

**T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GIDA MATERYALLERİNDE SPEKTROFOTOMETRİK
YÖNTEMLERLE ÇOK BİLEŞENLİ YAPAY TATLANDIRICILARIN
BİRARADA TAYİNLERİ**

HANDAN ALTUN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
ANORGANİK KİMYA PROGRAMI**

**DANIŞMAN
PROF. DR. MAHMURE ÖZGÜR**

İSTANBUL, 2014

**T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GIDA MATERYALLERİNDE SPEKTROFOTOMETRİK
YÖNTEMLERLE ÇOK BİLEŞENLİ YAPAY TATLANDIRICILARIN
BİRARADA TAYİNLERİ**

HANDAN ALTUN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
ANORGANİK KİMYA PROGRAMI**

**DANIŞMAN
PROF. DR. MAHMURE ÖZGÜR**

İSTANBUL, 2014

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGE LİSTESİ.....	viii
KISALTMA LİSTESİ	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	xii
ÇİZELGE LİSTESİ	xvi
ÖZET	ix
ABSTRACT.....	xii
BÖLÜM 1	
GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.2 Tezin Amacı	2
1.3 Bulgular.	2
BÖLÜM 2	
2.1 Genel Bölüm.....	3
2.2 Gıda Katkı Maddelerinin Tanımı	5
2.3 Gıda Katkı Maddeleri Kullanım Amaçları	5
2.4 Katkı Maddelerinin Genel Sınıflandırılması	6
2.5 GKM İle İlgili Kısaca Tarihçe Ve Uluslararası Kurumlar	7
2.6 Tatlandırıcılar.....	13
2.6.1 Gıda Sanayinde Kullanılan Yapay Tatlandırıcılar ve Özellikleri. 13	
2.6.1.1 Asesülfam-K (Ace-K)	13
2.6.1.2 Aspartam (Asp)	17
2.6.1.3 Neohesperidin Dihidrokalmon(NHDC)	25
2.7 Yapay Tatlandırıcıları Destekleyen Maddeler	28
2.7.1 Sodyum Benzoat (SB)	27
2.7.2 Kafein	29
2.8 Tatlandırıcıların Gıdalarda Kullanım Alanları.....	31
2.8.1 Gazlı - Gazsız Alkolsüz İçecekler, Toz İçecek Karışımları ve Meyve Nektarları	33
2.9 Gıda Katkı Maddeleri ile İlgili Toksikolojik Değerlendirmeler	34

2.9.1	Limit Değerler.....	35
2.10	Katkı Maddelerinin Kullanılmasında Uyulması Gereken Kurallar	37
2.10.1	Etiketinde İlave Zorunlu Bilgiler Bulunması Gerekenler	38
2.11	Türkiye'deki Uygulamalar	39
2.12	Gıda Katkı Maddeleri ile İlgili Terminoloji	39
2.13	Gıda Maddelerinde Tatlandıcı Tayini İçin Numune Hazırlama	39
2.13.1	Gıda Örneklerini Hazırlamadaki Zorluklar	40
2.13.2	Örneğin Hazırlanması.	40
2.14	Tatlandırıcıların Tayinlerinde Kullanılan Analitik Yöntemler	45
2.14.1	Kantitatif Tayin Yöntemleri.....	47
2.14.1.1	Spektrofotometrik Yöntemler	47
2.14.1.2	Kromotografik Yöntemler	49
2.14.1.3	Diğer Yöntemler	55
2.15	Spektroskopik Yöntemlerle Miktar Tayini	57
2.16	Ultraviyole (UV) ve Görünür Bölge (VIS) Moleküler Absorpsiyon Spektroskopisi.....	58
2.16.1	Lambert-Beer Yasasından Sapmalar.....	61
2.16.2	UV-VIS Spektroskopisinin Uygulama Alanları.....	66
2.16.3	UV-VIS Spektroskopisini Etkileyen Etmenler	67
2.16.3.1	Absorbans Ölçümlerinin Hassasiyetini Etkileyen Faktörler	67
2.16.3.2	Absorbans Ölçümünün Doğruluğunu Etkileyen Faktörler.....	67
2.16.3.3	Absorbsiyon Spektrumunda Cihaz Kaynaklı Olmayan Etmenlerin Etkileri.	70
2.17	Türev Spektrofotometrisi	73
2.17.1	Türev Tekniğinin Gelişimi.....	73
2.17.2	Teorik Önemi	73
2.17.3	UV-VIS Türev Spektroskopisinin Alanları	76
2.17.4	Türev Alma ve Türev Spektrumu	76
2.17.5	Türev ve Çift Dalga Boylu Spektrofotometri	80
2.17.5.1	Fark Türev Spektrofotometrik Yöntem	81
2.17.5.2	Oran Türev Spektrofotometrik Yöntem.....	82
2.17.6	Uygulamaları	83
2.17.7	Türev Spektroskopisinin Avantajları ve Dezavantajları.....	84
2.18	Validasyon (Yöntem Doğrulaması)	85
2.18.1	Özgünlük.....	86
2.18.2	Doğrusallık	86
2.18.3	Konsantrasyon Aralığı	86
2.18.4	Doğruluk.....	87
2.18.5	Keskinlik	87
2.18.6	Dedeksiyon Limiti	88
2.18.7	Kantitatif Tayin.....	88
2.18.8	Standart Katma Yöntemi (SKY)	90

BÖLÜM 3

DENEYSEL BÖLÜM

3.1	Maddeler ve Çözücüler.....	92
3.2	Gereçler	92

3.3	Çözeltiler	91
3.4	Çalışma Yöntemi	93
3.4.1	Spektrumların Çizilmesi	93
3.4.2	Ölçü Eğrilerinin Çizimi	94
3.4.2.1	Ace-K, Asp, SB, Kaf Dörtlü Karışımı İçeren Örnekler (Cola -Pepsi-Bütçem) İçin Standart Eğrilerin Çizimi.	94
3.4.2.1.1	Oran Türev Spektrofotometrik Yöntem (Yöntem 1: iki bileşene bölme) İçin Ölçü Eğrilerinin Çizilmesi	94
3.4.2.2	Ace-K, Asp, NHDC Üçlü Karışımı İçeren Örnekler (Ülker- Link) İçin Standart Eğrilerin Çizimi	96
3.4.2.2.1	Oran Türev Spektrofotometrik Yöntem (Yöntem 1) İçin Ölçü Eğrilerinin Çizilmesi ..	96
3.4.2.2.2	Türev Spektrofotometrik Yöntem (Yöntem 2: iki bileşene bölme) İçin Ölçü Eğrilerinin Çizilmesi	98
3.4.3	Yöntemlerin Örneklere Uygulanması	99
3.4.4	Validasyon Çalışmaları	100
3.4.4.1	Standart Aspartam, Asesülfam-k, Sodyum Benzoat ,Kafein Ve NHDC Çözeltileri İçin Uygulanan Validasyon İşlemler	102
3.4.4.2	Coca Cola, Pepsi, Bütçem Ve Link Meyve Suyu Örneklerine Uygulanan Validasyon İşlemleri.	102

BÖLÜM 4

ŞEKİLLER VE ÇİZELGELER.....	105
4.1. Ace-K, Asp, SB ve Kaf Dörtlü Bileşenleri İçeren Karışımların Oran Türev Spektrofotometrik Yöntem (Yöntem 1) ile Analizi.....	105
4.1.1 Asesülfam-k Tayini.	106
4.1.2 Aspartam Tayini.....	109
4.1.3 Sodyum Benzoat Tayini.....	112
4.1.4 Kafein Tayini	112
4.2 NHDC, Asp ve Ace-K Üçlü Bileşenleri İçeren Karışımların Oran Türev... Spektroskopik Yöntem ile Analizi (Yöntem 1)	118
4.2.1 Neohesperidin Dihidrokalikon Tayini.....	118
4.2.2 Asesülfam-K Tayini.....	120
4.2.3 Aspartam Tayini.....	122
4.3 NHDC, Asp ve Ace-K Üçlü Bileşenleri İçeren Karışımların Türev Spektroskopik Yöntemi ile Analizi (Yöntem 2)	124
4.3.1 Asesülfam-K Tayini.....	124
4.3.2 Neohesperidin Dihidrokalikon Tayini.....	126
4.3.3 Aspartam Tayini.....	128
4.4 Validasyon Çalışmaları.....	130
4.4.1 Özgünlük Grafikleri	130
4.4.2 Tayin limiti (LOD) / Ölçüm limiti (LOQ) Değerleri	135
4.4.3 Gün İçi ve Gün Aşırı Ölçümler.....	137
4.4.4 Yüzde Verim Çalışmaları.....	143
4.4.5 Standart Katma Yöntemi.....	147
4.4.5.1 Oran Türev Spektrofotometrik Yöntemin Standart Katma ile Dört Bileşenli Karışıma Uygulanması (Yöntem 1) ..	147

4.4.5.2	Oran Türev Spektrofotometrik Yöntemin Standart Katma ile Üçlü Bileşenli Karışıma Uygulanması (Yöntem1) ..	155
4.4.5.3	Türev Spektrofotometrik Yöntemin Standart Katma (Yöntem 2) ile Üçlü Bileşenli Karışıma Uygulanması.	158
4.4.5.4	Örneklerin Analizi ve Standart Katma Yöntemi Sonuçları ile Karşılaştırılması.	163
BÖLÜM 5		
SONUÇ VE TARTIŞMA		168
5.1	Validasyon Çalışmaları	169
5.1.1	Uygun Koşulların Saptanması	169
5.1.2	Saf Tatlandırıcılara Ait Ölçü Eğrileri.....	170
5.1.3	Özgünlük.....	171
5.1.4	Gün İçi ve Gün Aşırı Ölçüm Değerleri	171
5.1.5	Tayin Limiti (LOD) / Ölçüm Limiti (LOQ)	172
5.1.6	Yüzde Verim Çalışmaları.....	172
5.1.7	Örneklerin Analizi ve Standart Katma Yöntemi Sonuçları ile Karşılaştırılması.....	172
KAYNAKLAR		175
ÖZGEÇMİŞ		182

SİMGE LİSTESİ

1D	Birinci derece türev absorbans değeri
2D	İkinci derece türev absorbans değeri
A	Absorbans
A	Absorbans
a	Absorptivite
A_{max}	Maksimum Absorbans
b	Doğrunun y Eksenini Kestiği Nokta
C	Konsantrasyon
I	Çıkan Işığın Şiddeti
I^0	Giren Işığın Şiddeti
l	Yol Uzunluğu
m	Eğim
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
nm	Nanometre
Q	Absorptivite oranı
RC	Resistans-Sığa Devresi
S	Hassasiyet
T	Transmitans
ϵ	Epsilon
ϵ	Molar Absorptivite
λ	Dalga Boyu
λ_{max}	Maksimum Dalga Boyu
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
μm	Mikrometre
σ	Sigma

KISALTMA LİSTESİ

ADI	Acceptable Daily Intake (Günlük alınmasına izin verilen miktar)
AEC	Akustik Yankı İptali (Acoustic Echo Cancellation)
AMA	American Medical Association (Amerikan Tıp Derneği)
BR	Britton Robinson
CAC	Codex Alimentarius Commission (Codex Alimentarius Komisyonu)
CC	Kolon Kromatografisi (Colon Chromatography)
CCC	Calorie Control Council (Kalori Kontrol Konseyi)
CE	Kapilar Elektroforez (Capillary Electrophoresis)
Corona CAD	Charged Aerosol Detector
CV	Varyasyon Katsayısı (Coefficient of variation)
FAO	Food and Agriculture Organization (Gıda ve Tarım Örgütü)
FDA	Food and Drug Administration (Gıda ve ilaç Dairesi)
FIA	Akış Enjeksiyon Analizi (Flow-Injection Analysis)
GC	Gaz Kromatografisi (Gas Chromatography)
HDL	Yüksek yoğunluklu lipoprotein (High-density lipoprotein)
HPLC	Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (High Pressure Liquid Chromatography)
HTST	High Temperature Short Time (Yüksek Sıcaklık Kısa Zaman)
JECFA	The Joint Expert Committee on Food Additives (Gıda Katkı Maddeleri Ortak Uzmanlar Komitesi)
kg	Kilogram
L	Litre
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein (Low-density lipoprotein)
LOD	Tayin Limiti (Limit Of Detection)
LOQ	Ölçüm Limiti (Limit Of Quantitation)
MERK	Misel Elektrokinetik Kromatografi
mg	Miligram
ml	Mililitre
MRL	Maksimum Kalıntı (Residue) Limiti
NCI	National Cancer Institute (Ulusal Kanser Enstitüsü)
ng	Nanogram

NHDC	Neohesperidin Dihidrokalon
NIH	National Institutes of Health (Ulusal Sağlık Enstitüleri)
nm	Nanometre
PCS	Foton Kolerasyon Spektroskopisi (Photon Correlation Spectroscopy)
ppb	Parts per miliar
ppm	Parts per milion
RSD	Bağıl Standart Sapma (Relative Standard Deviation)
SCF	Scientific Committee for Food (Gıda Bilimsel Komitesi)
SD	Standart Sapma
T	Sıcaklık (°C)
TLC	İnce Tabaka Kromatografi (Thin Layer Chromatography)
TSP	Trisodyum Fosfat
u	Belirsizlik
UHT	Ultra High Temperature (Ultra Yüksek Sıcaklık)
UV	Ultraviole
UV-DAD	Ultraviole –Diode Array Detector
UV-VIS	Ultraviyole-Görünür
WHO	World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2. 1 Tatlı tadın oluşmasını sağlayan moleküler sistem	4
Şekil 2. 2 Tatlı tadın oluşumu.....	4
Şekil 2. 3 Aspartamın sudaki çözünürlüğü-sıcaklık ilişkisi.	18
Şekil 2. 4 Aspartamın 200 °C deki stabilite profili	19
Şekil 2. 5 Bazı gıdaların aspartam bileşenleri içerikleri	23
Şekil 2. 6 UV-VIS Spektrofotometresi.	58
Şekil 2. 7 X Yönünde yol alan dalganın elektriksel ve manyetik alan bileşenleri, dalga boyu (λ).....	60
Şekil 2. 8 Elektromanyetik spektrum bölgeleri.	63
Şekil 2. 9 Tek Işık Yollu Spektrofotometre.....	63
Şekil 2. 10 Çift Işık Yollu Spektrofotometre.....	64
Şekil 2. 11 D ₂ , W, H ₂ ve Xe Lambalarının yaydıkları ışımının spektrumları	65
Şekil 2. 12 Kuvars Küvet	71
Şekil 2. 13 Cam Küvet	71
Şekil 2. 14 Üç pikin üst üste gelmesi.....	75
Şekil 2. 15 Fourier için bir eğri üzerindeki noktalar	76
Şekil 2. 16 Türev spektrofotometresi spektral eğri.....	78
Şekil 2. 17 Analitik bandın Gauss olarak hesaplanması	79
Şekil 2. 18 Türev spektrumlarının değerlendirilmesi	79
Şekil 2. 19 Bir kalibrasyon eğrisi grafiği ; cihaz responsu- konsantrasyon değişimi	87
Şekil 2. 20 Standart Ekleme Eğrisi.....	91
Şekil 4. 1 Saf Asp (yeşil, 5-25 µg/ml), ace-K (siyah, 2-10 µg/ml), kaf (kırmızı, 3-15 µg/ml), SB 'a (mavi,2-10 µg/ml) ait absorpsiyon spektrumları (Yöntem 1)..	105
Şekil 4. 2 SB (mavi, 2-10 µg/ml) ve ace-K (yeşil, 2-10 µg/ml) tatlandırıcılarına ait oran spektrumlarının 2. derece türev spektrumları ($\lambda_{\max}$: 223,3 nm) (Yöntem1).	106
Şekil 4. 3 Light Cola (pembe) ve dörtlü karışım içeren örneğin (sarı, 20 µg/ml asp; 8 µg/ml ace-K; 8 µg/ml kaf ,6 µg/ml asp) oran spektrumlarının 2. derece türev spektrumları ($\lambda_{\max}$: 223,3nm) (Yöntem 1)	106
Şekil 4. 4 Light Pepsı (turuncu) ve dörtlü karışım içeren örneğin (sarı, 20 µg/ml asp; 8 µg/ml ace-K; 8 µg/ml kaf, 6 µg/ml asp) oran spektrumlarının 2. derece türev spektrumları ($\lambda_{\max}$: 223,3 nm) (Yöntem 1).	107
Şekil 4. 5 Bütçem meyve suyu (turkuaz) ve dörtlü karışım içeren örneğin (sarı,10 µg/ml asp ; 6 µg/ml ace-K; 6µg/ml kaf, 8 µg/ml asp) oran spektrumlarının 2. derece türev spektrumları ($\lambda_{\max}$: 223,3 nm) (Yöntem 1)	107

Şekil 4. 6	Ace-K'ya ait ölçü eğrisi (223,3 nm)(Yöntem 1)	108
Şekil 4. 7	Ace-K (siyah, 2-10 µg/ml) ve asp (yeşil, 5-25 µg/ml) oran spektrumlarının 2. derece türev spektrumları (λ_{max} : 215,2 nm) (Yöntem 1)	109
Şekil 4. 8	Light Cola (pembe) ve dördtlü karışım içeren örneğin (sarı, 20 µg/ml asp, 10 µg/ml ace-K, 8 µg/ml kaf, 6 µg/ml SB) oran spektrumlarının 2. derece türev spektrumları (λ_{max} : 215,2 nm) (Yöntem 1)	109
Şekil 4. 9	Light Pepsi (turuncu) ve dördtlü karışım içeren örneğin (sarı, 20 µg/ml asp, 10 µg/ml ace-K, 8 µg/ml kaf, 6 µg/ml SB) oran spektrumlarının 2. derece türev spektrumları (λ_{max} : 215,2 nm) (Yöntem 1).	110
Şekil 4. 10	Bütçem (turkuaz) ve dördtlü karışım içeren örneğin (sarı, 20 µg/ml asp, 10 µg/ml ace-K, 8 µg/ml kaf, 6 µg/ml SB) oran spektrumlarının 2. derece türev spektrumları (λ_{max} : 215,2 nm) (Yöntem 1)	110
Şekil 4. 11	Asp'a ait ölçü eğrisi (215,2 nm) (Yöntem 1)	108
Şekil 4. 12	SB (mavi, 2-10 µg/ml) ve kaf (kırmızı, 3-15 µg/ml) oran Spektrumlarının 2. derece türev spektrumları (λ_{max} : 235 nm) (Yöntem 1)	112
Şekil 4. 13	Light cola (pembe) ve dördtlü karışım içeren örneğin (sarı, 20 µg/ml asp, 10 µg/ml ace-K, 8 µg/ml kaf, 6 µg/ml SB) oran spektrumlarının 2. derece türev spektrumları (λ_{max} : 235 nm) (Yöntem 1)	112
Şekil 4. 14	Light Pepsi (pembe) ve dördtlü karışım içeren örneğin (sarı, 20 µg/ml asp, 10 µg/ml ace-K, 8 µg/ml kaf, 6 µg/ml SB) oran spektrumlarının 2. derece türev spektrumları (λ_{max} : 235 nm) (Yöntem 1)	113
Şekil 4. 15	Bütçem meyve suyu (turkuaz) ve karışım (sarı, 20 µg/ml asp, 10 µg/ml ace-K, 8 µg/ml kaf, 6 µg/ml SB) oran spektrumlarının 2. derece türev spektrumları(λ_{max} : 232 nm) (Yöntem 1) Tayin edilemiyor.....	113
Şekil 4. 16	SB'a ait ölçü eğrisi (235 nm) (Yöntem 1)	114
Şekil 4.17	SB (mavi, 2-10 µg/ml) ve kaf (kırmızı, 3-15 µg/ml) oran spektrumlarının 2. derece türev spektrumları (λ_{max} : 243,5 nm)(Yöntem 1)	115
Şekil 4. 18	Light cola (pembe) ve dördtlü karışım içeren örneğin (sarı, 20 µg/ml asp, 10 µg/ml ace-K, 8 µg/ml kaf, 6 µg/ml SB) oran spektrumlarının 2. derece türev spektrumları (λ_{max} : 243,5 nm) (Yöntem 1)	115
Şekil 4. 19	Light Pepsi (pembe) ve dördtlü karışım içeren örneğin (sarı, 20 µg/ml asp, 10 µg/ml ace-K, 8 µg/ml kaf, 6 µg/ml SB) oran spektrumlarının 2. derece türev spektrumları (λ_{max} : 243,5 nm) (Yöntem 1)	116
Şekil 4. 20	Bütçem meyve suyu (turkuaz) ve dördtlü karışım içeren örneğin (sarı, 20 µg/ml asp, 10 µg/ml ace-K, 8 µg/ml kaf, 6 µg/ml SB) oran spektrumları-nın 2. derece türev spektrumları (λ_{max} : 243,5 nm) (Yöntem 1)	116
Şekil 4. 21	Kaf'e ait ölçü eğrisi (243,5 nm) (Yöntem 1).	117
Şekil 4. 22	Saf NHDC (kahverengi, 75-175 µg/ml), ace-K (siyah, 2-10 µg/ml) ve asp'a (yeşil, 5-25 µg/ml) ait absorpsiyon spektrumları (Yöntem 1)	118
Şekil 4. 23	NHDC ait oran spektrumunun 2.derece oran türev spektrumu (λ_{max} :267 nm) Asp 12 µg/ ml Kaf 4 µg/ ml SB 4 µg/ml Ace-K) ve SK2 (2 ml Örnek 10 µg/ ml Asp 6 µg/ ml Kaf 6 µg/ml SB 4 µg/ ml Ace-K)'nin oran türev spektrumlarının 2.türev spektrumları(Yöntem 2).	118
Şekil 4. 24	Link (pembe), üçlü karışım içeren örneğin (sarı, 125 µg/ml NHDC, 15 µg/ml asp, 10 µg/ ml ace-K) ait oran türev spektrumların 2.derece oran türev spektrumları (λ_{max} : 267 nm) (Yöntem 1)	119
Şekil 4. 25	NHDC'a ait ölçü eğrisi (267 nm) (Yöntem 1).	120
Şekil 4. 26	Ace-K 'ya ait oran spektrumunun 2.derece türev spektrumu (λ_{max} : 235nm) (Yöntem 1)	120

