

SÜT ÖRNEKLERİNDE 13 BİSFENOLÜN UHPLC Metodu ile Eş Zamanlı Tespiti



Kimya Müh. Fatih ŞENOL

Aplikasyon Uzmanı
Ant Teknik Cihazlar

ANT TEKNİK



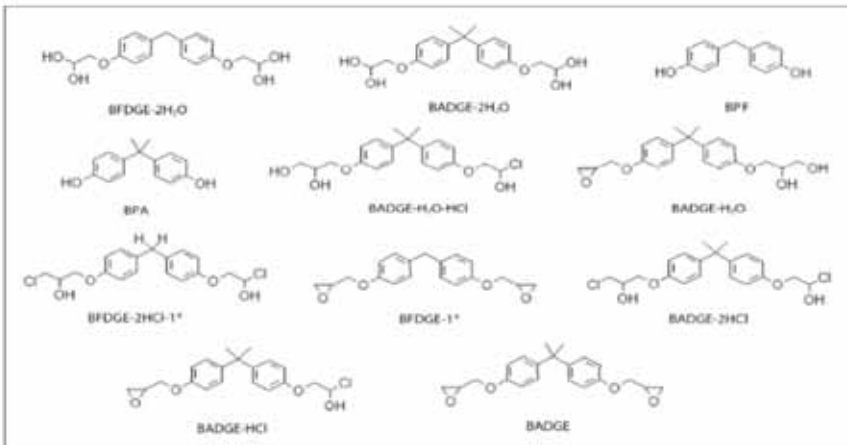
Bisfenol A (BPA) ve Bisfenol F (BPF) polikarbonat plastikler ve epoksi reçinelerin monomerlerdir. Bu monomerlerin diglisidil esterleri, yani BADGE ve BFDGE (Şekil 1), aynı zamanda polimerik ürünler içinde de mevcuttur. Bu malzemeler çeşitli tüketici ürünlerinde, damacanalarda, bebek biberonları ve buzdolabında/ mikrodalgada işlem görebilen yeniden kullanılabilir gıda kapları gibi şeffaf ve

sert yapıllı malzemelerin üretiminde kullanılmaktadır. Polikarbonat plastiklerin ve epoksi esaslı kaplamaların, BPA, BPF, BADGE ve BFDGE'yi ve Şekil 1'de gösterilen reaksiyon ürünlerini serbest bırakabileceği bildirilmektedir *2. Bu kimyasalların, gıdaya migrasyon

SHIMADZU
Excellence in Science

göç yoluyla geçmesi ve kirlenici olarak tüketilmesi söz konusudur. Araştırmalar, bu kimyasalların migrasyonunun normalde son derece düşük olduğunu bildirmesine rağmen *3, bisfenollerin spesifik migrasyon limitleri (ABH) 1895/2005 No'lu AB mevzuatında gıda ile temas eden malzemelerde belirli epoksi türevlerinin kullanımının kısıtlanması ile ilgili olarak listelenmiştir. BPA östrojenik etkiye sahiptir ve fetüslerde ve bebeklerde normal hormon seviyelerini ve gelişimi bozabilir. ABD'de FDA, BPA bazlı epoksi reçinelerinin, bebek maması ambalajı için kapların iç kaplamaları olarak kullanımını yasaklayan gıda katkı maddeleri düzenlemeleri yayınlamıştır *4. Bu Uygulama Notunda, BPA, BPF, BADGE, BFDGE ve bazı yapısal analogları içeren 13 adet ilgili bisfenolün eş zamanlı tespiti için geliştirilen yeni bir UHPLC yöntemi açıklanmaktadır. Yasal gereksinimleri karşılayabilecek hızlı ve yüksek hassasiyetli

Şekil 1. Bisfenol A, Bisfenol F, Diglisidil Esterleri ve Türevlerinin Kimyasal Yapıları ve Kısaltmaları *2



*: BFDGE-2 ve BFDGE-2HCl-2'nin pozisyonel izomerleri gösterilmemiştir.

