda Geri Alınma Oranı

Katılan Miktar $\mu\text{g/L}$	Belirlenen Miktar $\mu\text{g/L}$	Gerİ Alınma % (Recovery)
25.8	27.0	100.7
	25.0	
51.6	50.5	101.5
	51.9	
	54.7	
77.4	76.4	99.3
	77.3	

Çizelge 5. FORBITO ve BABSKEY. (1985) Yöntemi İle Patulinin Elma Suyunda Geri Alınma Oranı

Katılan Miktar $\mu\text{g/L}$	Belirlenen Miktar $\mu\text{g/L}$	Gerİ Alınma % (Recovery)
25.8	19.9	76.8
	20.7	
	18.9	
51.6	36.5	72.3
	38.0	
	37.4	
77.4	57.0	73.4
	58.4	
	54.9	

Çizelge 6. ISO 8128 (ANONYMOUS 1993) Yöntemi İle Patulinin Elma Suyunda Geri Alınma Oranı

Katılan Miktar $\mu\text{g/L}$	Belirlenen Miktar $\mu\text{g/L}$	Gerİ Alınma % (Recovery)
25.8	23.2	96.6
	26.2	
	25.4	
51.6	48.6	93.3
	48.4	
	47.4	
77.4	71.1	94.6
	74.7	
	73.9	

Çizelge 7. BRAUSE ve Ark. (1996) Yöntemi İle Patulinin Elma Suyunda Geri Alınma Oranı

Katılan Miktar $\mu\text{g/L}$	Belirlenen Miktar $\mu\text{g/L}$	Gerİ Alınma % (Recovery)
25.8	22.7	88.2
	23.1	
	22.5	
51.6	44.9	87.3
	46.1	
	44.2	
77.4	67.9	88.1
	68.5	

Çizelge 8. Farklı Yöntemlerde Patulinin Elma Suyundan Geri Alınma Oranları

Analiz Yöntemi		Gerİ Alınma Oranı (%)			
		Min	-	Max	Ortalama
GEIPEL ve ark.	1981	99.3	-	101.5	100.5 ± 3.4
FORBITO ve BABSKEY	1985	72.3	-	76.8	73.4 ± 3.0
ISO 8128	1993	93.3	-	96.6	94.8 ± 3.6
BRAUSE ve ark.	1996	87.3	-	88.2	87.8 ± 1.3

İdeali geri alınma oranının %100 olmasıdır Çizelge 8'deki değerlere bu açıdan bakıldığı zaman ortalama %100.5 geri alınma oranı ile GEIPEL ve ark. (1981) tarafından tanımlanan yöntem en uygun olanıdır. Bunu, ortalama %94.8 geri alınma oranı ise ISO 8128 (ANONYMOUS 1993) izlemektedir. BRAUSE ve ark. (1996) ve FORBITO ve BABSKEY (1995) tarafından tanımlanan yöntemlerle belirlenen patulinin elma suyundan geri alınma oranı ise sırası ile %87.8 ve %73.4'tür. Bu iki yöntemin özellikle FORBITO ve BABSKEY (1985) tarafından tanımlanan yöntemin amaca uygun olmadığı ortaya çıkmaktadır.

Uygulanabilirlik Açısından Patulin Analiz Yöntemlerinin Karşılaştırılması

Kuşkusuz amaca uygun yöntemin öncelikle doğruluk ve duyarlılık açısından yeterli olması gereklidir. Ancak, doğruluk ve duyarlılık açısından birbirine yakın yöntemlerin uygulanabilirlik açısından durumları da önemlidir. Bir fikir vermesi bakımından söz konusu analiz yöntemlerinin birbirine göre durumu uygulanabilirlik açısından da değerlendirilmiştir.

Uygulanabilirlik açısından başlıca ölçülerden birisi, analiz süresidir. Bir analiz için, farklı yöntemlere göre gerekli süre Çizelge 9'da verilmiştir.

Çizelge 9. Farklı Yöntemlerle Elma Suyunda Patulin Analiz Süresi

İşlem Basamağı	GEIPEL ve ark. 1981	FORBITO ve BABSKEY 1985	ISO 8128 1993	BARUSE ve ark. 1996
Ekstraksiyon	20	10	15	10
Saflaştırma	50	5	5	5
Evaporasyon	60	30	20	30
Kromatografi	10	15	10	15
Toplam (dak.)	140	60	50	60

Görüldüğü gibi toplam analiz süresi en kısa olan yöntem 50 dakika ile ISO 8128 (ANONYMOUS 1993) yöntemidir. Bunu 60 dakika ile FORBITO ve BABSKEY (1985) yöntemi ve BRAUSE ve ark. (1996) yöntemi, 140 dakika ile GEIPEL ve ark. yöntemi izlemektedir.