Şekil 4. 27	Link (pembe) ve üçlü karışım içeren örneğin (sarı, 125 µg/ml NHDC 15 µg/ml, asp 10 µg/ml, ace-K) ait oran spektrumlarının 2. derece oran türev spektrumları (235nm) (Yöntem 1)	121
Şekil 4. 28	Ace-K'ya ait ölçü eğrisi (235 nm) (Yöntem 1)	122
Şekil 4. 29	Asp 'a ait oran spektrumunun 3. derece oran türev spektrumu (λ_{max} : 216 nm) (Yöntem 1).	122
Şekil 4. 30	Link (pembe) ve üçlü karışım içeren örneğin (sarı, 125 µg/ml NHDC, 25 µg/ml asp, 6 µg/ml ace-K) ait oran spektrumlarının 3. derece oran türev spektrumları (λ_{max} : 216 nm) (Yöntem 1)	123
Şekil 4. 31	Asp 'a ait ölçü eğrisi (216 nm) (Yöntem 1)	124
Şekil 4. 32	NHDC (kahverengi, 75-175 µg/ml) , ace-K (siyah, 2-10 µg/ml) ve asp 'ın (yeşil, 5-25 µg/ml) 1. derece türev spektrumları (λ_{max} : 247,3 nm) (Yöntem 2)	124
Şekil 4. 33	Link (pembe) ve üçlü karışım içeren örneğin (sarı, 175 µg/ml NHDC, 25 µg/ml asp, 2 µg/ml ace-K) ait 1. derece ürev spektrumları (λ_{max} : 247,3 nm) (Yöntem 2) tayin edilemiyor	125
Şekil 4. 34	Ace-K 'ya ait ölçü eğrisi (247,3 nm) (Yöntem 2)	126
Şekil 4. 35	NHDC (kahverengi, 75-175 µg/ml) , ace-K (siyah, 2-10 µg/ml) ve asp 'ın (yeşil, 5-25 µg/ml) 2. türev spektrumları (240 nm) (Yöntem 2)	126
Şekil 4. 36	Link (pembe) ve üçlü karışım içeren örneğin (sarı, 175 µg/ml NHDC, 15 µg/ml asp, 2 µg/ml ace-K) ait 2. derece ürev spektrumları (Yöntem 2)	127
Şekil 4. 37	NHDC 'a ait ölçü eğrisi (240 nm) (Yöntem 2)	128
Şekil 4. 38	NHDC (kahverengi, 75-175 µg/ml) , ace-K (siyah, 2-10 µg/ml) ve asp 'ın (yeşil, 5-25 µg/ml) 3. derece türev spektrumları (λ_{max} : 227,5 nm) (Yöntem 2)	128
Şekil 4. 39	Link (pembe) ve üçlü karışım içeren örneğin (sarı, 75 µg/ml NHDC, 15 µg/ml asp, 10 µg/ml ace-K) ait 3. derece türev spektumları (Yöntem2).129	
Şekil 4. 40	Asp 'a ait ölçü eğrisi (227,5 nm) (Yöntem 2)	130
Şekil 4. 41	Sodyum Benzoat çözeltilerinin 1., 5., 10., 15. ve 20. güne ait absorpsiyon spektrumları	130
Şekil 4. 42	Aspartam çözeltilerinin 1., 5., 10., 15. ve 20. güne ait absorpsiyon spektrumları	131
Şekil 4. 43	Asesülfam-K çözeltilerinin 1., 5., 10., 15. ve 20. güne ait absorpsiyon spektrumları	131
Şekil 4. 44	Kafein çözeltilerinin 1., 5., 10., 15. ve 20. güne ait absorpsiyon spektrumları.....	132
Şekil 4. 45	Neohesperidin dihidrokalkon çözeltilerinin 1., 5., 10., 15. ve 20. güne ait absorpsiyon spektrumları	132
Şekil 4. 46	Light Pepsi çözeltisinin 1', 15', 30', 45', 60' ve 7.gün alınan absorpsiyon spektrumları	133
Şekil 4. 47	Light Cola çözeltisinin 1', 15', 30', 45', 60' ve 7.gün alınan absorpsiyon spektrumları	133
Şekil 4. 48	Bütçem çözeltisinin 1', 15', 30', 45', 60' ve 7. gün de alınan absorpsiyon spektrumları.....	134
Şekil 4. 49	Link çözeltisinin 1', 15', 30', 45', 60' ve 7.gün alınan absorpsiyon spektrumları	134
Şekil 4. 50	(a),(b),(c),(d) Dörtlü tatlandırıcı içeren karışımlarda analitlerin konsantrasyon değerlerinin konulan bulunan grafikleri (Yöntem 1)	144
Şekil 4. 51	(a),(b),(c),(d) Üçlü tatlandırıcı içeren karışımlarda analitlerin konsantrasyon değerlerinin konulan bulunan grafikleri (Yöntem 1)	145

Şekil 4. 52	(a),(b),(c) Üçlü tatlandırıcı içeren karışımlarda analitlerin konsantrasyon değerlerinin konulan bulunan grafikleri (Yöntem 2)	147
Şekil 4. 53	Light Cola (kırmızı) karışım (sarı) SK1 ve SK2 ‘nin oran spektrumlarının 2. derece türev spektrumları (Yöntem 1)	147
Şekil 4. 54	Asp için standart katma yönteminin kalibrasyon eğrisi(Yöntem 1)	148
Şekil 4. 55	Light Pepsi (kırmızı) karışım (sarı) SK 1 ve SK2’nin oran spektrumlarının 2. derece oran türev spektrumları (Yöntem 1)	148
Şekil 4. 56	Asp için standart katma yönteminin kalibrasyon eğrisi (Yöntem 1)	148
Şekil 4. 57	Bütçem (kırmızı) karışım (sarı) ,SK1 ve SK2 ‘nin oran türev spektrumlarının 2. derece oran türev spektrumları (Yöntem 1)	149
Şekil 4.58	Asp için standart katma yönteminin kalibrasyon eğrisi (Yöntem 1)	149
Şekil 4. 59	Light Cola (kırmızı) karışım (sarı) SK 1 ve SK2 ‘nin oran spektrumlarının 1. derece oran türev spektrumları (Yöntem 1).	150
Şekil 4. 60	Kaf için standart katma yönteminin kalibrasyon eğrisi (Yöntem 1)	150
Şekil 4. 61	Light Pepsi (kırmızı) karışım (sarı) SK 1 ve SK2 ‘nin oran spektrumlarının 2. derece oran türev spektrumları (Yöntem 1)	151
Şekil 4.62	Kaf için standart katma yönteminin kalibrasyon eğrisi (Yöntem 1)	151
Şekil 4. 63	Bütçem (kırmızı) karışım (sarı), SK 1 ve SK2’nin oran spektrumlarının 2. derece oran türev spektrumları (Yöntem 1)	152
Şekil 4. 64	Kaf için standart katma yönteminin kalibrasyon eğrisi (Yöntem 1)	152
Şekil 4. 65	Light Cola (kırmızı), karışım (sarı) SK ve SK2’nin oran spektrumlarının 2. derece oran türev spektrumları (Yöntem 1)	153
Şekil 4. 66	SB için standart katma yönteminin kalibrasyon eğrisi (Yöntem 1)	153
Şekil 4. 67	Light Pepsi (kırmızı), karışım (sarı) SK1 ve SK2 ‘nin oran spektrumlarının 2. derece oran türev spektrumları (Yöntem 1).	154
Şekil 4. 68	SB için standart katma yönteminin kalibrasyon eğrisi (Yöntem 1)	154
Şekil 4. 69	Light Cola (kırmızı), karışım (sarı) SK 1 ve SK2 ‘nin oran spektrumlarının 2. derece oran türev spektrumları (Yöntem 1)	155
Şekil 4. 70	Ace-K için standart katma yönteminin kalibrasyon eğrisi (Yöntem 1)	155
Şekil 4. 71	Light Pepsi (kırmızı), karışım (sarı) SK ve SK2 ‘nin oran spektrumlarının 2. derece oran türev spektrumları (Yöntem 1)	156
Şekil 4. 72	Ace-K için standart katma yönteminin kalibrasyon eğrisi (Yöntem 1)	156
Şekil 4. 73	Bütçem (kırmızı), karışım (sarı) ,SK1 ve SK2 ‘nin oran spektrumlarının 2.derece oran türev spektrumları (Yöntem 1).	157
Şekil 4. 74	Ace-K için standart katma yönteminin kalibrasyon eğrisi (Yöntem 1)	157
Şekil 4. 75	Link (kırmızı) karışım (sarı) ,SK 1 ve SK2 nin oran spektrumlarının 2. derece oran türev spektrumları (Yöntem 1)	158
Şekil 4. 76	Ace-K için standart katma yönteminin kalibrasyon eğrisi (Yöntem 1)	158
Şekil 4. 77	Link (kırmızı) karışım (sarı) ,SK1 ve SK2 oran spektrumlarının 2. derece oran türev spektrumları (Yöntem 1)	159
Şekil 4. 78	NHDC için standart katma yönteminin kalibrasyon eğrisi (Yöntem 1)	159
Şekil 4. 79	Link (Kırmızı) karışım (sarı) , SK1 ve SK2 ‘nin oran spektrumlarının 2. derece oran türev spektrumları (Yöntem 1)	160
Şekil 4. 80	Asp için standart katma yönteminin kalibrasyon eğrisi (Yöntem 1)	160
Şekil 4.81	Link (kırmızı), karışım (sarı, 175 µg/ml NHDC 25 µg/ml Asp 10 µg/ml Ace-K) ,SK1 ve SK2’nin türev spektrumlarının 2. derece türev spektrumları (Yöntem 2)	161
Şekil 4. 82	NHDC için standart katma yönteminin kalibrasyon eğrisi (Yöntem 2)	161

Şekil 4.83	Link (kırmızı) karışım (sarı, 175 µg/ml NHDC, 25 µg/ml asp, 10 µg/ml ace-K), SK1 ve SK2 ‘nin türev spektrumlarının 2. derece türev spektrumları (Yöntem 2)	162
Şekil 4. 84	Asp için standart katma yönteminin kalibrasyon eğrisi (Yöntem 2)	162

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 2. 1	Gıda katkı maddeleri ve E kodları 7
Çizelge 2. 2	Asesülfam-K günlük alınabilecek maksimum miktarları..... 14
Çizelge 2. 3	Farklı ısıtım yöntemlerinde aspartamın stabilitesi..... 20
Çizelge 2. 4	Enerjisi azaltılmış veya şeker ilavesiz alkolsüz içeceklerdeki maksimum Miktarlar..... 22
Çizelge 2.5	NHDC'nin kullanımına izin verilen gıdalar ve kullanılabilir maksimum Miktarlar 26
Çizelge 2. 6	Gıdalarda bulunan kafein miktarları 31
Çizelge 2. 7	Bazı önemli katkı maddelerinin NOAEL ve ADI değerler 36
Çizelge 2. 8	Etiket Bilgisi 38
Çizelge 2. 9	Yapay tatlandırıcıların analizinde kullanılan analitik yöntemler 44
Çizelge 2.10	Piyasada bulunan örneklere uygulanan metodlar..... 46
Çizelge 2.11	Cihaz harici absorpsiyon spektrumunu etkileyen etmenler ve bu etmenlerin sebep olduğu sorunlar 70
Çizelge 3.1	Coca cola ve pepsi numunelerine standart katma yönteminin uygulaması (Yöntem 1) 103
Çizelge 3.2	Bütçem meyve suyu için numunelerine standart katma yönteminin uygulaması (Yöntem 1) 103
Çizelge 3.3	Ülker Link meyve suyu için numunelerine standart katma yönteminin uygulaması uygulama miktarları (Yöntem 1) 104
Çizelge 3.4	Ülker Link meyve suyu için numunelerine standart katma yönteminin uygulaması (Yöntem 2) 104
Çizelge 4.1	223,3 nm dalga boyunda ace-K için elde edilen oran türev spektrofotometrik yöntemine ait ikinci derece türev absorbans ($^2D_{223,3}$), ortalama, SD, % RSD değerleri 108
Çizelge 4.2	Çizelge 4.1' e ait ölçü eğrinin regresyon analizlerine ait parametreler değerleri 108
Çizelge 4. 3	215,2 nm dalga boyunda asp için elde edilen oran türev spektrofotometrik yöntemine ait ikinci derece türev absorbans ($^2D_{215,2}$), ortalama, SD, % RSD değerleri..... 111
Çizelge 4. 4	4.3'deki ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait parametreler 111
Çizelge 4. 5	235 nm dalga boyunda SB için elde edilen oran türev spektrofotometrik yöntemine ait ikinci derece türev absorbans ($^2D_{235}$), ortalama, SD, % RSD değerleri..... 114
Çizelge 4. 6	4.5'deki ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait parametreler 114

Çizelge 4. 7	243,5 nm dalga boyunda kaf için elde edilen oran türev spektrofotometrik yönteme ait ikinci derece türev absorbans ($^2D_{243,5}$), ortalama, SD, % RSD değerleri.....	117
Çizelge 4. 8	4.7'deki ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait parametreler	117
Çizelge 4. 9	267 nm dalga boyunda NHDC için elde edilen oran türev spektrofotometrik yönteme ait ikinci derece türev absorbans ($^2D_{267}$), ortalama, SD, % RSD değerleri	119
Çizelge 4. 10	4.09'deki ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait parametreler	119
Çizelge 4. 11	235 nm dalga boyunda ace-k için elde edilen oran türev spektrofotometrik yönteme ait ikinci derece türev absorbans ($^2D_{235}$), ortalama, SD, % RSD değerleri.....	121
Çizelge 4. 12	4.11'deki ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait parametreler	121
Çizelge 4. 13	216 nm dalga boyunda asp için elde edilen oran türev spektrofotometrik yönteme ait üçüncü derece türev absorbans ($^3D_{216}$), ortalama, SD, % RSD değerleri.....	124
Çizelge 4. 14	4.13'deki ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait parametreler	124
Çizelge 4. 15	247,3 nm dalga boyunda ace-K için elde edilen türev spektrofotometrik yönteme ait birinci derece türev absorbans ($^1D_{247,3}$), ortalama, SD, % RSD değerleri..	125
Çizelge 4. 16	4.15'deki ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait parametreler	125
Çizelge 4. 17	240 nm dalga boyunda NHDC için elde edilen türev spektrofotometrik yönteme ait ikinci derece türev absorbans ($^2D_{240}$), ortalama, SD, % RSD değerleri.....	127
Çizelge 4. 18	4.17'deki ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait parametreler	127
Çizelge 4. 19	227,5 nm dalga boyunda asp için elde edilen türev spektrofotometrik yönteme ait 3. derece türev absorbans ($^3D_{227,5}$), ortalama, SD, % RSD değerleri.....	129
Çizelge 4. 20	4.19'deki ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait parametreler	129
Çizelge 4. 21	Dörtlü tatlandırıcı karışımında bulunan her bir analite oran türev yöntemin uygulanması ile yapılan 10 paralel çalışmada bulunan konsantrasyon, ortalama konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$), SD, % RSD , LOD ve LOQ değerleri	135
Çizelge 4. 22	Üçlü tatlandırıcı karışımında bulunan her bir analite oran türev yöntemin uygulanması ile yapılan 10 paralel çalışmada bulunan konsantrasyon, ortalama konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$) , SD, % RSD , LOD ve LOQ değerleri.....	135
Çizelge 4. 23	Üçlü tatlandırıcı karışımında bulunan her bir analite türev yöntemin uygulanması ile yapılan 10 paralel çalışmada bulunan konsantrasyon, ortalama konsantrasyon($\mu\text{g/ml}$), SD, % RSD , LOD ve LOQ değerleri	136
Çizelge 4. 24	Dörtlü tatlandırıcı karışımına oran türev spektrofotometrik yöntemin uygulanmasıyla <u>gün içi</u> alınan oran türev absorbans, ortalama, SD, % RSD değerleri.....	137
Çizelge 4. 25	Dörtlü tatlandırıcı karışımına oran türev spektrofotometrik yöntemin uygulanmasıyla <u>gün aşırı</u> alınan oran türev absorbans, ortalama, SD, % RSD değerleri.....	138
Çizelge 4. 26	Üçlü tatlandırıcı karışımına oran türev spektrofotometrik yöntemin uygulanmasıyla <u>gün içi</u> alınan oran türev absorbans, ortalama, SD, % RSD değerleri.....	139

Çizelge 4. 27	Üçlü tatlandırıcı karışımına oran türev spektrofotometrik yöntemin uygulanmasıyla <u>gün aşırı</u> alınan oran türev absorbens , ortalama, SD, % RSD değerleri.....	140
Çizelge 4. 28	Üçlü tatlandırıcı karışımına türev spektrofotometrik yöntemin uygulanmasıyla <u>gün içi</u> alınan oran türev absorbens, ortalama, SD, % RSD değerleri.....	141
Çizelge 4. 29	Üçlü tatlandırıcı karışımına türev spektrofotometrik yöntemin uygulanmasıyla <u>gün aşırı</u> alınan oran türev absorbens , ortalama, SD, % RSD değerleri.....	142
Çizelge 4. 30	Dörtlü standart karışım çözeltilere oran türev spektrofotometrik yöntemin uygulanmasıyla elde edilen yüzde verim değerleri (Yöntem 1)	143
Çizelge 4. 31	Üçlü standart karışım çözeltilere oran türev spektrofotometrik yöntemin uygulanmasıyla elde edilen yüzde verim değerleri (Yöntem 1)	144
Çizelge 4. 32	Üçlü standart karışım çözeltilere türev spektrofotometrik yöntemin uygulanmasıyla elde edilen yüzde verim değerleri (Yöntem 2)	146
Çizelge 4. 33	Light coca cola örneğinin analizi (Yöntem 1)	163
Çizelge 4. 34	Light pepsi örneğinin analizi (Yöntem 1)	164
Çizelge 4. 35	Bütçem meyve suyu örneğinin analizi (Yöntem 1)	165
Çizelge 4. 36	Link meyve suyu örneğinin analizi (Yöntem 1)	166
Çizelge 4. 37	Link meyve suyu örneğinin analizi (Yöntem 2)	167

**GIDA MATERYALLERİNDE SPEKTROFOTOMETRİK
YÖNTEMLERLE ÇOK BİLEŞENLİ YAPAY
TATLANDIRICILARIN BİRARADA TAYİNLERİ**

Handan ALTUN

Kimya Ana Bilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mahmure ÖZGÜR

Yapay tatlandırıcılar, koruyucular, boyalar lezzet ve görünümü geliştirmek için veya biyolojik bozunmayı önleyerek raf ömrünü uzatmak için oldukça yaygın olarak gıda maddelerine ilave edilirler. Kimyasal yöntemler ile sentezlenen çeşitli katkı maddelerinin gıda maddelerinde bulunması tüketicilerde güvensizliğe sebep olur. Yiyecek ve içeceklerin korunmasında kullanılan en yaygın gıda katkı maddeleri arasında benzoik asit ve bunun tuzları vardır. Bilinçli toplumlarda şeker yerine kullanılan yapay tatlandırıcılar hemen hemen hiç kalori içermezler ve aynı zamanda obezite ile ilgili rahatsızlarla mücadele etkin bir rol oynarlar. Geliştirilen yöntemler ile piyasadaki bazı ticari ürünlerin analizi yapılarak WHO ve Türk Gıda Kodeksi tarafından müsaade edilen miktarların yasal sınırlar içerisinde olup olmadıkları saptandı.