Tablo 1 Bisfenollerin ve Türevlerinin UHPLC Koşulları

Kolon	: Shim-pack HR-ODS (250 × 3.0 mm, 3 µm)
Mobil faz	: A: Su B: Asetonitril
Elüsyon programı	: 0.1 dk, 30 % B; 13 dk, 45 % B; 37 dk, 70 % B; 38 - 43 dk, 85 % B; 43.1 dk, 30 % B.
Akış hızı	: 0.40 mL/dk
Dedeksiyon	: Ex 235 nm, Em 317 nm
Fırın sıcaklığı	: 30 °C
Enjeksiyon	: 10 µL

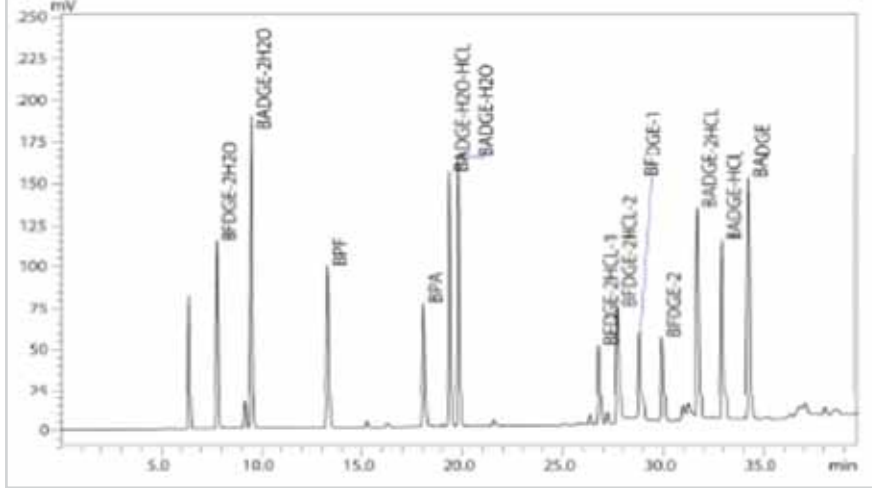
metodun geliştirilmesi amacıyla, yüksek hassasiyetli floresan dedektörlü bir UHPLC sistemi (Nexera X2, Shimadzu Corporation) kullanılmıştır.

UHPLC METODU

Analytik Koşullar

Bu çalışmada floresan dedektörlü (RF-20Axs) Nexera X2 (Shimadzu Corporation) model UHPLC sistemi kullanılmıştır. UHPLC yönteminin

Şekil 2. 13 Bisfenolün Standart Karışımlarının UHPLC-RF Kromatogramı (konsantrasyon: 100 µg/L)



detaylı analitik koşulları Tablo 1’de gösterilmektedir.

Standartlar ve Süt Numuneleri

BPA, BPF ve diğer türevlerini içeren 13 bisfenolün standart karışım stok çözeltisi (Tablo 2) ACN / H₂O’da (30:70) hazırlanmıştır.

Sonuçlar ve Tartışma Hızlı UHPLC Metodunun Geliştirilmesi

İncelenen on üç bisfenolün iyi bir şekilde ayrılması için referans HPLC yönteminin, 95 dakikalık uzun bir çalışma süresi vardır. Şekil 3’te gösterildiği gibi, mevcut UHPLC yöntemi, ayırma çözünürlüğüne sahip her bir bileşik için, özellikle BADGE-H₂O ve BADGE-H₂O-HCL’inin 19.4 ve 19.9 dakikalarında ayrıştırılması için hızlı elüsyon elde etmek üzere optimize edilmiştir. Bileşik yapıları ve kimyasal özelliklerdeki benzerlik nedeniyle, bu iki pikin ayrılması hızlı analiz açısından büyük bir engel teşkil etmiştir. Elde edilen sonuçlar, küçük partikül boyutuna (3 µm) sahip bir C18 UHPLC kolonunun avantajlarını açıkça göstermektedir.

BPA (18.1 dk) ve BPF (13.4 dk), BADGE (34.3 dk) herhangi bir girişim olmadan tamamen ayrılmaktadır.