SONUÇ

Bu çalışmada elma suyunda patulin analizi için yaygın olarak kullanılan başlıca HPLC yöntemleri GEIPEL ve ark. (1981), FORBITO ve BABSKEY (1985), ISO 8128 (ANONYMOUS 1993), BRAUSE ve ark. (1996) karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma ölçütleri; tekrarlanabilirlik, geri alınma oranı ve uygulanabilirliktir.

Tekrarlanabilirliğin belirlenmesi için elma suyunda her dört yöntemle 12 paralel patulin analizi uygulanmıştır. Her bir yöntemle elde edilen bulguların destriptif değerleri hesaplanmıştır. Varyasyon katsayısına göre değişkenliği en az veya tekrarlanabilirliği en iyi yöntem %7.2 değeri ile ISO 8128 (ANONYMOUS 1993) yöntemidir. Bunu %7.3 değeri ile GEIPEL ve ark. (1981) yöntemi izlenmektedir. FORBITO ve BABSKEY (1985) yöntemi ile elde edilen bulguların varyasyon katsayısı %15.2'dir ve tekrarlanabilirliği en yetersiz olan yöntemdir.

Geri alınabilirliğin belirlenmesi için elma suyuna 3 farklı konsantrasyonda (25.8, 51.6, 77.4 µg/mL) patulin katılmış ve katılan patulin miktarı her bir yöntemle ayrı ayrı belirlenmiştir. Ortalama geri alınma oranı, GEIPEL ve ark. (1981) yönteminde %100.5, FORBITO ve BABSKEY (1985) yönteminde %73.4, ISO 8128 (ANONYMOUS 1993) %94.8, BRAUSE ve ark. (1996) yönteminde ise %87.3'tür. Dolayısı ile geri alınma oranı açısından en yeterli yöntem GEIPEL ve ark. (1981) yöntemidir. Bunu ISO 8128 (ANONYMOUS 1993) yöntemi izlemektedir. Diğer iki yöntem bu açıdan yeterli değildir.

Yöntemlerin uygulanabilirliği; analiz süresi ile değerlendirilmiştir. Analiz süresi yönetime göre 50-140 dakika arasında değişmektedir.

Genel olarak bakıldığında, ISO 8128 (ANONYMOUS 1993) en yeterli yöntem olarak ortaya çıkmaktadır. En yetersiz yöntem ise FORBITO ve BABSKEY (1985) yöntemidir.

KAYNAKLAR

- ANONYMOUS, 1988. Deney metodlarının kesinliği TS 5822. Türk Standardları Enstitüsü. Ankara 76 Sayfa.
- ANONYMOUS, 1993. Apple juice Apple juice concentrates and drinks containing apple juicedetermination of patulin content 1. method using high performance liquid chromatography. ISO 8128.1. International Organisation for Standardization. Genevre.
- ANONYMOUS, 1998. Position paper on patulin (prepared by France). Codex Alimentarius Comission. CX-FAC 98/17. Rome.
- BRAUSE, A.R., TRUCKSESS, M.W., THOMAS F.S. and PAGE, S.W. 1996. Determination of patulin in apple juice by liquid chromatography: Collaborative study. J. of AOAC International 79, 451-455.
- DÜZGÜNEŞ, O. KESİCİ, T., GÜRBÜZ F. 1983. İstatistik metodları. A.Ü.Z.F. Yayınları no: 81, 209 sayfa
- EKŞİ, A. 1997. Türkiye'de meyve suyu endüstrisi. Gıda Teknolojisi 2(10), 84-89.
- FORBITO, P.F. and BABSKY, N.E. 1985. Rapid liquid chromatographic determination of patulin in apple juice. J. Assoc. Off Anal. Chem, 68, 950-951.
- GEIPEL, M., BALTES, W., KRÖNERT, W. und WEBER, R. 1981. Bestimmung von Patulin in Apfelerzeugnissen mit Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie. Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm. 7, 93-96.
- KARADENİZ, F., EKŞİ, A. 1995. Elma suyu konsantreleri ve patulin miktarı ve değişkenliği, Gıda Sanayii Dergisi 39, 14-1.
- WOLLER, R., MAJERUS, P. 1982. Patulin in Obsterzeugnissen-Eigenschaften, Bildung und Vorkommen. Flüssiges Obst. 49, 564-570.

GIDA DERGİSİ 2000 yılı dizgi ücreti abone olanlar için 10.000.000.-TL.
abone olmayanlar için 15.000.000.-TL. olarak yeniden belirlenmiştir.

Ayrı basım; talep eden araştırmacılara 3.000.000.-TL.
ek ücret karşılığında verilecektir.

GIDA TEKNOLOJİSİ DERNEĞİ
YÖNETİM KURULU