Diet içeceklerde şeker yerine kalorisiz asesülfam-K (ace-K) ve aspartam (asp) yapay tatlandırıcıları kullanılmaktadır. Bunların yanı sıra kafein ve sodyum benzoat (SB) içeceklerde kullanılan iki önemli katkı maddesidir. Sodyum benzoat içeceklerde bazı bakteri, maya ve küfün oluşmasını önlemek için kullanılır. Gıda endüstrisinde tüketicilere diet ürün seçimi ve gıda allerjisi uyarılarını yapabilmek için ürün etiketinde ve içerik bilgisinde her bir katkı maddesinin belirtilmesi gerekmektedir. Bu katkı maddelerinin tanımlanması ve miktar tayini için analitik methodlara ihtiyaç vardır.

Bu çalışmada içeceklerde bulunan SB, kaf, ace-K, asp ve NHDC'nin miktar tayini için ikili oran türev spektrofotometrik ve türev spektrofotometrik (the double divisor-ratio spectra ve derivate zero crossing) yöntemleri uygulanmıştır.

Geliştirilen ikili oran türev spektrofotometrik ve türev spektrofotometrik yöntemleri kullanılarak asp, ace-K, kaf, SB, NHDC içeren içeceklerde ve sentetik karışımlarda spektrofotometrik çoklu bileşen analizi yapılması amaçlanmıştır. Geliştirilen yöntemlerin doğruluğu standart ekleme yöntemi ve yüzde geri kazanım çalışmaları ile tespit edilmiştir.

Türev spektrofotometrik ve oran türev spektrofotometrik yöntemleri çok bileşenli karışımların analizi için çok büyük bir role sahiptir ve bu yöntemler ile herhangi bir ayırma işlemine gerek kalmadan üçlü boya karışımların analizi yapılabilir. Bu yöntemlerden elde edilen bulgular doğruluk ve presizyon yönünden t ve F testleri yardımıyla %95 güvenilirlik düzeyinde istatistiksel olarak karşılaştırıldı ve uygulanan yöntemler değerlendirildi. t ve F değeri ilgili güven düzeyi ve üç deneme için verilen tablo değerlerinden küçüktür. Yöntemler için validasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Yüzde verim çalışmalarının her bir yöntemde %98,7-103 aralığında sonuçlar verildiği görüldü. Her bir karışım için standart çözeltiler ve numunelerde standart sapma, bağlı standart sapma değerleri hesaplandı. Hesaplanan LOD ve LOQ değerleri LOD : 0,16 µg/ml-0,81 µg/ml ; LOQ:0,54 µg/ml - 2,71 µg/ml arasında bulunmuştur. Her bir değerin alt sınır konsantrasyona eşit veya alt sınır konsantrasyondan küçük olduğuna dair değerler elde edildi. Geliştirilen metodların uygulanabilirliği ve kantitatif analiz için kullanılabilirliği öngörülmüştür.

Anahtar Kelime: Diyet içecekler, Aspartam, Asesülfam-K, Kafein, Benzoik asit, Neohesperidin Dihidrokalbon, Türev yöntemi, Oran Türev yöntemi.

ABSTRACT

SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF ARTIFICIAL MULTI SWEETENERS IN SOME FOODS BY SPECTROPHOTOMETRIC METHODS

Handan ALTUN

Department of Chemistry

MSc. Thesis

Adviser: Prof. Dr. Mahmure ÖZGÜR

Artificial sweeteners, preservatives and dyes are rather widely added to foodstuffs, either to enhance their flavour and appearance or to extend their shelf-life by preventing biological degradation. Since several of these additives are prepared by chemical synthesis, their presence in foods is the cause of an extensive consumer's mistrust, in that they may exhibit adverse health effects. Among the commonly used additives, benzoic acid and its salts are widely used in beverage and food for preservation. Artificial sweeteners are widely used as sugar substitute in calorie-conscious societies, where their intake provides practically no calories and also helps fight obesity and its related ailments. In most countries, the use of additives is regulated. In some commercial products on the market by analyzing the methods to be developed with the WHO and the amount allowed by the Turkish Food Codex determined whether they were within legal limits. Dietetic soft drinks use calorie-free artificial sweeteners to replace sugar. For diet beverages, aspartame (asp), acesulfame-k (ace-K), are used as calorie-free substitute, for sugar. caffeine (caf) and sodium benzoate (SB) are two important ingredients in soft drinks. sodium benzoate is used to preserve the beverage by inhibiting the growth of yeasts, mold, and some bacteria. There is a need for analytical techniques to identify and quantify additives because the food industry is required to list the type and amount of each ingredient on product labels to help consumers make dietary choices and manage food allergies.

This work presents the double divisor-ratio spectra derivative-zero crossing method used for the determination of Aspartame, Acesulfame- K, Caffeine, Sodium Benzoate, in dietetic drinks. The proposed method based on the double divisor-ratio spectra derivative-zero crossing was proposed for the spectrophotometric multi component analysis of synthetic mixtures and cola drinks containing Aspartame and Acesulfame-K, Caffeine and Sodium Benzoate, in the presence of strongly overlapping signals without any chemical separation. The proposed method is based on the use of derivative signals of the ratio spectra by using double divisor. The proposed method was successfully applied to the simultaneous determination of asp, ace-K, caf and SB by using synthetic quaternary mixtures with different concentration ranges and cola drinks. The reliability of the method was further ascertained by recovery studies via standard addition procedure.

Two simple spectrophotometric methods have also been proposed for simultaneous determination of three sweeteners (Acesulfame-K, Aspartame, Neohesperidine Dihydrochalcone) in synthetic mixtures and commercial soft drinks without any prior separation or purification. The method derivative spectrophotometry is based on recording the first for Ace-K, second for NDHC, third for Asp derivative curves and determining each component using the zero-crossing technique.

Two separate methods for the determination of the spectrophotometric method was developed and the findings of these methods in terms of accuracy and precision with the help of t and F tests were compared with 95% confidence level, statistically evaluated and the methods applied. t value of the confidence level and three trial values of the table is small. Also F value of the confidence level and three trial values of the table is small. Validation studies carried out for all methods. The result of efficiency studies percent; $98,7 \pm 103$. Each standard and sample standard deviation and relative standard deviation values were calculated. As indicated LOD and LOQ values, LOD values were between $0,16 \mu\text{g/ml}$ - $0,81 \mu\text{g/ml}$ and LOQ values were between $0,54 \mu\text{g/ml}$ - $2,71 \mu\text{g/ml}$. The methods have successfully applied to the determination of the four and three sweeteners in soft drinks and preserved beverages.

Keywords: Dietetic soft drinks, Sweetener, Caffeine, Sodium Benzoate, Aspartame, Acesulfame-K, Neohesperidine Dihydrochalcone, Double Divisor-Ratio Spectra Derivative-Zero Crossing method

GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Ülkemizde kullanımı uygun görülen gıda katkı maddeleri CAC ve EC tarafından oluşturulan listelerden titizlikle seçilmektedir. Gıda katkı maddeleri gıdalarda mikrobiyolojik bozulmayı önleme ve dayanıklılığı artırma, besleyici değeri koruma, teknolojik işlemlere yardımcı olma, renk, görünüş, lezzet, koku gibi duyuşal özellikleri düzeltme gibi pek çok amaçla katılan maddelerdir.

Türk Gıda Kodeksi yönetmeliğinde gıda katkı maddeleri; "Tek başına gıda olarak tüketilmeyen veya gıda ham veya yardımcı maddesi olarak kullanılmayan, tek başına besleyici değeri olan veya olmayan seçilen teknoloji gereğı kullanılan işlev veya imalat sırasında kalıntı veya türevleri mamul madde bulunabilen, gıdanın üretilmesi, tasnifi, işlenmesi, hazırlanması, ambalajlanması, taşınması, depolanması sırasında gıda maddesinin tat, koku, görünüş, yapı ve diğere niteliklerini korumak, düzeltmek veya istenmeyen değışikliklere engel olmak ve düzeltmek amacıyla kullanılan maddeler" olarak tanımlanmaktadır.

Türk Gıda Kodeksi yönetmeliğinde 300 civarında gıda katkı maddesinin çeşitli gıdalarda ve ilaçlarda değışen miktarlarda kullanılmasına izin verilmiştir. FDA(Food and Drug Administration-Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi)in bugüne kadar kullanımına onay verdiği gıda katkı maddesi yaklaşık 2800'dir.

Gazlı-gazsız alkolsüz içeceklerde, toz içecek karışımlarında, meyve nektarları, diyabetik amaçlı düşük kalorili tatlılarda, aromalandırılmış sütlerde, meyveli yoğurtlar da kullanılan tatlandırıcıların analizleri için farklı kromatografik ve spektroskopik yöntemler uygulanmıştır. Bu yöntemler Bölüm 2.14.1'de sınıflandırılarak bahsedilmiştir.

1.2 Tezin Amacı

Bu çalışmada çoklu tatlandırıcı içeren renkli piyasa ürünlerin de (kola ve meyve suyu) bulunan SB, kaf, ace-K, asp ve NHDC'nin miktar tayini ve analizi için ikili oran türev spektrofotometrik ve türev spektrofotometrik (the double divisor-ratio spectra ve derivate zero crossing) yöntemlerinin uygulanması ve geliştirilmesi amaçlanmıştır [1]. Standart katma yöntemi ile yöntemlerin kullanılabilirliğinin ortaya konması ve analizin hızlı, kolay, pratik olması sebebiyle bu yöntemlerin geliştirilmesi uygun görülmüştür. Özellikle yapay tatlandırıcıların bu kadar riskli olması ve dozlarının iyi ayarlanması gerektiğinden, sanayi için gıda maddelerindeki tatlandırıcıların tayinleri için basit, hızlı ve ucuz yöntemler gerekmektedir. Bu çalışmada geliştirilecek olan yöntemlerin bu alanda yapılacak olan yeni çalışmalara ışık tutması amaçlanmıştır.

1.3 Bulgular

Bu çalışmada, piyasada bulunan ve incelenecek olan gıda preparatları saptanmıştır. Geliştirilen yöntemlerin örneklere uygulanabilirliğinin araştırılması amacı ile çalışılacak dörtlü kombinasyonları içeren farklı ürünlerin araştırılması yapıldı. Çalışılacak tatlandırıcıların Aspartam, Asesülfam-K, Neohesperidin Dihidrokalbon, Kafein, Sodyum benzoat temini ile bu katkı maddelerinin çözündüğü ve stabil kaldığı uygun çözücü ortamı saptandı. Tatlandırıcıların farklı çözücü ortamlarında alınan spektrumları incelenerek en uygun çözücü saptandıktan sonra gıdalarda bulunan oranları da göz önüne alınarak spektrumlar çizildi ve çalışılacak standart eğri konsantrasyon aralıkları bulundu. Türev ve oran türev spektrofotometrik yöntemine göre oluşturulan standart eğriler üzerinde gerekli hesaplamalar yapıldı. Geliştirilen yöntemlerin doğruluk ve tekrarlanabilirliklerini saptamak amacıyla çeşitli validasyon parametreleri (seçicilik, kesinlik ve hassasiyet açısından) kıyaslamaları yapılarak üzerinde çalışılan gıda numunelerinde tatlandırıcıların farklı yöntemlerle nitel ve nicel olarak saptanmıştır. Yöntemlerden elde edilen bulgular doğruluk ve presizyon yönünden t ve F testleri yardımıyla %95 güvenilirlik düzeyinde istatistiksel olarak karşılaştırıldı ve uygulanan yöntemler değerlendirildi. t ve F değerleri ilgili güven düzeyi üç deneme için verilen tablolardaki sınır değerleri içerisinde olduğu görülmüştür. Her bir yöntem için standart sapma ve bağıl standart sapma hesaplamaları yapılarak LOD değeri için standart sapmanın üç katı, LOQ değeri için standart sapmanın on katı alındı. Her bir değer için alt sınır konsantrasyona eşit veya alt sınır konsantrasyondan küçük olduğu belirlendi.

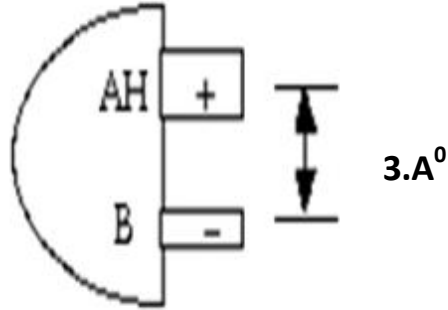
GİRİŞ

2.1. Genel Bölüm

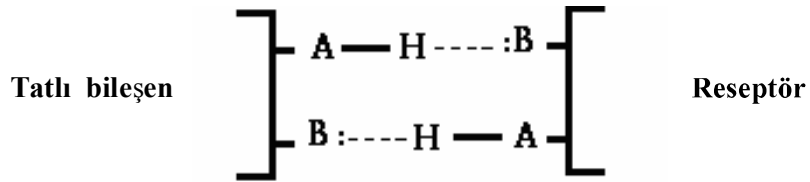
Günümüzde şeker ve şeker içeren gıda maddelerinin tüketimindeki hızlı artış, uzun dönem sonra bazı sağlık problemlerinin ortaya çıkmasına neden olmuştur. Yüksek oranda şeker tüketiminin insanlarda diş çürümelerine, aşırı şişmanlamaya, kalp hastalıklarına sebep olduğu, ayrıca doğal şekerin kan şekerini hızla arttırdığı ve buna bağlı olarak diyabetli hastalarda zararlı etkiler oluşturduğu görülmüştür [2]. İnsan sağlığını önemli ölçüde tehdit eden bu hastalıkların tedavisi için, medikal tedavinin yanı sıra bilinen en etkili yol, aktivitenin arttırılmasıyla birlikte diyetlerin düzenlenmesidir. Bu hastalıkların tedavisi için hastaların diyetlerinde şeker ve şekerli yiyeceklerin tüketimini kısıtlama yoluna gidilir. Bunun sonucunda doğal şekerler, bazı durumlarda yerlerini tatlandırıcılara bırakmak zorunda kalmıştır [3].

Maddelerin kimyasal yapısı ve tatlılık arasındaki ilişki konusunda pek çok araştırmacı tarafından öne sürülen değişik teoriler bulunmaktadır. Bazı araştırmacılar, 1967 yılında bu teorileri ele alarak ve birleştirerek yeni bir teori ortaya çıkarmışlardır. AH-B olarak ifade edilen söz konusu teoriye göre tatlı tadın oluşması için aralarında 0,3 mm mesafe bulunan proton verici ve proton kabul edici özellikleri olan bir moleküler sisteme gereksinim bulunmaktadır. Tatlı tadın oluşması için gereken moleküler sistem Şekil 2.1’ de şematize edilmiştir. Bu nedenle tatlı tadı veren tüm bileşikler oksijen veya azot gibi bir elektronegatif atom (A) içermektedirler. Bu atom aynı zamanda kendisine tek bir kovalent

bağ ile bağlı bir proton da içerdiğinden AH bir hidroksil, bir imin veya amin, veya bir metil grubunu temsil edebilmektedir. AH protonunun $3\text{\AA}$ uzağında ise genellikle oksijen veya azottan oluşan ikinci bir elektronegatif B atomu yer almalıdır. Bir maddenin tatlılık özelliğinin ise söz konusu AH-B sisteminin tat reseptör hücrelerinin membranında yer alan uygun bir sistemle temasa geçtiğinde oluştuğu öne sürülmektedir. Şekil 2.2’de tatlı tadın oluşumu şematize edilmiştir. Gruplar arasındaki mesafede ve elektronik yapıda oluşan değişimler tatlılık özelliğinin oluşmasını sağladığı gibi bazen genel tat algısını değiştirerek tatlılığı tamamen ortadan kaldırmakta veya acılığa da çevirebilmektedir [4].



Şekil 2.1 Tatlı tadın oluşmasını sağlayan moleküler sistem



Şekil 2.2 Tatlı tadın oluşumu

2.2 Gıda Katkı Maddelerinin Tanımı

Gıda katkı maddeleri gıdalarla mikrobiyolojik bozunmayı önleme ve dayanıklılığı arttırma, besleyici değerini koruma, teknolojik işlemlere yardımcı olma, renk, görünüş, tat doku gibi duyuşal özellikleri düzeltme gibi pek çok amaçla katılan maddelerdir.

Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliğinde gıda katkı maddeleri “ tek başına gıda olarak tüketilmeyen veya gıda ham veya yardımcı maddesi olarak kullanılmayan, tek başına besleyici değeri olan veya olmayan; seçilen teknoloji gereği kullanılan işlem veya imalat sırasında kalıntı veya türevleri mamül maddede bulunabilen, gıdanın üretilmesi, tasnifi, işlenmesi, hazırlanması, ambalajlanması, taşınması, depolanması sırasında gıda maddesi-nin tat, koku, görünüş, yapı ve diğer niteliklerini korumak, düzeltmek veya istenmeyen değişikliklere engel olmak ve düzeltmek amacıyla kullanılan maddeler” olarak tanımlanmaktadır.

Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği’nde 300 civarında gıda katkı maddesinin çeşitli gıdalarda değişen miktarlarda kullanılmasına izin verilmiştir. FDA (Food and Drug Administration-Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi) in bugüne kadar kullanımına onay verdiği gıda katkı maddesi sayısı yaklaşık 2800’dür. Ancak bugün bunların önemli bir bölümü daha uygun alternatifleri bulunduğu için teknik sebeplerle kullanılmamaktadır. Avrupa Birliği’nde kullanımına onay verilen gıda katkı sayısı 297 dir [5].

2.3 Gıda Katkı Maddeleri Kullanım Amaçları [3]

1. Kaliteyi koruyarak raf ömrünü uzatanlar (Koruyucular)

- a. Antimikrobiyaller (nitrit, nitrat, benzoik asit, propionik asit)
- b. Antioksidanlar (BHA, BHT, sorbik asit, kükürt dioksit) Gıdalarla alınan en önemli antioksidanlar: betakaroten, E ve C vitaminleridir.

2.Yapıyı ve hazırlama, pişme özelliğini geliştirenler

- a. pH ayarlayıcılar
- b. Topaklanmayı önleyenler (silikat, magnezyum oksit, magnezyum karbonat)
- c. Nem ayarlayıcılar
- d. Mayalanmayı sağlayıcı ajanlar

- e. Nem ayarlayıcılar
- f. Olgunlaştırıcılar
- g. Ağartıcılar, dolgu maddeleri, köpük ayarlayıcılar, parlaticılar
- h. Stabilizörler, kıvam arttırıcılar, tatlandırıcılar

3.Aromayı ve rengi geliştiriciler

- a. Çeşni arttırıcılar (MSG)
- b. Çeşni vericiler (aroma maddeleri)
- c. Renklendiriciler (tartrazin, indigotin)

4. Besin değerini koruyucu, geliştiriciler (besin öğeleri)

- a. Diyetle eksik olabilecek besin öğelerini ekleme (A, D vitaminleri)
- b. İşleme sırasında kaybolan besin öğelerini yerine koyma (B1, B2, niasin)

İlgili AB direktiği, 24 farklı kategorideki gıda katkı maddesini kapsamaktadır:

1. Antioksidanlar	9. Hacim Arttırıcılar	17. Nem Tutucular
2. Aroma Arttırıcılar	10. İtici Gazlar	18. Parlaticılar
3. Asitler	11. Jelleştirme Ajanları	19. Renklendiriciler
4. Asitlik Düzenleyici.	12. Kabartıcılar	20. Sertleştiriciler
5. Ayırıcılar	13. Kıvam Arttırıcılar	21. Stabilizatörler
6. Emülgatörler	14. Koruyucular	22. Tatlandırıcılar
7. Emülgatör Tuzlar	15. Köpüklenmeyi Önle.	23. Topaklanmayı Ö.
8. Enzimler	16. Modifiye Nişasta	24. Un İşleme

2.4 Katkı Maddelerinin Genel Sınıflandırılması [2]

E kodu nedir?

Gıda katkı maddelerini tanımlamak ve herhangi bir karışıklığa yol açmamak için kullanılan Avrupa Birliği'nin (EC) simgesi olarak E harfi ve üç rakamlı sayıdan ibaret kodlardır. Bu kodlar Avrupa Birliği'nin "Gıda Bilim Komitesi" tarafından her katkı maddesi için belirlenir. Doğal veya sentetik olsun gıda maddelerinde kullanılan ve katkı maddesi olarak tanımlanan tüm kimyasallar bu kodlama sisteminin içindedir.

Ülkemizde de kullanılan E-kodları Avrupa Birliği'nin ilgili sağlık/gıda otoritelerinin gerekli güvenlik testlerinden geçmiş ve tüm spesifikasyonu belirlenmiş gıda katkılarına verilen kodları gösterir. Bir güvenliğin ifadesidir. Bu kodlarda her yüzölçüm grup bir kullanım grubunu temsil eder (100-199 arası renklendiriciler, 200-299 koruyucular gibi). Avrupa Birliği tarafından toplam 329 katkı maddesine E-kodu verilmiştir.

Çizelge 2.1.Gıda katkı maddeleri ve E kodları[2]

Gıda katkı maddesi	E kodu
Renklendiriciler	E100 – E180
Koruyucular	E200 – E285,
Antioksidanlar	E300 – E321
Kalınlaştırıcı,	E400 – E495
Tatlandırıcılar	E950 – E959

2.5 GKM İle İlgili Kısaca Tarihçe Ve Uluslararası Kurumlar [6]

19. yüzyılda sanayileşmenin başlamasıyla birlikte gıda katkı maddelerinin kullanımında da artış görülmüş ve bu yüzyılda gıdalara katılmaya başlayan benzoik asit, sodyum karbonat, sakarin gibi maddeler günümüzde de kullanımı son derece yaygın maddeler arasına girmiştir. Katkı maddelerinin sistematik bir şekilde ilk ele alınması ise 1956'da WHO ve FAO tarafından, 43 dünya ülkesini kapsayan bir tarama çalışması ile gerçekleşmiştir. Bu çalışmada 200'e yakın kimyasal maddenin gıda maddelerinde bu amaçla kullanımda olduğu tespit edilmiştir.

Gıda üretiminin güvenlik yönünden standartlaştırılması ve güvenli gıda tüketimi dünya ölçeğinde bir konudur. Bu ihtiyaçtan yola çıkılarak aşağıdaki uluslararası yapılanmalar oluşturulmuştur

a) Kodeks Alimentarius Komisyonu (Codex Alimentarius Commission) [7]

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Gıda ve Tarım Organizasyonu (FAO) tarafından oluşturulan Kodeks Alimentarius Komisyonu 1963 yılında kurulmuştur. Bugün üye ülke sayısı 180 'e ulaşmıştır. Kuruluşun görevi dünyada gıda ile ilgili uygulamalarının sağlık ve teknoloji yönünden standartlaştırılmasıdır. Kuruluşun bu amaçla hazırladığı dokümanlar tüm dünya ülkeleri için güvenli gıda üretiminde referans olarak

kullanılmaktadır. Kodeks standartları ülkeler için uygulanması zorunlu standartlar değildir. Ancak ülkeler ulusal standartlarını hazırlarken kodeks standartları dikkate alırlar. Kodeks Alimentarius çalışmalarını 20 komiteyle sürdürür. Bu komitelerin çalışma grupları dünyada konunun en yetkin bilim insanlarından oluşturulur.

Kodeks tarafından oluşturulan standartların, dünyada gıda güvenliği sağlamasına ek olarak ülkeler arasındaki gıda ticaretinde bilim dışı suni engellerin önlenmesi gibi de bir yararı da vardır. 1995 yılında Dünya Ticaret Örgütü (WTO)'nün kurulmasının ardından yürürlüğe giren “The WTO Agreement on the Application of Sanitary and Phytosanitary Measures (SPS)” ve “The Agreement on Technical Barriers to Trade (TBT)” gibi uluslararası antlaşmalarda gıda ile ilgili düzenlemeler için Kodeks Alimentarius Standartları referans olarak alınmıştır.

b) JECFA (The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives-Gıda Katkıları FAO/WHO Ortak Uzmanlar Komitesi) [8]

JECFA, 1956 yılından beri gıda katkı maddelerinin insan sağlığı yönünden değerlendiril-mesi için toplanan FAO / WHO ortak uzmanlar komitelerine verilen isimdir. Bu komiteler gündemlerine aldıkları gıda katkı maddeleri için tüm bilimsel verileri inceleyerek değerlendirmeler yapmakta ve yukarıda açıklanan metodoloji ile ADI değer-lerini tespit etmektedirler. Komiteler çalışmalarına gıda kontaminantları ve veteriner ilaçlarını da alarak yine yukarıda açıklanan metodolojiyi kullanarak ADI ve maksimum kalıntı limitlerini (MRL) oluşturmaktadır. JECFA bugüne kadar 1500 gıda katkı maddesi, 40 gıda kontaminantı ve gıda doğal kimyasal ve 90 veteriner ilacı risk bazlı değerlendirmiştir. Bu değerlendirmeler monograflar şeklinde yayınlanmaktadır.

JECFA'nın görevleri

1. Katkı maddelerinin toksikolojik değerlendirmeleri için metodolojileri belirler.
2. Toksikolojik değerlendirmeleri yürütür (ya da yürüttür) ve sonuçlarını değerlendirerek sakıncasızca alınabilecek dozları (ADI) belirler.
3. Her katkı maddesi için spesifikasyonları, saflık kriterlerini ve analiz yöntemlerini belirler.
4. Yaygın gıda tüketim taramalarından çeşitli toplumlarda gıda katkı maddelerinin günlük yıllık tüketim düzeylerini belirler ve değerlendirir.

ADI değerinin dışında JECFA tarafından bazı katkıları özelliklerine göre aşağıdaki tanımlamalar da getirilmektedir.

ADI NOT SPECIFIED (ADI Değeri Belirtilmemiş) : Eldeki kimyasal, toksikolojik ve diğer verilere göre çok düşük toksisitesi olan ve teknolojik kullanım limitlerinde JECFA'ya göre insan sağlığı üzerinde zararlı etkisi olmayan katkılar bu gruptadır. Mevcut bilgilerin ışığında en güvenli katkılardır ve ADI değeri tespitine gerek duyulmamıştır. Bu tanımdan bu katkıların herhangi bir limit olmadan kullanılması, gibi bir sonuç çıkartılmamalıdır. Söz konusu katkının gıdalardaki teknolojik kullanım miktarları tüketimi sınırlar. Örneğin, sodyum karbonat, sodyum sitrat, karamel, monosodyum glutamat (MSG), karrageenan ve emülsiyon yapıcı katkılar bu gruptadır.

NO ADI ALLOCATED (ADI Değeri Tayin Edilmemiş) JECFA incelemesinde katkının:

- a) Güvenlik verileri yeterli değilse
- b) Kimyasal kirlilik dâhil spesifikasyonu yeterli ölçüde belirlenmemişse
- c) Gıdada kullanımı güvenli bulunmaz ise, bu katkı "NO ADI ALLOCATED" grubuna alınır. Bu gruptaki katkılara uygulanması için izin verilmez.

GROUP ADI (Grup ADI): Yüksek dozları aynı yönde toksik etki gösteren katkılar için grup ADI değeri tespit edilir. Bu gruptaki katkıları tüketim miktarları toplamı, Grup ADI değerini geçmeyecektir. Örneğin, potasyum nitrit ve sodyum nitrit için grup ADI değeri verilmiştir. Grup ADI değeri verilen çok sayıda katkı grubu mevcuttur.

TEMPORARY ADI (Geçici ADI): Eğer bir gıda katkısı için yeni bir bilimsel veri üretilmişse ve bu veri gıda katkısının güvenliği konusunda bir tereddüt yaratırsa katkı geçici bir süre için daha yüksek örneğin 100 yerine 200 güvenlik faktörü uygulanarak (ADI değeri düşürülerek) bu gruba alınır. Söz konusu katkı hakkında, yoğun çalışmalar yapılır ve çalışmaların sonuçlarına göre kesin değerlendirmeye gidilir. Bu değerlendirme sonucuna göre katkının kullanımı yasaklanabilir veya ADI değeri düşürülerek kullanımı kısıtlanabilir. Bir diğer olasılık da çalışmalar sonucunda söz konusu katkı üzerindeki kuşkuların ortadan kalkmasıdır. Bu durumda başlangıçtaki ADI değeri korunarak kullanıma devam edilir.

Bir katkının «Geçici ADI Listesi» ne alınmasını bir örnekle inceleyelim; Kantaksantin

bazı bitki ve hayvanlarda bulunan portakal-kırmızı renkte bir renk pigmentidir. Bu özelliği nedeniyle doğal bir boya olarak gıdalarda kullanılır. JECFA kantaksantin için ADI değerini 1974 yılında 25 mg/kg olarak tespit etmiştir. Kantaksantin aynı zamanda dermatolojide eritropoetik porfiriya tedavisinde ve kozmetolojide güneş yanığı oluşumunu arttırıcı olarak günde 30-120 mg (0.5-2.0 mg/kg) dozda kullanılmaktaydı. Dermatolojik ve kozmetik amaçla kantaksantin kullananların retinalarında pigmentasyon tespit edilmesi üzerine, bu katkı 1987 yılında JECFA tarafından tekrar değerlendirildi. Bu değerlendirme sonucunda ADI değeri 0.05 mg/kg'a düşürülerek "Geçici ADI" listesine alındı. Daha önceleri, şekerlemeler, içecek tozları, alkolsüz içecekler ve sakızlarda kullanılmasına izin verilen kantaksantin kullanımı bugün son derece kısıtlanmıştır. «Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği»ne göre kantaksantin yalnızca Strazbourg sosisi olarak adlandırılan üründe 15 mg/kg dozda kullanılmasına izin verilmektedir.

MTDI: MAXIMUM TOLERABLE DAILY INTAKE (Günlük Alınmasına İzin Verilen "Zararsız Kabul Edilebilir" Miktar): Vücutta birikme özelliği olmayan kontaminantlar için konulmuş olan limit değeri ifade eder.

TWI: TOLERABLE WEEKLY INTAKE (Haftalık Alınmasına İzin Verilen "Zararsız Kabul Edilebilir" Miktar) : Vücutta Birikme özelliği olan kontaminantlar örneğin bazı ağır metaller ve dioksinler gibi klorlu bileşikler için konulmuş olan limit değeri ifade eder.

TDI: TOLERABLE DAILY INTAKE (Günlük Alınmasına İzin Verilen "Zararsız Kabul Edilebilir" Miktar) : Kontaminantlar için kullanılan TWI benzeri bir limit değeri ifade eder.

ALARA: AS LOW AS REASONABLY ACHIEVABLE (Ulaşılabilecek En Düşük Seviye): Gıdalara kaçınılmaz olarak bulaşan aflatoksinler gibi bazı genotoksik ve karsinojenik özellikteki kontaminantlar için her ne kadar MRL değerleri saptanırsa da bu değerlerin insanı koruduğu bilimsel olarak savunulamaz. Örneğin aflatoksin B1 bilinen en kuvvetli kanser yapıcı maddeler arasındadır ve çeşitli gıdalarda aflatoksinler için MRL değerleri saptanmıştır. Ancak gıdalardaki bu değerlerin altında aflatoksin miktarlarının insan sağlığına zararsız olduğu iddia edilemez. Bunun nedeni genotoksik ve karsinojenik etkinin özelliğinden kaynaklanmaktadır. Her ne kadar karsinojenik etkide de bir doz-cevap ilişkisi söz konusu ise de yalın toksik etkilerdeki

gibi doza bağımlı bir eşik değeri belirlenmesi tartışmalıdır. Bu nedenle genotoksik ve karsinojenik kontaminantlar için en akılcı yaklaşım ALARA prensibidir. Ancak ADI ve diğer limit değerler regülasyonlara konu olan ve risk yönetiminde kullanılan parametreler iken ALARA bir temenni ifadesidir. Sübjektif bir kavram olduğu için regülasyonlarda kullanımı söz konusu değildir.

JECFA, gıda katkı maddeleri için ADI değerlerinin yanısıra, bunların başta safsızlıklar olmak üzere diğer spesifikasyonlarını da belirlemektedirler. JECFA, Kodeks Alimentarius Komisyonu'na gıda katkı maddeleri ve kontaminantları konusunda "Codex Committee on Food Additives and Contaminants (CCFAC)" ve veteriner ilaçları konusunda da "Codex Committee on Residues of Veterinary Drugs in Foods (CCRVDF)" isimli kodeks komisyonları aracılığıyla danışmanlık görevini yürütür.

c) Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (The European Food Safety Authority (EFSA))

EFSA Avrupa Birliği (AB) Komisyonu tarafından 2000 yılında yayınlanan "White Paper on Food Safety" isimli belgeye uygun olarak 2002 yılında kurulmuştur. EFSA, gıda zincirindeki her risk ile ilgili değerlendirme ve iletişim yapmakla görevlidir. Avrupa Komisyonu'na ve Avrupa Parlamentosu'na bilimsel danışmanlık yaparak gıda konusundaki politikaların ve EC Directives-Avrupa Topluluğu Direktifleri'nin oluşturulmasına yardımcı olur. EFSA'dan önce Avrupa Birliği'nin gıdalarla ilgili toksikoloji, hijyen ve beslenme, konularında yetkili komitesi 1974 yılında kurulan EU-Scientific Committee on Food (SCF) idi. EFSA'nın kurulması ile bu komitenin görevi sonlandırıldı.

d) FDA (Food and Drug Administration-Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi) [9]

1930 yılında kurulan FDA, yukarıda belirtilen kuruluşlar içerisinde en eski kuruluş tarihine sahip olanıdır. Her ne kadar Amerika Birleşik Devletleri'nin ulusal kuruluşu ise de dünya ülkelerinin de referans olarak kabul ettiği bir konumdadır.

Amerika Birleşik Devletleri'nde ADI değeri yerine sinonimi olan "Referans Doz (RfD)" değeri kullanılır. Referans doz da ADI gibi insan tarafından ömür boyu alınmasında bir sağlık sorununa yol açmayacak kimyasal madde miktarını belirler. Amerika Birleşik Devletleri'nde diğer ülkelerde olmayan bir uygulama da GRAS (Generally Recognized as Safe- Genellikle Güvenli Kabul Edilir) listesidir. 1958

yılında oluşturulan GRAS listesinde 200 kadar gıda katkısı vardır. Gıdalarda teknolojinin gerektirdiği miktarlarda kullanımlarının, sağlık yönünden sorun yaratmadığı kabul edilen katkılar bu grupta yer alır. Diğer bir deyişle en güvenli katkılardır. Sık kullanılan katkılardan, Benzoik asit, Butillenmiş Hidroksi Anisol (BHA), Butillenmiş Hidroksi Toluen (BHT), Monosodyum Glutamat (MSG), Sitrik Asit, Sorbik asit, GRAS listesinde bulunan katkılardır. İşlenmiş gıdalarda bazı katkıların kullanılması, insan sağlığının korunması için önemlidir. Antimikrobiyallerin kullanılması buna örnektir. Başta işlenmiş et ürünleri olmak üzere çeşitli gıdalarda anti mikrobiyallerin kullanılmaması durumunda gıda zehirlenmesine yol açan mikrobiyolojik faaliyet oluşabilir. Bu tür gıda zehirlenmeleri içerisinde en ciddi gıdalarda Clostridium botulinum adlı bakterinin üremesi ile oluşan botulinum toksini zehirlenmesidir. Nörotoksik etkili olan botulinum toksini mikrogram düzeyinde öldürücü olan toksik bir maddedir ($LD_{50} = 0.00001 \text{ mg/kg}$). Bu önemli besin zehirlenmesi Botulism olarak adlandırılır. Bir diğer örnek antioksidan özellikteki katkıların kullanılmasıdır. Yağ içeren işlenmiş gıdalarda antioksidan kullanılmaması durumunda, yağların oksidasyonu ile toksik özellikteki peroksitler ve serbest radikaller oluşabilir. AB’nde 329 gıda katkı maddesi kullanılmaktadır. AB Direktifleri ile uyumlu Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği’ne bağlı tebliğlerde de AB’ne uyumlu olarak katkı maddelerinin kullanılabilecekleri ürünler ve kullanım limitleri belirlenmiştir. FDA (Food and Drug Administration Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi) nın bugüne kadar kullanımına onay verdiği gıda katkı maddesi sayısı yaklaşık 2800’dür. Ancak bugün bunların çoğunluğu daha uygun alternatifleri bulunduğu için teknik sebeplerle veya güvenlik konusundaki endişelerden dolayı kullanılmamaktadır.

e) Codex Alimentarius Ve Ccfac [10]

JECFA’nın raporları CCFAC (Codex Committee on Food Additives and Contaminants) tarafından değerlendirilerek her gıda ürün grubunda sakıncasızca kullanılabilecek katkılar ve üst limitleri belirlenmekte, ve ilgili Codex dokümanına dahil edilmektedir. WTO’nün tüm Dünya ülkeleri tarafından benimsenen ve imzalanan anlaşmaları gereği olarak, her ülke kendi ulusal mevzuatını hazırlarken Codex Alimentarius dokümanlarını referans almak durumundadır.