Kalibrasyon Eğrisi ve Doğrusallık

13 bisfenol pikinin tamamı, Tablo 2’de gösterildiği gibi, 0.999’un üzerinde

Tablo 2. On üç Bisfenolün Analizinde UHPLC Yöntemi ve Performans Değerlendirme Sonuçlarının Özeti

Sıra #	Bileşik Adı	Alıkonma zamanı (dk)	Kalibrasyon aralığı: 5-2000 µg/L		RSD (%), n=6		Hassasiyet **	
			R ²	Doğruluk (%)	5 µg/L	100 µg/L	LOD (µg/L)	LOQ(µg/L)
1	BFDGE-2H ₂ O	7.9	0.9998	100.9	1.0	0.9	0.7	2.0
2	BADGE-2H ₂ O	9.5	0.9991	98.7	0.4	0.4	0.4	1.2
3	BPF	13.4	0.9997	101.7	0.7	0.3	0.8	2.5
4	BPA	18.1	0.9997	101.2	0.8	0.3	1.0	3.1
5	BADGE-H ₂ O-HCL	19.4	0.9998	101.5	0.5	0.3	0.5	1.5
6	BADGE-H ₂ O	19.9	0.9997	103.2	0.3	0.3	0.5	1.5
7	BFDGE-2HCL-1	26.9	0.9996	98.8	0.6	0.1	1.5	4.6
8	BFDGE-2HCL-2	27.8	0.9997	100.8	2.3	0.2	1.2	3.6
9	BFDGE-1	28.9	0.9997	99.3	0.9	0.3	1.4	4.2
10	BFDGE-2	30.0	0.9997	101.3	1.2	0.4	1.6	4.7
11	BADGE-2HCL	31.8	0.9997	98.9	1.8	0.3	0.6	1.7
12	BADGE-HCL	33.0	0.9997	101.7	0.5	0.4	0.7	2.2
13	BADGE	34.3	0.9997	100.7	1.0	0.5	0.5	1.6

* : 12 konsantrasyon seviyesinin ortalaması 5-2000 µg/L

** : LOD için S / N = 3’e ve LOQ için S / N = 10’a dayalı 5 µg / L mix standart verileri kullanılarak tahmin edilmiştir

R2 değerleri ile mükemmel doğrusallık (linearite) vermektedir.

Metod Performansının Değerlendirilmesi

Her kalibrasyon seviyesinde yöntemin doğruluğu hesaplanmış ve her bileşik için ortalama doğruluk değerleri Tablo 2’de sunulmuştur. Yöntemin tekrarlanabilirliğini değerlendirmek için, en düşük konsantrasyonlu standart karışım (5 µg / L) ve 100 ug / L’lik bir standart karışım altı kez arka arkaya çalışılmıştır.

Süt Numunesinde Geri Kazanım Çalışmaları

Blank numune (:BPA içermeyen süt) ve 13 standart karışımı içeren iki numune aynı analitik laboratuvarından elde edilmiş ve Blank, S1 (100 µg / L) ve S2 (1.000 µg / L) olarak etiketlenmiştir. İlk olarak blank numune analiz edilmiş ve 13 bisfenolün hiçbirini içermediği doğrulanmıştır.

SONUÇ

Süt numunelerinde BPA, BPF, BADGE ve BFDGE de dahil olmak üzere 13 bisfenolün hızlı ve yüksek hassasiyetli analizi için, yüksek hassasiyetli floresan detektörün kullanıldığı, bir UHPLC metodu geliştirilmiştir. Bu yeni metodun düşük µg / L seviyelerine duyarlı, hassasiyeti yüksek ve mükemmel tekrarlanabilirliği olan bir metod olduğu tespit edilmiştir. Süt numunelerine uygulandığında elde edilen sonuçlar, bu metodun sütte 13 bisfenolün eş zamanlı tespiti için uygun, hassasiyeti ve güvenilirliği yüksek bir metod olduğu göstermiştir.