2.6 Tatlandırıcılar

CAC, tatlandırıcı ifadesini “gıdaya tatlı tadı veren, şeker olmayan madde” olarak tanımlamaktadır. Tatlandırıcı özelliği bulunan maddeler farklı kimyasal yapılara sahip olmaları nedeni ile değişik fiziksel, kimyasal ve fizikokimyasal özellikler gösterirler. Bu değişik özellikleri nedeni ile farklı şekillerde sınıflandırılabilirler.

Elde edilme yollarına göre;

- **Doğal tatlandırıcılar:** Bitkisel olan doğal kaynaklardan elde edilirler.
- **Yapay tatlandırıcılar:** Sentezleme yolu ile elde edilirler.

Enerji verme özelliğine göre;

- **Enerji veren tatlandırıcılar:** Sükroz, Fruktoz, Sorbitol, Mannitol, Ksilitol.
- **Enerji vermeyen tatlandırıcılar:** Sakarin, Asesülfam-K, Aspartam.

Tatlandırıcılık etkisinin yanı sıra;

- **Hacim verici tatlandırıcılar:** Su tutarak hacim verme özelliğine sahiptirler.
- **Yoğun tatlandırıcılar:** Çok düşük miktarda kullanıldıklarında bile şiddetli tatlılık oluşturma özelliğine sahiptirler. [3]

2.6.1 Gıda Sanayinde Kullanılan Yapay Tatlandırıcılar ve Özellikleri

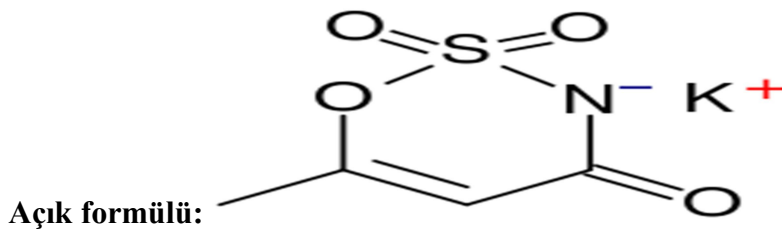
2.6.1.1 Asesülfam- K (ace-K) [11]

IUPAC Adı: 6-metil -1,2,3-okzatiyazin-4(3H)-on-2,2-dioksit’in potasyum tuzu

Kimyasal Formülü: C₄H₄KNO₄S

C.A.S. Numarası : 55589-62-3

Molekül Ağırlığı: 201,242 g/mol



E950 kodu ile de bilinen asesülfam-K ya da asesülfam potasyum, 1988'den beri kullanılan düşük kalorili bir tatlandırıcıdır. Organik sentetik bir tuzdur.

Sakkarozdan (sukroz) 130–200 kat daha tatlıdır, tat ve yapı yönünden sakkarine benzerdir. Şekere yakın bir tatlılığı vardır ancak çok yüksek yoğunlukta kullanıldığında acı, metalik bir tat verir. İnsan sindirim sisteminde değişmeksizin dışarı atılır ve bundan ötürü de kalori sağlamaz. Dayanıklı bir raf ömrüne sahiptir ve ısıya dayanıklıdır. Isıya karşı dayanıklı olduğundan yiyeceklerin pişirilmesi veya fırınlanması sırasında da kullanılabilir. Asesülfam-K'nın en önemli özelliği, diğer tatlandırıcılarla birlikte karıştırılarak kullanıldığında, tatlılık derecesinin artmasıdır (özellikle aspartam ile birlikte kullanıldığında, “sinerjist etki”). Alkol gibi organik çözücülerde çözünürlüğü düşüktür.

Özellikleri

Beyazdır ve kokusuzdur. Aynı zamanda kristal yapıdadır. Tek başına tatlandırıcı olarak kullanılabilirdiği gibi, asesülfam-K, aspartam ile 1:1 ve 1:5 oranında kullanıldığında en uygun sinerjist etkiyi yaratır. Oda sıcaklığındaki raf ömrü 5 yıl olup, ısıtıldığında yaklaşık olarak 225°C'de bozunur.

Aspartamdan farklı olarak ısıya dayanıklı olması, pişirme ve fırınlama işlemleri sırasında kullanılabilmesini sağlar. Sudaki çözünürlüğü 20°C'de 270 g/l olan asesülfam-K'nın alkol gibi organik çözücülerde çözünürlüğü düşüktür. Asesulfam-K'nın pH=3-7 arası stabil olduğu, pH=3'ün altında ise parçalanmaya başladığı saptanmıştır.

Çizelge 2.2 Asesulfam-K günlük alınabilecek maksimum miktarları [12]

Kullanım Miktarları	Maksimum Miktar
Enerjisi azaltılmış veya şeker ilavesiz alkolsüz içecekler	350 mg/L
Süt ve süt türevleri veya meyve suyu bazlı içecekler	350 mg/L
Şeker ilavesiz şekerlemeler	500 mg/kg
Şeker ilavesiz nefes ferahlatıcılı şekerlemeler	2500 mg/kg

Kullanım Alanları

Genellikle sakızlarda, içeceklerde, kuru içecek karışımlarında, jelatinli tatlılarda, puding ve kremlerde aspartam ile birlikte kullanılır. Şekerden 130 kat daha tatlı olmasına rağmen, kalori içermez.

Fırınlanmış yiyecekler, çay, kahve, kahvaltılık tahıl, tatlılar, dondurulmuş tatlılar, şekerlemeler, süt ürünleri, pastalar, farmasotik olarak ağız hijyeni, meyveli ve gazlı içeceklerde kullanılmaktadır.

Güvenlik

Sakkarin, aspartam, asesülfam-K ve sukraloz gibi besin değeri olmayan tatlandırıcılar FDA (Amerikan İlaç ve Gıda Dairesi) tarafından kullanılması uygun bulunan tatlandırıcılardır.

Günlük olarak belirlenen güvenli alım sınırını aşmamak kaydıyla tketilmelerinde bir sakınca yoktur. İnsanlarda, siklamata bağlı mesane tümörleri konusunda bir veri olmamasına karşın bir süre yasaklanmış, daha sonra da tüketimine sınırlandırılarak izin verilmiştir. Bugün için sağlığa hiçbir zararı olmadığı bilinen aspartam, sakarin ve asesülfam-K gibi besin değeri olmayan tatlandırıcılar, yiyeceklerin ve içeceklerin tatlandırılmasında, yeterli ve dengeli beslenme kapsamında belirli ölçülerde kullanılmaktadır.

Toplumumuzda yaygın olarak tüketilen tatlandırıcıların gereksiz kullanımlarını önlemek ve kullanılabilecek miktarlarının belirlenmesi için kullanılmadan önce mutlaka bir diyetisyene danışılmalıdır. Buna göre, Türkiye’de bulunan ve sıklıkla kullanılan tatlandırıcılardan asesülfam-K’nın günlük olarak maksimum kullanım miktarı 15 mg/kg’dır.

Son dönemde tatlandırıcıların karıştırılarak kullanılmasının güvenilirliği arttırdığı belirtilmektedir. Diyet kolalar, şekersiz sakızlar, şekerlemeler ve ilaçlara kadar çok çeşitli üründe bulunan aspartamla yapılan karışımlar (aspartam, asesulfam-K gibi), kullananlara güvenilirlik sağlamaktadır. Ayrıca karışımlarda, kullanımı zorlaştıran acı ve metalik tat da azalmaktadır. Piyasada enerji içermeyen tatlandırıcılarla hazırlanan

çeşitli ürünler vardır. Diyabetik kişiler için bu ürünler uygun olabilir. Ancak tatlandırıcı içeren diyabetik ürünlerin diyabet tedavisi için zorunlu olmadığı, beslenmeye bir katkısının bulunmadığı ve sınırsız kullanılmadığı anlatılmalıdır. Pahalı olan bu ürünlerin yerine enerji içermeyen tatlandırıcılarla evde hazırlanan yiyecek ve içecekler yeğlenebilir. Tatlandırıcı ile yapılan tatlılarda dikkat edilmesi gereken konu, tatlandırıcının yiyeceğe piştikten sonra eklenmesidir.

Asesulfam-k, vücutta metabolize edilemez ve idrarla değişmeden dışarı atılır. Yapılan farmakolojik çalışmalar tüketilen asesulfam-k'nın %95'inin değişmeden idrarla dışarı atıldığını ve bu nedenle metabolize edilmediği için enerji vermediğini, aynı zamanda asesulfam-k tüketiminin vücuda potasyum alımını etkilemediğini ortaya koymuştur [13]. Asesulfam-k, Birleşik Gıda Katkıları Uzman Komitesi (JECFA) tarafından ilk olarak 1983 yılında güvenilirlik açısından değerlendirmeye alınmıştır. FDA ilk olarak 1988 yılında asesulfam-k'nın alkolsüz içeceklerde tatlandırıcı olarak kullanılmasını onaylamıştır. FDA ve JECFA, asesulfam-k için günlük tüketilebilir miktarı (ADI) 15 mg/kg olarak belirlemiş, daha sonra Avrupa Birliği Bilimsel Gıda Komitesi (SCF) 1985 yılında tatlandırıcılar hakkında kapsamlı bir değerlendirme yayınlamış ve komite asesulfam-k'nın gıda ve içeceklerde kullanılmasını onaylamış, ancak günlük tüketilebilir miktarın 9 mg/kg olmasını önermiştir. Böylelikle asesulfam-k, Avrupa'da 1985 yılından ve ABD' de 1988 yılından bu yana kullanılmaktadır. FDA, bu tatlandırıcının güvenirliliğini 2003 yılının Kasım ayında tekrar onaylamış ve genel amaçlı kullanımına onay vermiştir [14] . Asesulfam-k'nın güvenirliliği 15 yıldan uzun süren 90'nın üzerinde çalışma ile resmi kurumlar tarafından onaylanmış ve aralarında Kanada, İngiltere, Fransa, İsviçre, İtalya, Belçika'nın da bulunduğu 90'nın üzerinde ülkede kullanılmaya başlanmıştır.

2.6.1.2 Aspartam (asp) [15]

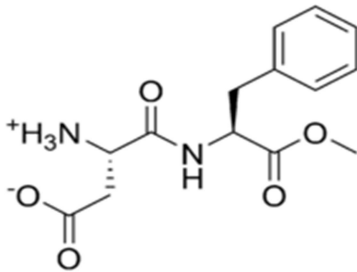
IUPAC Adı: 6 N-(L- α -Aspartyl)-L-fenilalanine, 1-metil ester

Kimyasal Formülü: C₁₄H₁₈N₂O₅

C.A.S. Numarası : [22839-47-0]

Molekül Ağırlığı: 294.301 g/mol

Açık formülü:



Aspartam çay şekerinden 200 daha tatlı olan iki aminoasitten ve bir metanolden meydana gelen tatlandırıcıdır. Aspartam, etler, tahıllar ve süt ürünleri de dâhil olmak üzere, bütün proteinli gıdalarda doğal olarak bulunur. 1965 yılında Schlatter adlı araştırmacı tarafından Searle araştırma laboratuvarında aminoasitlerden gastrik peptid sentezlenmesi sırasında oluşan ara ürünlerin saflaştırılması sırasında elde edilen N-L- α -aspartil-L fenilalanin-1-metil esterin tatlılık özelliğinin belirlenmesi üzerine tesadüfi olarak bulunmuştur. Avrupa Birliği'nce gıda katkı maddesi olarak, E951 kodunu almıştır.

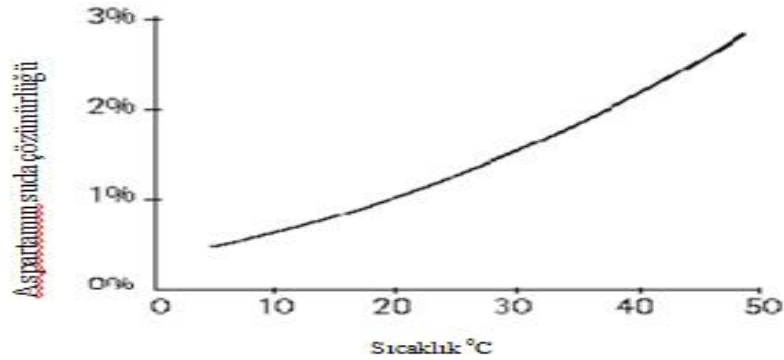
Dört farklı yapay tatlandırıcı ve şeker ile hazırlanmış çözeltilerle yapılan kör tat panellerinde, aspartam ve şekerin tat profillerinin birbirine çok yakın olduğu gözlenmektedir. Tat panellerinin yapımı sırasında birçok insan şeker ve aspartam ile tatlandırılmış olan ürünler arasındaki farkı net olarak algılayamamıştır.

Aspartam kullanımı ciddi tartışmalara yol açmış, fakat zararlılığı konusunda yeterli kanıt bulunamamıştır. Aspartam'ın (kütle olarak) %10'u vücut içinde ince

bağırsaklarda metanole dönüşmektedir. Bu metanolün büyük bölümü bağırsaklardan emilerek, hızlıca formaldehite çevrilmektedir. Metanolün toksik madde olması dolayısıyla, aspartam tartışmaların odak noktası olmuştur. Aspartam içindeki fenilalanin aminoasidi, fenilketonüri (*) hastaları için zararlıdır.

Aspartamın Kimyasal Yapısı ve Özellikleri

Aspartam, L-aspartik asit ve L-fenilalanin aminoasitlerinden oluşan aspartildipeptidi'nin metil esteridir. Beyaz, kokusuz, kristal toz görünümünde ve tatlıdır. Suda hemen hemen tamamen, alkolde kısmen çözülebilir. Aspartamın çözünürlüğü sıcaklık ve pH'a bağlıdır. Aspartam 25°C'de suda kolaylıkla çözünür. Maksimum çözünürlük pH 2,2'de (20 mg/ml, 25°C'de) ve minimum çözünürlük pH 5,2'de (13,5 mg/ml, 25°C'de) gözlenmiştir. Tüm ürünlerde yeterli çözünürlük özelliğine sahip olan aspartam, meşrubat gibi sıvı uygulamalarda tipik konsantrasyonu %0,01 ile % 0,02 oranlarındadır.



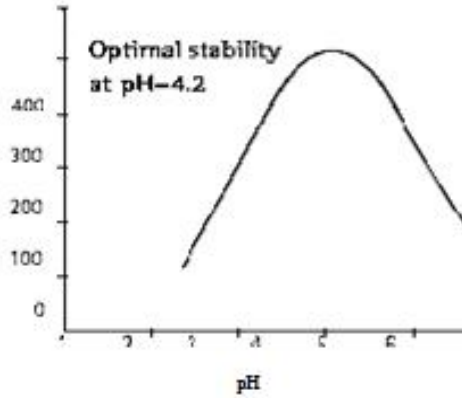
Şekil 2.3 Aspartamın Sudaki Çözünürlüğü-Sıcaklık İlişkisi

Aspartam ticari olarak toz, granül ve ince granül olarak üç farklı formda bulunmaktadır. Aspartamın tüm formları aynı çözünürlük özelliğine sahip olmasına karşın, toz formdaki aspartam, granül formdaki aspartamdan daha hızlı çözünmektedir. Koşullara bağlı olarak çözünme süresi 5-30 dakika arasında değişmektedir. Karıştırma ve sıcaklık artışı (60°C'ye kadar) çözünürlüğü hızlandırır.

Aspartamın asit çözeltileri içerisinde çözündürülmesi çözünürlük hızını önemli ölçüde arttırmaktadır. Örneğin; 20°C'de, %5'lik sitrik asit çözeltisinde aspartam çözünürlüğü yaklaşık % 4 ve % 20'lik sitrik asit çözeltisinde ise çözünürlük yaklaşık %10'dur.

Aspartamın stabilitesi zaman sıcaklık, pH ve su aktivitesine bağı olarak değişmektedir. Aspartam kuru koşullarda oldukça stabil olup, 105°C’de 100 saatlik bir ısı uygulamasın-dan sonra yaklaşık % 5’lik bir kayıp gözlenmektedir. 120°C’de 80 saatlik bir uygulama sonrası ise kayıp %50’den daha az olmaktadır.

Nemin bulunmadığı şartlarda aspartam saf formunda bir kaç yıl depolanabilir. Minimum raf ömrü 5 yıldır. Aspartam sulu çözelti halinde 30-80°C sıcaklıkta depolandığında, hızla diketopiperazine parçalanmaktadır (tatlandırma etkisi kaybolur). Bu nedenle yüksek sıcaklık uygulanan gıdalarda kullanımı uygun olmamaktadır. Aspartamın yüksek sıcaklık ve uzun süre depolama gerektirmeyen ürünlerde kullanılması önerilmektedir. 110 °C nin üzerinde bozulma meydana gelir. Kuru ürünlerde aspartamın stabilitesinin yüksek olduğu, nem miktarı arttıkça stabilitenin azaldığı saptanmıştır. %8 ve altındaki nem düzeylerinde aspartamın oldukça stabil olduğu belirtilmektedir[2,3]. Nemin bulunmadığı şartlarda aspartam saf formunda birkaç yıl depolanabilir. Minimum raf ömrü optimum şartlarda 5 yıldır. Bu yüzden toz karışım gibi kuru uygulamalarda ya da tablet formunda hem üretim prosesi boyunca hem de ürünün raf ömrü boyunca stabilite son derece iyidir. Nem ve depolama göz önüne alındığında 30°C de %70 nispi nemde 6 ay depolamada aspartamda bozulma tespit edilmiştir.



Şekil 2.4 Aspartamın 20 °C’deki Stabilite Profili

Aspartam uzun süre yüksek sıcaklığa maruz bırakılmamalıdır. Ancak UHT, HTST ve sıcak dolum paketlemede başarılı bir şekilde kullanılmaktadır [16]. LTLT pastörizasyon işleminde kayıp %3 den daha az, HTST işleminde bu oran %1’in altındadır. UHT yöntem işlemede aspartam kaybı ihmal edilebilecek düzeyde

kalmaktadır.

Çizelge 2.3 Farklı ısıtım yöntemlerinde aspartamın stabilitesi [16]

	pH	Aspartam miktarındaki
UHT 15 sn / 121–135 °C	2.5 – 3.5	% 0.5 - 1.5
Uzun süre pastörizasyon 15 dk / 80 °C	2.6 – 4.2	% 2.0 – 4.0
HTST 15 sn / 72 °C	3.5	< % 1.0
Sıcak dolum 88 °C	3.5	% 3.0 – 6.0
Isıtım işlem 20 dk / 90 °C	3.8	< %5.0

Oda sıcaklığında aspartam stabilitesi 3,4-5,0 pH aralığında iyi olup, maksimum stabilite 4,2’te gözlenmektedir. Aspartamın alkali pH değerine sahip sıvı sistemlerde kullanımı tavsiye edilmez. Sıvı sistemlerde en iyi sonuçları elde etmek için, aspartam stabilitesinin korunması açısından uygun pH seviyeleri ve kontrollü depolama sıcaklıkları önemlidir. UHT, HTST ve sıcak dolum paketlemede etkin bir şekilde kullanılmaktadır. Ortam içerisindeki asitlik durumunda raf ömrü etkilenir.

Aspartam aroma modifikasyonu amacıyla gıdalara %0.01, tatlılığı arttırmak için ise %0.6 düzeyinde katılmaktadır. Gıdalara ilave edilecek aspartam miktarı gıdanın pH değerine, sıcaklığa, viskozite, toplam kuru madde ve ürünün spesifik aromasına göre değişiklik göstermektedir.

Gazlı içecekler, tatlılığı ve tüketimi fazla olan gıda maddeleridir. Aspartamın gazlı içecekler ile uyumu; pH, depolama zamanı, aspartamın dağılım zamanı ve konsantrasyon ile ilişkilidir. Gazlı içeceklerde kullanılan aspartam düzeyi pH ve gazlı içecek cinsine göre farklılık göstermektedir [3].

Kullanım Alanları

Son yıllarda toplumun tatlandırıcılara bakış açısı oldukça değişmiştir. Yüksek oranda şeker tüketiminin insanlarda çeşitli hastalıklara yol açtığından saptanmasından sonra, şekerler dışındaki tatlandırıcılara ilgi giderek artmıştır.

Aspartam birçok düşük kalorili, şekerli yiyecek ve içeceklerde önemli bir bileşen olarak kullanım alanı bulmuş ve şekerli ürünler piyasasında son 20 yıl içinde başlıca büyümenin nedeni olmuştur.

Aspartamın güvenilirliği son 23 yıl içinde FDA tarafından 26 kez onaylanmıştır ve kullanılabileceği alanlar şu şekilde sıralanmıştır: Karbonatlı gazlı içecekler, içecek tozları, balonlu sakızlar, naneli nefes açıcılar, önceden tatlandırılmış çay ve kahveler, süt yoğurt dondurma karışımları, puding ve jöle gibi kuru karışımlar, kurutulmuş ürünler, çiğnenebilen vitaminler ve tablet tipi tatlandırıcılardır.

Aspartamın diğer yapay tatlandırıcılara göre avantajları şöyle sıralanabilir:

- Şeker tadındadır.
- Sonradan gelen acı tada sahip değildir.
- Protein yapıtaş aminoasitlerden meydana gelmektedir.
- Vücutta doğal yoldan metabolize olmaktadır.
- 100'den fazla ülkede kullanım onayına sahiptir.
- Tüm düşük kalorili tatlandırıcılar içinde en güvenilir tatlandırıcıdır.
- Şekerden 200 kat daha fazla tatlıdır.
- Düşük kalorili bir tatlandırıcıdır.
- Doğal ve yapay tatlandırıcılar ile kombine halde kullanılabilmektedir.
- Meşrubat, tablet tatlandırıcılar, şekerleme ve süt ürünleri gibi çok çeşitli gıda formülasyonlarında kullanılabilmektedir.
- Gıda bileşenleri ile reaksiyona girmemektedir.
- Diş çürümelerine neden olamamaktadır.
- Laktasif etkili (laktik asit etkisi) değildir.

Aspartamın yukarıda belirtilen bütün avantajlarının yanı sıra en önemli üstünlüğü, tat kalitesinin kusursuz olması, duyuşal açıdan sakkarozun tadına çok benzeyen bir tada sahip olması ve tadım sonrası ağızda bitter, metalik veya kimyasal tat bırakmamasıdır.

Çizelge 2.4 Enerjisi azaltılmış veya şeker ilavesiz alkolsüz içeceklerdeki maksimum miktarlar[22]

EC KODU VE	GIDA MADDESİ	MAKSİMUM
E 951	Enerjisi azaltılmış veya şeker ilavesiz alkolsüz içecekler	
Aspartam	Su bazlı aromalandırılmış içecekler	600 mg/L
	Süt ve süt türevleri veya meyve suyu bazlı içecekler	600 mg/L
	Enerjisi azaltılmış veya şeker ilavesiz tatlılar ve benzeri	
	Su bazlı aromalandırılmış tatlılar	
	Süt ve süt türevi bazlı karışımlar	1000mg/kg
	Meyve ve sebze bazlı tatlılar	1000mg/kg
	Yumurta bazlı tatlılar	1000mg/kg
	Tahıl bazlı tatlılar	1000mg/kg
	Yağ bazlı tatlılar	1000mg/kg
	Şekerlemeler ve diğerleri	
	Şeker ilavesiz şekerlemeler	1000 mg/kg
	Şeker ilavesiz nefes ferahlatıcı şekerlemeler	6000 mg/kg
	Aromalandırılmış şeker ilavesiz boğaz pastilleri	2000 mg/kg
	Şeker ilavesiz sakız	5500 mg/kg
	Enerjisi azaltılmış veya şeker ilavesiz nişasta bazlı şekerlemeler	2000 mg/kg
	Enerjisi azaltılmış veya şeker ilavesiz kakao veya kuru meyve	2000 mg/kg
	Enerjisi azaltılmış veya şeker ilavesiz kakao, süt, kuru meyve	1000 mg/kg
	Çerezler, yenmeye hazır aromalandırılmış, ambalajlanmış, kuru baharatlı nişastalı ürünler ve kaplanmış sert kabuklu yağlı meyveler	500 mg/kg
	Enerjisi azaltılmış veya şeker ilavesiz yenilebilir buzlar ve dondurma	800 mg/kg

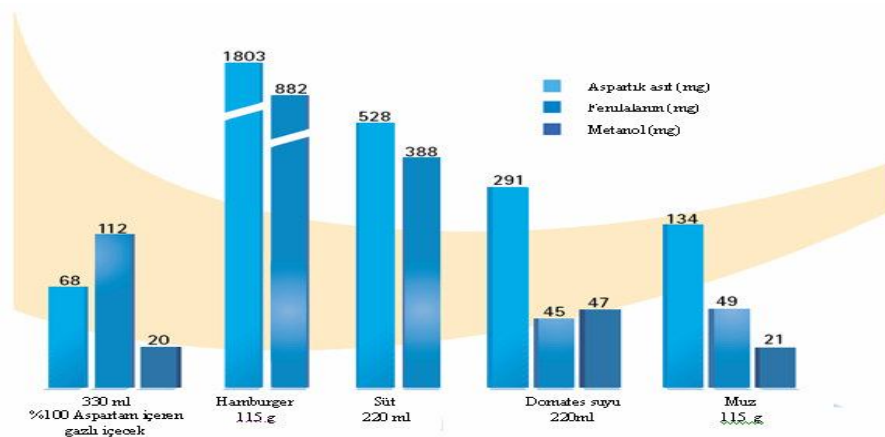
- Dünyanın 90'dan fazla ülkesinde gıda ve sağlık alanındaki yetkili kurumlar aspartam kullanımını onaylamıştır. Amerika Birleşik Devletleri'nde, son 8 yıllık dönemde yapılan geniş kapsamlı tüketim değerlendirmeleri ve diğer ülkelerde yapılan çalışmalar, günlük aspartam tüketiminin FDA ve diğer yetkililer tarafından belirlenen kabul edilebilir günlük miktarların çok altında olduğunu göstermiştir. Aspartamın piyasada bulunduğu süre içinde güvenilirliği yoğun takiplerle ölçülmüş, insan sağlığına etkisi ve yanlış bilgiler (beyin kanseri, MS, lupus hakkındaki söylentiler) karşı delil göstermek amacıyla gözetim altında tutulmuştur. Aynı zamanda Dünya Sağlık Örgütü'nün Gıda Katkı Maddeleri uzman Komitesi, Avrupa Birliği Gıda Bilimsel Komitesi ve A.B.D Gıda ve İlaç Dairesi tarafından uzun yıllar boyunca incelenmiş ve güvenli bulunmuştur.

- Aspartamın bilinen hiçbir yan etkisi yoktur. Sağlıklı yetişkinler, iki yaşından büyük çocuklar, gebe emziren kadınlar ve diyabetli hastalar için sağlıklı, emin olduğu ve rahatlıkla kullanılabileceği FDA tarafından belirtilmiştir. Aspartamın iki yaşından küçük çocuklarda ancak minimal dozlarda kullanılabileceği bildirilmiştir.

(*) Fenilketonüri nadir görülen kalıtsal metabolik hastalıklardan biridir. Anne ve babasında hastalık yapmayan bozuk genleri alan bir çocuk fenilketonüri hastalığı ile doğmaktadır.

(**) MS merkezi sinir sisteminde iltihabi değişikliklere neden olabilen bir hastalıktır.

(***) Lupus Erythematosus özellikle iki yaş üzerindeki yetişkin köpeklerde sıklıkla görülen ve iskelet sistemi, deri, böbrekler, sinir sistemi başta olmak üzere birçok sistemi etkileyen bir bağışıklık sistem hastalığıdır.



Şekil 2.5 Bazı gıdaların aspartam bileşenleri içerikleri

2.6.1.3 Neohesperidin Dihidrokalton (NHDC) [18]

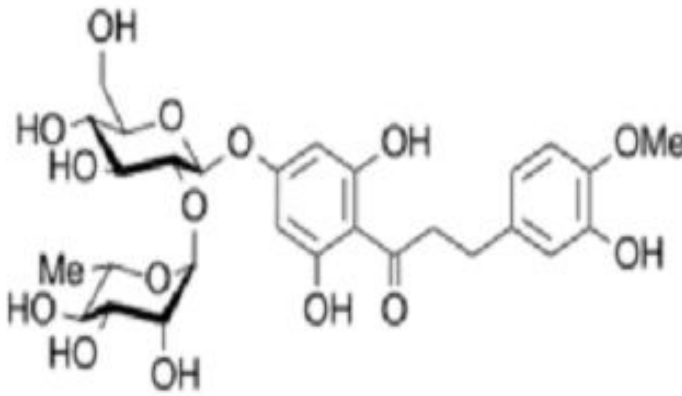
IUPAC Adı: 2, 3, 4, 5, - tetrahidroksi – 4 – metoksi dihidrokalton - 4 – β - neohesperidesit

Kimyasal Formülü: C₂₈ H₃₆ O₁₅

C.A.S. Numarası : [20702-77-6]

Molekül Ağırlığı: 612.57 g/mol

Açık Formülü:



NHDC, düşük kaloriye ve yüksek yoğunluğa sahip bir tatlandırıcıdır. NHDC' nin çok düşük konsantrasyonları bile aromayı değiştirmekte ve arttırmaktadır. Özellikle portakal, greyfurt, limon gibi turuncgil meyvelerinde yaygın olarak bulunan, yapısında bir flavanoid olup, tatlı hidrokaltonlar içerisinde tatlılık özelliği en fazla olanıdır. 1950'li yılların sonuna doğru portakalların kabuğunda acı bir flavanon olan hesperidinin alkol hidrojenizasyonu ile tatlı bir maddeye dönüşebileceği saptanmış, günümüzde ise bu üretim metoduna alternatif olan bir sentezleme yöntemi geliştirilmiştir. Günümüzde, acı ve ekşi portakal kabuklarından neohesperidin; greyfurt kabuklarından ise narincin ekstraksiyon ile elde edilir, daha sonra narincin neohesperidine dönüştürülür ve neohesperidinin hidrojenizasyonu ile NHDC elde edilir. NHDC üretimi, acı portakal ve greyfurt üretiminin sınırlı olması ve bol miktarda üretilen tatlı portakaldaki hesperidini neohesperidine çevirmek konusunda yeterli bilgiye sahip olunmaması nedeniyle günümüzde oldukça azalmıştır.

Erime noktası 152-154 °C, sudaki çözünürlüğü 20 g/L olan NHDC, yüksek sıcaklığa ve asidik şartlara dayanıklıdır. Süre-tatlık şiddeti çalışmaları, NHDC'nin tat profilinin sakaroza benzemediğini ve tadın gecikerek ortaya çıktığını ve tadım sonrası izlenimde ağızda mentol benzeri tatlılık bıraktığını ortaya koymuştur. %0.0045'lik sulu çözeltisi ile %5'lik sakaroz çözeltisi aynı tatlık derecesine sahiptir[19]. Kullanıldığı gıdaya bağlı olarak NHDC'nin tek başına kullanılmasının, aspartam ve asesulfam -k karışımından 7-20 kez daha fazla tatlılık etkisi oluşturduğu belirlenmiştir. Ancak mentol benzeri tat sonrası izlenim bazı gıdalarda kullanımını kısıtlamıştır.

Alkolsüz içeceklerde NHDC'nin sakarinle karışımı sinerjistik bir etki ve özgün bir tat profili oluştururken, aspartam ve asesulfam -k ile de aynı sinerjistik etki oluşabilmektedir. NHDC'nin kremtartar, hacim verici bir karbonhidrat ve vanilya lezzeti gibi diğer katkı maddeleri ile karıştırılması sonucunda tatlılık etkisinin gecikmesi ve istenilmeyen tat sonrası izlenim gibi olumsuz özellikleri azaltılabilmekte, glukonat, aminoasit veya nükleotid ilavesi ile de tatlılık özelliği geliştirilebilmektedir. NHDC'nin tatlılık özelliğinin yanı sıra acılığı azaltma özelliği de vardır. Özellikle, limon gibi turunçgillerde bulunan acı tadı maskeleyen yeteneğine sahip olan NHDC, acı tat içeren ilaçlar ve greyfurt suyu üretiminde de kullanıma uygundur.

NHDC katı halde stabil olup, pH'sı 1-7 olan sıvı çözeltilerde 20 °C de 1 yıl bozulmadan depolanabilmektedir. Optimal şartlarda ise 5 yıldan daha uzun süre raf ömrüne sahiptir. Sıcaklığa dayanıklı olduğundan pastörizasyon ve UHT işlemi gerektiren gıdalarda da kullanımı uygundur. Japonya'da tüketiciler tarafından oldukça fazla tercih edilen bu tatlandırıcı, kültür edilmiş süt ürünlerinde tatlılık verme, yüksek miktarda tuz içeren geleneksel Japon yemeklerinde ise tuzlu tadı arttırmak amacıyla kullanıldığı gibi lezzet vermek amacıyla tütüne de katılabilmektedir [20].

Avrupa Birliğinde NHDC'nin enerjisi azaltılmış ve/veya şekersiz yiyecek ve içeceklerde tatlandırıcı olarak kullanılmasına 1994 yılında izin verilmiştir. Amerika'da NHDC'nin aroma arttırıcı olarak kullanılmasına onay verilmesine rağmen tatlandırıcı olarak kullanımına izin verilmemiştir. JECFA henüz bu tatlandırıcı için ADI değeri belirlememiştir[21] . Çizelge 2.4' da NHDC'nin kullanımına izin verilen gıdalar ve kullanılabilir maksimum miktarlar görülmektedir[22].

Çizelge 2.5 NHDC'nin kullanımına izin verilen gıdalar ve kullanılabilir maksimum miktarlar [22]

EC KODU	GIDA MADDESİ	MAKSİMUM
NHDC	Su bazlı aromalandırılmış içecekler	30 mg/L
	Süt ve süt türevleri veya meyve suyu bazlı içecekler	50 mg/L - 30 mg/L
	Enerjisi azaltılmış veya şeker ilavesiz tatlılar ve	
	Su bazlı aromalandırılmış tatlılar	50 mg/kg
	Süt ve süt türevi bazlı karışımlar	50 mg/kg
	Meyve ve sebze bazlı tatlılar	50 mg/kg
	Yumurta bazlı tatlılar	50 mg/kg
	Tahıl bazlı tatlılar	50 mg/kg
	Yağ bazlı tatlılar	50 mg/kg
	Şekerlemeler ve diğerleri	
	Şeker ilavesiz şekerlemeler	100 mg/kg
	Şeker ilavesiz nefes ferahlatıcı şekerlemeler	400 mg/kg
	Şeker ilavesiz sakız	400 mg/kg
	Enerjisi azaltılmış veya şeker ilavesiz nişasta bazlı	
	Hardal	50 mg/kg
	Enerjisi azaltılmış çorbalar	50 mg/kg
	Balıklar, marine edilmiş balıklar, kabuklular ve	
	Tatlı-ekşi korunmuş meyve ve sebzeler	100 mg/kg
	Enerjisi azaltılmış reçel, jöle ve marmelatlar,	
	Enerjisi azaltılmış veya şeker ilavesiz meyve	50 mg/kg
	Enerjisi azaltılmış meyve sebze karışımları	50 mg/kg
	En az % 15 lif ve % 20 kepek içeren enerjisi azaltılmış	
	Özel beslenme amaçlı hafif fırıncılık ürünleri	150 mg/kg
	“TGK – Kilo verme amaçlı Enerjisi Kısıtlanmış	
	“TGK – Özel Tıbbi Amaçlı Diyet Gıdalar Tebliği”	
	Sıvı formdaki gıda takviyeleri	50 mg/kg

2.7 Yapay Tatlandırıcıları Destekleyen Maddeler

2.7.1 Sodyum Benzoat (SB) [23]

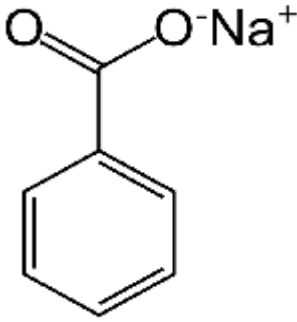
Kimyasal Adı: Sodyum Benzoat

Kimyasal Formülü: $C_6H_5CO_2Na$ ($C_7H_5NaO_2$)

C.A.S. Numarası : [20702-77-6]

Molekül Ağırlığı: 144,11 g/mol

Açık formülü:



SB bir kimyasal tuzdur. Benzoik asidin sodyum bikarbonat, sodyum karbonat veya sodyum hidroksit ile nötralizasyonu sonucunda elde edilir.

Bozulma ısısı 300°C 'dir. Suda kolayca çözünebilir.

SB, benzoik asidin sodyum bikarbonat, sodyum karbonat veya sodyum hidroksit ile nötralizasyonu sonucu elde edilen bir kimyasal tuzdur. Bu tuz tabii olarak bulunmaz.

Benzoik asit ise pek çok bitki ve hayvanda tabii olarak bulunur. Bu kaynaklardan üretilir. Beyaz ve katı olarak bulunur. 120 °C de erir. Suda erime oranı düşüktür. Alkol vs. gibi sıvılarda erime oranı daha yüksetir. Ticari benzoik asit, 200 °C civarında, kobalt ve mangan tuzlarının katalist olarak bulunduğu sıvı fazda oksijen ile toluenin reaksiyonu sonucunda elde edilir. Benzenin konsantre edilmiş sülfirik asid veya CO₂ ile yine katalistlerin bulunduğu bir ortamda oksidasyonu sonucunda da elde edilebilir. Üretilen benzoik asidin %90'ı sanayide, % 10'u ise gıda, ilaç ve kozmetiklerde kullanılan SB üretiminde kullanılır. SB'nin erime sıcaklığı 300 °C civarındadır. Suda erime oranı, benzoik asitten 200 defa daha fazladır. Benzoik asidin ve SB'nin zehirleme etkisi çok azdır. Ancak alerjik ve astmatik reaksiyonları tetikleyebilir. Cilt ve gözde tahriş yapabilir.

SB, gıda, ilaç ve kozmetik ürünlerinde koruyucu olarak kullanılır. Bazı ürünlerde ise tat verici madde olarak kullanılır. Ürünlerde kullanılma oranı en fazla % 0.1 olmalıdır. Meşrubatlarda, soslarda, turşularda, konservelerde, diş macununda, ilaç ve diğer kozmetiklerde kullanılır.