REFERANSLAR

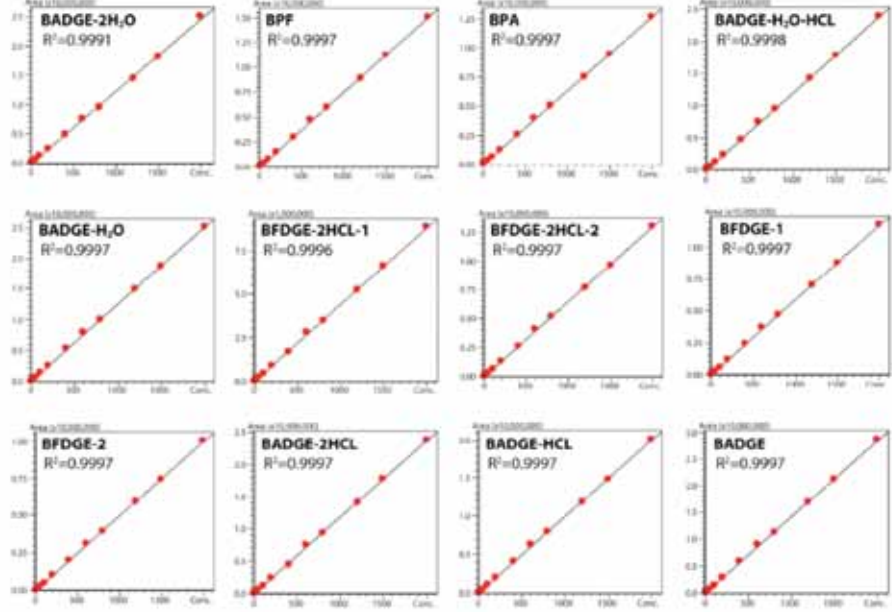
1. AD-0096 No.lu Shimadzu Aplikasyon Notu, Development of an UHPLC Method for Simultaneous Determination of Thirteen Bisphenols in Milk Samples (2016)

* 2: Jan Poustka, Lenka Dunovs ka, Jana Hajšlova, Kateřina Holadova and Ivana Poustkova, Czech J. Food Sci., Vol. 25, No. 4: 221–229 (2007)

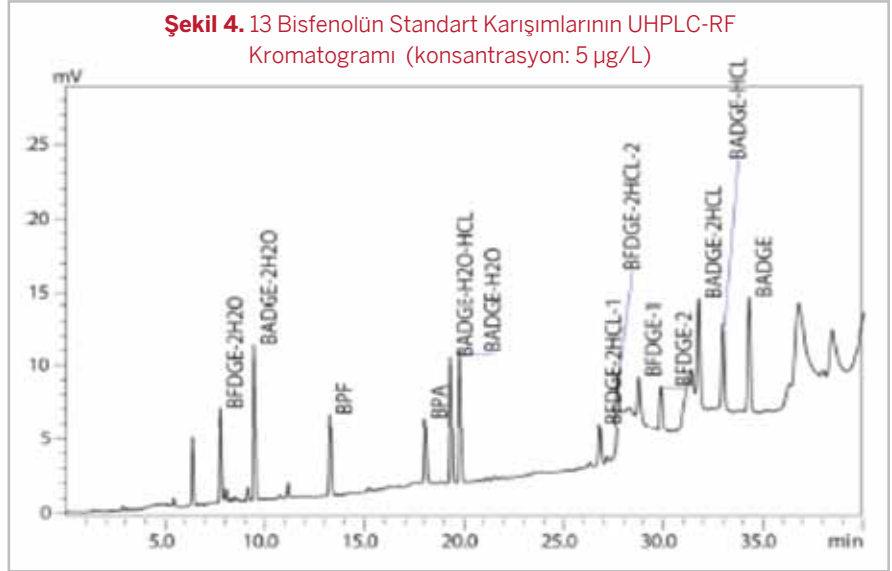
* 3: vana Poustkov, Jaroslav DobiD, Ingrid Steiner, Jan Poustka, Michal Voldr’ich, Eur Food Res Technol (2004) 219:534–539.

* 4: United States Food and Drug Administration web site: Bisphenol A (BPA) for Use in Food Contact Applications 4 Application News No. L408, Shimadzu Corporation.

Şekil 3. 5 µg/L - 2.000 µg/L konsantrasyon aralığında 13 bisfenolün kalibrasyon eğrileri



Şekil 4. 13 Bisfenolün Standart Karışımlarının UHPLC-RF Kromatogramı (konsantrasyon: 5 µg/L)



Şekil 5. S1 Süt Numunesinin (100 µg/L) UHPLC-RF Kromatogramı