Özellikleri:

Suda çözünür, alkolde az çözünür. Ticari olarak beyaz toz veya pulcuklar halinde bulunmakta olup, sıvılara toz olarak karıştırılmakta ve çabuk çözünmektedir. Suda çözünürlüğü 25 derecede 100 ml de 50 g, alkolde ise 100 ml de 1,3 g'dır. Serbest asit formu ise 100 ml suda 0,34 g çözünmektedir.

Kullanım alanı:

Asitli gıdalardaki mikroorganizma gelişimini engellemek için kullanılır. Meyve suları, gazoz, turşu gibi gıdalarda olduğu gibi ilaç sanayinde de antimikrobiyal madde olarak kullanılır.

Kullanım özellikleri:

Gıda maddesinin pH'ı 4,5-5,0 arasında ise antimikrobiyal etki göstermektedir. Gıda katkı maddeleri yönetmeliğinde 1 g/kg düzeyinde margarin, reçel, zeytin, jöle, marmelat, kakaolu ürünler, bisküvi, gofret, kek, kremler, sos ve ketçap gibi ürünlerde kullanılmasına izin verilmektedir. Mikroorganizmalar üzerindeki etkisi, hücre duvarını ve hücredeki bazı enzimleri inaktive etmesiyle olmaktadır. Sadece asit gıdalarda etki göstermekte olup düşük asitli (pH'ı 5 den büyük) gıdalarda koruyucu etkisini kaybetmektedir. pH 2,5 ile 4,0 değerleri arasında meyve suları, karbonatlı içecekler, % 15'den az alkol içeren alkollü içecekler, düşük şekerli reçel, jöle, marmelat, çikolata hariç diğer şekerlemeler, baharatlar, sıvı çorbalar ve et suları, margarinler, tuzlanmış, kurutulmuş balık, salatalık turşusu, salamurlar lahanalar gibi asit gıdalarda 150-5.000 mg / kg düzeyinde kullanılmaktadır. pH değeri 5 üzerine çıktığı zaman ise aktivitesini kaybeder. Öncelikle antimikotik ajan olarak kullanılmakta olup, çoğu maya ve küf , % 0,05-0,1 dissosiyeye olmamış benzoik asit konsantrasyonunun da inhibe olmaktadır.

Gıda zehirlenmesi yapan ve spor oluşturan bakteriler ise %0,01-0,02 dissosiyeye olmamış asit konsantrasyonunun da inhibe edilmektedir. Genel olarak en çok maya ve bakterilere

karşı aktif, küflere karşı daha az aktif olduğu belirtilmektedir.

pH 2,3 ile 2,4 arasında % 0,02-0,03' lük SB çözeltilerinin pek çok fermantasyon organizmasının gelişmesini engelledikleri ve pH sı 3,5 ile 4 arasında olan meyve sularında % 0,06-0,10'luk konsantrasyonunun yeterli olduğu belirtilmiştir.

SB'ın değişik gıdalarda genel kullanım oranı % 0,05-0,1 arasında değişmektedir. Fakat konsantrasyonu genelde % 0,1'i aşmaması ile sınırlıdır çünkü zehirlidir.

2.7.2 Kafein (kaf) [24]

IUPAC Kimliği: 1,3,7-trimethyl-1H-purine-2,6(3H,7H)-dione 3,7-dihydro-1,3,7-trimethyl-1H-purine-2,6-dione

Kimyasal Formülü: $C_8H_{10}N_4O_2$

C.A.S Numarası : 58-08-2

pH : 6.9 (1% 'lik çözeltinin)

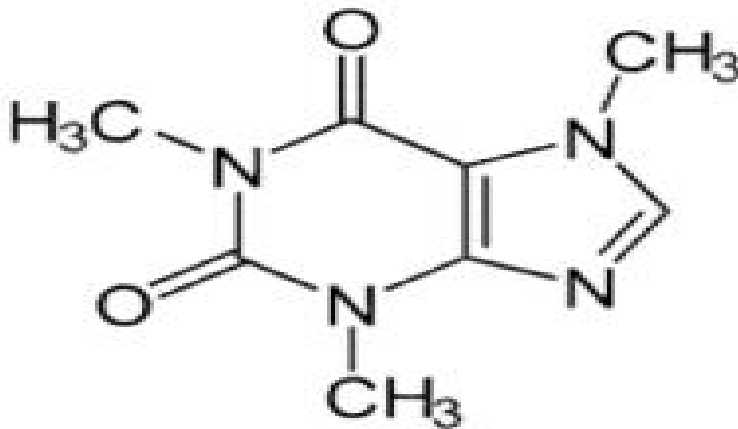
Kaynama noktası: 178 °C

Sudaki çözünürlü: 2,17 %

Yoğunluk: 1,23 g/cm³

Molekül Ağırlığı: 194,19 g/mol

Açık formülü:



Kafein matein ve guaranin olarak da bilinir. Bir alkaloid olan kaf doğal olarak kahvede, çayda, yerba mate'de, guarana'da ve az miktarda, kakao içinde bulunur. Kafeinin karakteristik, yoğun bir acı tadı vardır. Kola gibi bazı gazlı içeceklere tat vermesi için eklenmektedir. İlk olarak Alman kimyager Friedich Ferdinand Runge tarafından 1819'da bulunmuştur. Aynı zamanda kafein ismini kimya literatürüne geçirmiştir. Kahveden yararlanarak bu ismi vermiştir.

Kafein merkezi sinir sistemine etki ederek, beyne giden ve beyinden gelen mesajları hızlandırır ve stimulan etkisi yapar.

Kafein birçok bitkide değişik miktarlarda bulunmaktadır. Fasulyelerde, yapraklarda ve meyvelerde 60 çeşit bitkide bulunur. Bilinen kuru çay, %10 luk kurşun asetat ($Pb-CH_3COO$) ya da Ca_2CO_3 ile birlikte kaynatıldıktan sonra ayırma hunisinde kloroform ile ekstrakte edilir kalan alt faz alınıp içindeki kloroform uçurulur ve kalan sıvı süblimasyon yöntemi ile saflaştırılarak kaf elde edilebilir.

Temel farmakolojik özellikleri:

- Merkezi sinir sistemi'nde (MSS) psikotropik etkiyi uyaran
- Solunum sistemi uyarıcı
- Kalp atış hızı artırıcı
- Hafif diüretik etki

Kafein ve bağımlılık tartışması

Kafein doğada bulunan bir maddedir. Doğada en az 63 bitkinin tohumlarında ve yapraklarında bulunur. Çay ve kahve beslenmemizdeki ana kafein kaynaklarıdır. Kafein nedeniyle kolanın bağımlılık yaptığı söylenir. Ancak, 330 ml'lik her Coca Cola kutusunda 33 miligram kafein varken aynı büyüklükteki bir fincan kahvedeki kafein 112 mg civarındır.

Çizelge 2.6 Gıdalarda bulunan kafein miktarları [25]

Filtre kahve 1 fincan	135-200 mg
Espresso 1 fincan	100 mg
Cappuccino 1 fincan	100 mg
Hazır kahve 150 cc	57 mg
Türk kahvesi 1 fincan	57 mg
DeKafe kahve 150 cc	5 mg
Demleme çay 175 cc	20 – 110 mg
Ice Tea 330 cc	70 mg
Hazır çay 200 cc	30 mg
Kola 1 Kutu	30 – 56 mg
Diyet Kola 1 Kutu	38 – 45 mg
Kola dışı meşrubat 1 Kutu	50 mg
Meyveli gazoz 1 Kutu	10 – 50 mg

Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (FDA - Food and Drug Administration) kafeinin ın gazlı alkolsüz içeceklerde kullanmasıyla sağlığı olumsuz yönde etkilediğine dair bir kanıta rastlanmamış; 140'tan fazla ülkede, kafeinin güvenliği araştırılıp içeceklerde çeşitli seviyelerde kullanımına izin verilmiştir. WHO'ya göre bağımlılık yapan ilaçların neden olduğu sosyal ve fiziksel sonuçlar ile kaf arasında uzaktan yakından bir bağlantı olduğuna dair hiçbir kanıt bulunamamıştır.

2.8 Tatlandırıcıların Gıdalarda Kullanım Alanları

Gıdalarda kullanımına izin verilen tatlandırıcılar ile ilgili gerekli düzenlemeler 10 Eylül 1994 tarihinde AB resmi gazetesinde yayımlanan ve 1996 yılında 96/83/EC numaralı direktif ile son halini alan 94/35/EC numaralı Avrupa Parlamentosu ve Konseyi Direktifi ile yapılmıştır. Bu direktifin ekinde son tüketiciye satılmasına ve gıdaların üretiminde kullanılmasına izin verilen 19 adet tatlandırıcının listesi yer almaktadır. Bu listede ayrıca tatlandırıcıların izin verilen kullanım alanları ve izin verilen maksimum miktarları da verilmiştir [26].

Ülkemizde ise 94/35/EC sayılı “Gıdalarda Kullanılan Tatlandırıcılar“ Konsey direktifi dikkate alınarak Avrupa Birliği’ne uyum çerçevesinde “Gıdalarda Kullanılan Tatlandırıcılar Tebliği” hazırlanmış ve son olarak yapılan değişikliklerle 21.09.2006 tarihinde 2006/45 tebliği numarasıyla yayımlanmıştır.

Gıdalarda tatlandırıcıların kullanılması ile depolamadaki dayanıklılık da etkilenebilmekte ve ürünün katı madde içeriği azaldığında mikroorganizma gelişimi hızlanabilmektedir. Bu durumda gıdanın raf ömrünü uzatmak amacıyla sorbat veya benzoat gibi koruyucu maddelerin kullanımı veya pastörizasyon gibi ısı işlem uygulaması önerilmektedir

2.8.1 Gazlı - Gazsız Alkolsüz İçecekler, Toz İçecek Karışımları Ve Meyve Nektarları [27]

Siklamat ve sakarin yüksek stabiliteyi nedeniyle söz konusu ürün grubunda yaygın olarak kullanılabilmesini sağlarken, aspartamın stabilitesinin yüksek sıcaklık, depolama süresi ve nem gibi parametrelerden etkilenmesi, bu tip gıdalarda kullanılmasında söz konusu faktörlerin göz önünde bulundurulmasını gerektirmektedir. Asesulfam-K ise sulu çözeltilerdeki stabilitesi nedeniyle diyabetik ve düşük kalorili içecek üretimi için önerilir. Asesulfam-k, içeceklere toz halde katılabilirdi gibi, stok çözeltisi hazırlanarak da kullanılabilir. Kola, tonik, portakal, limon, elma, greyfurt lezzetli içeceklerde söz konusu madde tadı bozmadığı için tercih edilmektedir.

Asesulfam-K’nın diğer tatlandırıcılarla birlikte kullanılması sonucunda oluşan sinerjistik etki nedeniyle daha az miktarda tatlandırıcı kullanılmasına yardımcı olmakta, ayrıca asesulfam -K’nın aspartam, siklamat gibi tatlandırıcılarla kullanılmasıyla daha hoş bir lezzet elde edilebilmektedir.

Asesulfam -K, toz içeceklerde, püskürtülerek kurutma sırasındaki ısısal işleme dayanıklı olması, lezzet maddeleriyle uyum sağlaması ve sudaki çözünürlüğünün yüksek olması nedeniyle pek çok gıda için uygun bir tatlandırıcı olarak önerilmektedir. Diyetetik amaçlı üretilmiş meyve suyu ve yapay içecek tozu formülasyonlarında asesulfam-K’nın aspartamla 1:1 kombinasyonunun uygun olduğu belirlenmiştir [3]. Alkolsüz içecekler genel olarak % 7-10 oranında sakaroz içerirler. Asesulfam -k kullanıldığında yaklaşık 500 ppm asesulfam -K bu değere karşılık gelir. Ancak asesulfam-K / aspartam veya asesulfam -k /siklamat karışımlarının kullanılmasıyla oluşacak sinerjistik etki ile tatlılık

%30 oranında artacaktır. Böylece kullanılacak tatlandırıcı miktarı azalacaktır. Yani 160 ppm asesulfam -k + 160 ppm aspartam aynı oranda tatlılık sağlayacaktır. Ayrıca asesulfam-K çok az miktarlarda fruktoz gibi doğal tatlandırıcılarla birlikte kullanılmasıyla içeceklere istenen tat yoğunluğunun verilmesi de sağlanabilmektedir.

Özellikle gazlı içecek, meyve suyu ve nektarı üretiminde asesulfam-K veya diğer tatlandırıcıların tek başlarına ya da karışımlarının kullanılmasının, ürünün bileşenleri üzerine bir etkisinin olmadığı belirtilmiştir. Ancak birçok üründe karbonhidratlar yalnızca tatlı tadı sağlamakla kalmaz, aynı zamanda hacim verici olarak tekstürü, su aktivitesini azaltarak ürünü koruma özelliğine sahiptirler. Bu nedenlerden dolayı tatlandırıcılar gerekli fonksiyonları sağlayacak diğer bileşenlerle (polioller: sorbitol, mannitol, ksilitol gibi) kombine edilerek de kullanılırlar. 21 Şekersiz veya light olarak üretilen ürünlerde şeker ikamesi yaygın şekilde tatlandırıcılarla yapılmaktadır. Örneğin diyet kola gibi gazlı içeceklerde şeker yerine aspartam/asesulfam-k kombinasyonu kullanılmaktadır. Sakarin/siklamat kombinasyonu tatlandırıcılar, düşük maliyetlerine karşın tat profilinin istenen düzeyde olmaması nedeni ile üreticiler tarafından tercih edilmemektedir. Bu tarz ürünlerde dikkat edilmesi gereken konu şeker kullanılmadığı için ürün viskozitesinde değişiklik olabileceği ve özellikle asidik ortamlarda zaman içinde aspartamın bir miktarının parçalanacağıdır. Asesulfam-K'nın yoğun miktarda kullanılması ise tat problemlerine neden olabilir. Günümüzde asesulfam -k /aspartam ve NHDC'nin bir arada kullanıldığı formüller mevcuttur. Bu sayede hem stabilite probleminin önüne geçilip şekere özdeş bir tat profili elde edilirken, NHDC'nin aroma arttırıcı ve doygunluk verici özelliklerinden de yararlanılmaktadır. Ayrıca en yüksek maliyetli tatlandırıcılar olan aspartam, asesulfam-K ve NHDC bile eşdeğer tatlılıktaki şekerle karşılaştırıldığında %50'nin üzerinde maliyet avantajı sağlamaktadır. Aspartam haricindeki tatlandırıcılar, vücutta metabolize olmadıkları için kalori değerleri yoktur. Bu sayede tatlandırıcı kullanarak şekersiz veya light ürün üretmek mümkündür.

Aspartam ve asesulfam-K şeker ile birlikte kullanıldığında, şekerli ürüne eşdeğer bir tat profili elde edilirken, hem hammadde hem de diğer maliyetlerde belirgin bir düşme görülmektedir. Sakarin ve siklamat içeren karışımlar kullanılırsa bu maliyet düşmesi daha belirgin hale gelmekte, ancak tat profilinde bazı sapmalar olabilmektedir. Bunlara ilave olarak NHDC'nin diğer tatlandırıcılarla birlikte kullanılması durumunda

aroma arttırıcı etkisi nedeniyle daha düşük aroma tüketimi söz konusu olacağından aroma maliyetinde de bir düşme elde edilecektir.

2.9 Gıda Katkı Maddeleri ile İlgili Toksikolojik Değerlendirmeler [28]

Gıda katkı maddeleri gıdanın bileşiminde bulunmayan, ancak dışarıdan gıdaya belirli amaçlarla katılan kimyasal maddelerdir. Bu kimyasal maddeler ksenobiyotik niteliğinde olup, tavsiye edilen dozlardan daha yüksek miktarlarda kullanıldıkları takdirde toksik etki oluşturmaları söz konusu olabilmektedir. Günümüzde gıda katkı maddelerinin toksikolojik değerlendirmeleri uluslararası boyutta ele alınmakta olan bir konu olup, söz konusu değerlendirmelerde akut, genetik ve farmakokinetik çalışmalara yer verilmekte, üreme organlarına olan teratojenik etkileri ile ilgili subkronik denemeler, mutajenik ve kanserojenik etkileri ile ilgili kronik araştırmalar gerçekleştirilmektedir. Bu denemeler genelde iki aşamada ele alınmaktadır. Bunlardan birinci aşamada deney hayvanlarından ve imkân dâhilinde insanlardan elde edilen bulgular toplanmaktadır. ikinci aşamada ise elde edilen bu veriler değerlendirilerek söz konusu maddenin insan gıdalarında katkı maddesi olarak kullanımının onaylanıp onaylanmayacağına karar verilmektedir.

A. Toksikokinetik Çalışmalar: İncelenen katkının, organizmada Emilimi (kana geçişi), dağılımı (kan yardımıyla organlara taşınması), biyotransformasyonu (vücutta diğer kimyasallara dönüşümü) ve atılımı incelenir.

B. Toksisite Testleri: Başlıca toksisite testleri aşağıda belirtilmiştir.

Akut Toksisite: Bir veya 24 saat içinde alınan birden fazla dozun oluşturduğu toksisite.

Kronik Toksisite: Akut toksisiteye yol açmayacak düşük dozların uzun süre verilmesi ile oluşan toksisite.

Mutajenik Etki: DNA üzerinde kalıcı değişiklik.

Karsinojenik Etki: Kanser yapıcı etki.

Teratojenik Etki: Sakat yavru doğumlarına yol açan etki.

Transplasental Karsinojenik Etki: Gebenin çocuğunda doğumdan yıllar sonra kanser oluşumu.

İmmünotoksik Etki: İmmün sistem üzerine toksik etki.

Üreme Sistemi Üzerine Toksik Etki

Nörotoksik Etki: Sinir sistemi üzerine toksik etki

Toksisite test sonuçları uluslararası/ulusal kuruluşlarca oluşturulan bilimsel komite-lerce değerlendirilerek güvenli kullanım için gerekli sayısal değerlere ulaşılır. Bu değerlerden yola çıkılarak hangi gıdada ne miktarda gıda katkı maddesi kullanılabileceği belirlenir.

2.9.1 Limit Değerler [29]

Toksisite test sonuçlarından elde edilen verilerden ulaşılan ilk değer NOAEL (No Observed Adverse Effect Level- Gözlenebilen hiçbir yan etki göstermeyen doz) dir. Diğer bir deyişle deney hayvanları ortalama yaşam sürelerini % 70-80'ini kapsayacak sürede test edilen gıda katkısını almışlar ve NOAEL dozunda hiçbir yan etki görülmemiştir. Bu değer tespit edildikten sonra aşağıdaki hesaplama yapılır.

NOAEL (mg/kg) : No Observed Advers Effect Level (Deney Hayvanlarında gözlenebilen hiçbir yan etki göstermeyen doz)

İnsanlarda güvenli olan doza ulaşılabilmesi için: NOAEL değeri, emniyet faktörüne bölünür. Güvenlik faktörü, genellikle 100 olarak kullanılır. Ancak gıda katkısının toksisite verilerinde herhangi bir şüpheli durum olduğunda bu değer 1000 e kadar çıkabilir. Ya da epidemiyolojik verilerle gıda katkısının güvenliği kanıtlandı ise güvenlik faktörü 100 den küçük olabilir. Diğer bir deyişle deney hayvanlarında hiçbir yanetki yaratmayan dozun yüzde biri insanlarda genellikle güvenli kabul edilmiştir. Bu yöntem 1954 yılından beri gıda katkıları ve gıdalardaki kimyasal kirlilikler için uygulanmaktadır. Geri de kalan 50 yılı aşkın sürede edinilen deneyimler bu uygulamanın yeterli koruma sağladığını göstermektedir.

ADI (mg/kg) : (Acceptable Daily Intake - Günlük alınmasına izin verilen miktar) değeri insanlarda güvenli doz olarak kabul edilir[30].

NOAEL değerinden ADI değerine aşağıdaki işlem yapılarak ulaşılır.

Aşağıdaki Çizelge 2.7'da bazı tatlandırıcı, antimikrobiyel, antioksidan ve renklendirici örneklerindeki ADI değerleri gösterilmektedir.

Çizelge 2.7 Bazı önemli katkı maddelerinin NOAEL ve ADI değerler [30]

GIDA KATKISI	NOAEL (Deney Hayvanı) mg/kg/gün	ADI İnsan mg/kg/gün
Aspartam (E 951)	4000	40
Sakkarin (E 954)	500	5
Nitrit (E 250 Sodyum tuzu)	5.4	0.07
Sodyum Benzoat (E 211)	500	5
Potasyum Sorbat (E 202)	2500	25
BHA (E 320)	50	0.5
BHT (E 321)	25	0.3
Allura Red AC (E 129)	700	7
Azorubin (E 122)	400	4

(Amerika Birleşik Devletleri' nde ADI benzeri değer olarak RfD -Referans Doz- kullanılır. Aynı kimyasal için ADI ve RfD arasında önemli olmayan farklar olabilir).

Örnek: Aspartam (E 951)

- Toksisite düzeyi 3000 mg/kg/gün,
- FDA üst limit olarak 50 mg/kg/gün
- JECFA ve SCF 40 mg/kg/gün

Bir diyet kutu kola veya soda içinde 180 mg Aspartam bulunmaktadır. Bir kap mısır gevreğinde ve 35mg Aspartam bulunmaktadır. Aspartam içindeki fenilalanin aminoasidi, fenilketonüri hastaları için zararlıdır.75 kg bir erkeğin ADI değerini aşabilmesi için günde 21 kutu kola tüketmesi gerekirken, 54 kg bir kadının ADI değerini aşabilmesi için ise günde 15 kutu kola içmeleri gerekmektedir.

Çocukların fazla miktarlarda alkolsüz içecek, dondurma vs. tüketme eğiliminde olmaları nedeniyle yiyecek-içeceklerin aspartamla tatlandırılmış olabileceği gözardı edilmemelidir. Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği'nde 0-3 yaş arası çocuk gıdalarında tatlandırıcı kullanımının yasak olduğu belirtilmiştir.

1960'lar öncesinde toksikoloji testleri bugünkü kadar gelişmemiştir. Toksikoloji testlerinin yetersiz olduğu dönemlerde kullanılmasına izin verilen bazı katkı maddeleri daha sonraki yıllarda yapılan toksisite test sonuçlarına göre tekrar değerlendirildi. Bu değerlendirmeler sonucunda bazı katkıların kullanımı

yasaklandı. Bu gıda katkılarına örnek olarak; aruamin, benzil violet 4B, tereyağ sarısı, ponceau 3R, ponceau SX, sudan 1 gibi katkıları verilebilir. Bugün kullanılan her katkı maddesi aşağıda açıklanacak olan gıdayla ilgili uluslararası ve ulusal kuruluşlar tarafından güvenlik yönünden sürekli izlenmektedir. En ufak bir şüphede ADI değeri tespiti için yeniden değerlendirme yapılmaktadır. Ulusal gıda yönetmelikleri hazırlanırken toplumun gıda tüketim kalıpları dikkate alınarak en aşırı tüketimde dahi bir katkı için ADI değerinin aşılmaması amaçlanır. Bunu yine aspartam örneği ile açıklayabiliriz. Aspartam yapay tatlandırıcı olarak başta diet içecekler olmak üzere çeşitli gıdalarda kullanılmaktadır.

Kullanılan gıda türleri kısıtlanarak ve izin verilen gıda ürünlerinde katılacak maksimum konsantrasyonlar belirtilerek kullanım kontrol altında tutulur. Ülkemiz de gıda katkı maddelerinin kullanımını düzenleyen mevzuat «Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği» ne bağlı tebliğlerdir. Bu tebliğlerde uluslararası kuruluşların tespit ettiği ADI değerlerinden yola çıkılarak gıda katkılarının kullanım limitleri belirlenmiştir. Yine aynı şekilde gıda kontaminantlarının gıdalardaki limitleri de kodekse bağlı tebliğlerle düzenlenir. Bu limitlerde de çıkış noktası söz konusu kontaminantın ADI değeridir.

2.10 Katkı Maddelerinin Kullanılmasında Uyulması Gereken Kurallar

1. Gıdaların üretiminde kullanılan katkıların ülkenin ilgili yasal düzenlemelerinde izin verilen maddeler arasında bulunması zorunludur [31]. Ancak bu şekilde:

A. O katkı maddesi hakkındaki toksikolojik çalışmaların izlenmekte olduğundan
B. Bugünkü bilinenler ışığında, ilgili mevzuatta izin verildiği dozlarda kullanıldığında hiçbir toksik etkinin söz konusu olmayacağından emin olabiliriz.

2. Katkı maddesi önceden belirlenmiş saflık kriterlerine uymalıdır.

3. Gıda katkı maddeleri taşıma amacıyla (bozulma ve kötü kalitenin maskelenmesi veya ürünün ağırlığının artırılması gibi) kullanılamazlar.

4. Gıdalara eklenen bazı maddeler bazen işlem sırasında kaybolabilmektedir. Bu tür maddeler, gıdanın etiketinde belirtilmeyebilir.

5. Ambalajlı olarak pazarlanan gıda ürünlerine katılan katkı maddelerinin mutlaka etiket üzerinde beyan zorunluluğu vardır. Ancak bu beyan, katkıları E-

kodlarıyla olabileceği gibi, sınıf özellikleri belirtilerek de yapılabilir.

Örnek: Monosodium glutamate (MSG)’ın kodu E621’dir. Şayet gıda ürünü Monosodium glutamate içeriyorsa, aşağıdaki ifadelerin biri ile belirtilebilir:

- “lezzet artırıcı olarak Monosodium glutamate (E621) kullanılmıştır”
- “lezzet artırıcı olarak Monosodium glutamate kullanılmıştır”
- “lezzet artırıcı olarak E621 kullanılmıştır”.

2.10.1 Etiketinde İlave Zorunlu Bilgiler Bulunması Gerekenler [32]

Çizelge 2.8 Etiket Bilgisi

1. Belirli Gazlar İle Ambalajlanan Gıdalar	
1.1. Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliğine göre kullanımına izin verilen ambalajlama gazları vasıtasıyla, dayanıklılık süresi uzatılan gıdalar	“Koruyucu atmosferde ambalajlanmıştır.”
2. Tatlandırıcı İçeren Gıdalar	
2.1. Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliğine göre kullanımına izin verilen bir tatlandırıcı veya tatlandırıcıları içeren gıdalar	“Tatlandırıcı içerir.” ifadesi, gıdanın adını yanında yer alır.
2.2. Hem ilave şeker hem de Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliğine göre kullanımına izin verilen bir tatlandırıcı veya tatlandırıcıları içeren gıdalar	“Şeker ve tatlandırıcı içerir.” ifadesi gıdanın adının yanında yer alır.
2.3. Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliğine göre kullanımına izin verilen aspartam/aspartam-asesülfam tuzunu içeren gıdalar	Aspartamın/aspartam-asesülfam tuzunun bileşenler listesinde sadece E kodu ile belirtilmesi durumunda, “Aspartam fenilalanin kaynağı içerir.” ifadesi etiket üzerinde yer alır. Aspartamın/aspartam-asesülfam tuzunun bileşenler listesinde özel adı ile belirtilmesi durumunda, “Fenilalanin kaynağı içerir.” ifadesi etiket üzerinde yer alır.
3.1. Adında ‘kahve’ veya ‘çay’ ifadesi yer alan; kahve, çay veya kahve ya da çay ekstraktı bazlı içecekler hariç olmak üzere; Değiştirilmeksizin tüketimi amaçlanan ve hangi kaynaktan gelirse gelsin 150 mg/L’yi aşan bir miktarda kaf içeren içecekler Konsantre veya kurutulmuş formda olan ve tüketime hazırlandıktan sonra hangi kaynaktan gelirse gelsin 150 mg/L’yi aşan bir miktarda kaf içeren içecekler	“Yüksek miktarda kaf içerir. Çocuklar veya hamile ya da emziren kadınlar için tavsiye edilmez ” uyarısı etiket üzerinde ürünün adı ile aynı görüş alanı içinde yer alır. Kafein miktarı, bu uyarıyı takiben parantez içinde ve bu Yönetmeliğin 14 üncü maddesinin birinci fıkrasına uygun şekilde mg/100 ml olarak bildirilir. “Kaf içerir. Çocuklar veya hamile kadınlar için tavsiye edilmez.” uyarısı etiket üzerinde ürünün adı ile aynı görüş alanı

2.11 Türkiye’deki Uygulamalar [33]

Türkiye’de AB ile gümrük birliğine gitme kararımıza paralel olarak, ticarete konu olan mallarla ilgili mevzuatımız AB mevzuatıyla harmonize edilirken, 1997 yılında yürürlüğe girmiş olan kendi ulusal “Türk Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği”miz yürürlükten kaldırılarak, AB mevzuatının bir uyarlaması olan Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği ve ilgili Tebliğleri yürürlüğe konulmuştur. Yeni mevzuatın uygulayıcısı eski adıyla Tarım Bakanlığı Koruma Kontrol Genel Müdürlüğü; yeni adıyla Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü’dür.

2.12 Gıda Katkı Maddeleri ile İlgili Terminoloji [34]

ADI (Acceptable Daily İntake): Kabul edilen günlük tüketim miktarı.

NS (Not Specified): ADI sınırlaması yoktur. Kullanımı en güvenli katkılardır. Teknoloji gereği kullanılan miktarlarıyla ADI değeri aşılmamaktadır.

QS (Quantum Satis) : Katkı maddesinin besine katılacağı maksimum düzey belirtilmemiştir. Kullanımı en güvenli katkılardır.

TE (Temporary ADI): Geçici ADI değeri, yapılan araştırma sonuçlarına göre ADI değişebilir.

NO (No ADI allocated): ADI değeri saptanmamıştır.

GMP (Good Manufacturing Practice): İyi bir işleme tekniğinin gerektirdiği miktar. Türk Gıda Kodeksinde UTG (Uygun Teknoloji Gereği) olarak yer alır. Besinlerde kullanımı GMP olarak belirtilen katkıların, teknoloji gereği kullanılan miktarlarıyla ADI değeri aşılmamaktadır.

ML (Maximum Level): Katkı maddesinin besine katılmasına izin verilen en yüksek miktardır. Her madde toksindir, toksin ile toksin olmayanı birbirinden ayıran Dozdur.

PARACELSUS (1493- 1541)

2.13 Gıda Maddelerinde Tatlandıcı Tayini İçin Numune Hazırlama

Numune hazırlama analitik prosesin önemli bir aşamasıdır. Gıda numunelerinin içerdikleri çeşitlilikten dolayı çok zor matrisleri vardır (Örneğin; koruyucular renklendiriciler, koyulaştırıcılar, vitaminler, proteinler, lipitler ve mineraller).Bütün bu

bileşenler tatlandırıcıların belirlenmesine engel olabilir. İster kalitatif ister kantitatif olsun örnek hazırlama prosedürü tanıtmaya mutlaka uygun olmalıdır, enstrümantasyon istenen doğrulukta olmalıdır.

2.13.1 Gıda Örneklerini Hazırlamadaki Zorluklar

Gıdaların fiziksel ve kimyasal özellikleri doğaları çeşitlilik gösterir. Verilen bir gıda örneğinin bileşimindeki farklılıklar uygun bir örnek hazırlama ile minimuma indirilebilir. Bu nedenle analistin en uygun analitik metodu kullanması şarttır.

Gıda örneklerinin hazırlanması genellikle homojenizasyon, ekstraksiyon, saflaştırma ve değiştirme işlemlerini kapsar. Sıvı örneklerin analizi katı örneklerle göre avantajlıdır. Katı örnekler için bir ön aşamaya gerek vardır.

Gıda numunelerinin hazırlanmasındaki zorluk matrikslerinin çok karışık olmasıdır. Bazı matriks maddeleri ekstraksiyon solventinde benzer çözünürlük göstermeleri nedeniyle birlikte ekstrakte edilebilir. Numune ekstraktındaki matriks engellerinin varlığı çok sayıda probleme neden olabilir(örneğin; bulanıklık, emülsiyon üretimi, en önemlisi ilgilenilen bileşiğin sinyalini maskeleymesi). Bu etkiler genellikle deteksiyon limitindeki (LOD) artışla düzeltilir. Genellikle ekstraksiyon kalıntılarından saflaştırma sorundur. Uygun bir sabit fazla ekstraktı kolondan geçirmek, diyaliz, sıvı-sıvı ekstraksiyonu, çöktürme, filtrasyon en çok kullanılanlardır.

Analiz için en zor olan analiti engelleyici bileşenlerden kurtaracak uygun bir ekstraksiyon ve saflaştırma prosedürü kullanarak engelleyici bileşenlerden arındırmaktır. Uygun numuneyi hazırlamak analiz süresini kısaltır, hata faktörlerini ortadan kaldırır, duyarlılığı artırır, özel tanınmayı, doğrulamayı ve ölçmeyi sağlar.

2.13.2 Örneğin Hazırlanması

Tatlandırıcılar birçok farklı gıda maddelerinde kullanılır (Örneğin; alkolsüz içecekler, meyveli içecekler, sütlü içecekler, konsantre meyve sulu içecekler, tozlu içecekler, şekerler, sakızlar, katı ve sıvı tatlandırıcılar, reçeller, turşular, konsantre meyveler, kurutulmuş meyveler, çeşitli soslar, hazır çorbalar, jöleler, unlu mamüller, süt ürünleri, çikolatalar). Ürünlerin çokluğu ve içerdikleri tatlandırıcı çeşitlilikleri analitik kimyacılar büyük zorluk çıkarır. Çalışmaların amacı numune ile farklı analitik

yöntemlerle denenmiş güvenilir sonuçlar arasında uygunluk yakalamaktır. Numune hazırlaması gıda matriksinin türüne bağlıdır. Bazı numuneler direkt analiz edilebilirken bazılarının analizi için önceden işlemler gerekebilir. Ancak, ekstraksiyon ya da saflaştırma numunenin karışıklığına bağlı olarak engelleyicileri elimine etmek için gerekli olabilir [35] .

Numune hazırlama aşamasına gerek duymayan yalnızca birkaç tane metod vardır. Bunlar elektrokimyasal ve FTIR bazlı metodlardır [36,37,38]. Direkt ölçümün en önemli avantajı hızlı olması ve madde kayıplarının önlenmesidir. Bununla beraber FTIR bazlı yöntemlerin karışık ve numuneye özel kalibrasyonu çok iyi tanımlanmış matris numunelerinin analizini kısıtlar. Ancak, elektrokimyasal yöntemler sensör kararsızlıklardan ve sürekli kalibrasyon gerekliliklerinden dolayı kötüdür.

Montijano H, Borrego F, Tomas-Barberan FA ve arkadaşı yoğun tatlandırıcı neohesperidin dihidrokalkon (DC) 'in stabilitesi, gazlı limonata formülasyonun saklanması sırasında değerlendirmiştir. İçecek örneklerin neohesperidin DC seviyelerinde, gün ışığında ve karanlıkta oda sıcaklığında 1 yıla kadar depolandıktan sonra ya da 40° C sıcaklıkta 3 aylık bir depolama süresinden sonra hiçbir değişiklik göstermediği yüksek performanslı sıvı kromatografik (HPLC) analizi ile hazırlanan model sistemin doğruluğu gösterilmiştir.[39]

Güvenilir matriksler söz konusu ise numune (katı ve sıvı tatlandırıcılar, içecekler, toz içecekler, şuruplar, meyve suları) sulandırılarak ya da deiyonize suda çözerek, metanol ya da etanol ile uygun bir tampon ya da tampon karışımı ile analize uygun hale getirilebilir. Karbonatlı içeceklerde ise numuneler analiz öncesinde mutlaka degaze edilmelidir. (Örneğin; sonikasyon, nitrojen gazı, püskürtme ya da vakum altında tutmak). İsteğe bağlı olarak numune solisyonları saflaştırıcı bir ajan kullanılarak saflaştırılabilir. (Carrez belirteci, ZnSO₄, NaOH ya da benzeri). Saflaştırıcı ajanlar proteinleri ayırdığı için (emilme ile) ve ayrıca tanecikleri ve yağlı maddeleri askıya aldığı için kullanışlıdır. Saflaştırma olsun olmasın, numuneler tayinden önce filtrelendir. Membran ile tek bir aşamada filtreleme çoğu durumda yeterlidir. Ancak bazı ekstraktlar için santrifüj ya da öncesinde filtre kağıdı filtrasyon için gerekir. Bu basit numune hazırlama işlemi evrensel olarak yayınlanan hemen hemen her metodta yer alır. Hızlı, ucuz ve basittir. Ancak suda iyi çözünürlüğü ile hiçbir kimyasalla etkileşiminin

olmaması gerekir. Bununla beraber böyle bir prosedür birçok numune ve analiz yöntemi için yeterlidir.

Daha karışık örnek hazırlama işlemlerinde oldukça etkili olan katı faz ekstraksiyon tekniği (SPE) kullanılır. Bu teknik bileşik ya da bileşiklerin sabit faza afinitesine dayanarak numune bileşiklerin ayrılmasını sağlar. SPE düşük çözünürlüklü sıvı kromatografisi (LC) olarak kullanılabilirler. Birçok farklı SPE türleri arasında apolar C18 dolgu maddesine çok sık rastlanır. Diğerleri dedektran, polistiren ve diğer polimer bazlı dolgulardır [39,40]. Bir SPE prosedürü şu işlemleri kapsar; kartuş şartlandırma, örneğin uygulanması, kartuş yıkama analit elüsyonu. Bu SPE türündeki dolgu maddeleri, çözücüleri, pH ve akış hızını geçici analitleri kartuş içinde alıkoymak için uygun şekilde seçilmelidir. Engelleyici maddeler çok iyi alıkonmalı ya da hiç alı konmamalıdır. Sonuç olarak; zayıf olarak alıkonan maddeler numune okuma ya da kartuş yıkama sırasında giderilir. Analitler elüsyon aşaması boyunca çekilir ve sorbente en çok afinitesi olan madde kartuş içinde adsorbe edilir.

Bazı durumlar da, polar madde ile doldurulmuş SPE kartuşları (Al_2O_3 gibi) renksiz numuneler için ya da karbolsimetil selülozu (CMC) gidermek için kullanılır. Ön şartlandırılmış kolona örnek ekstraktı yüklenir. Numunenin kolonda ilerlemesi esnasında renklendiriciler ve karbolsimetilselüloz kolonda adsorblanırken, analitler kolonda tutunmazlar.

yöntemlerle denenmiş güvenilir sonuçlar arasında uygunluk yakalamaktır. Numune hazırlaması gıda matriksinin türüne bağlıdır. Bazı numuneler direkt analiz edilebilirken bazılarının analizi için önceden işlemler gerekebilir. Ancak, ekstraksiyon ya da saflaştırma numunenin karışıklığına bağlı olarak engelleyicileri elimine etmek için gerekli olabilir [35].

Numune hazırlama aşamasına gerek duymayan yalnızca birkaç tane metod vardır. Bunlar elektrokimyasal ve FTIR bazlı metodlardır [36,37,38]. Direkt ölçümün en önemli avantajı hızlı olması ve madde kayıplarının önlenmesidir. Bununla beraber FTIR bazlı yöntemlerin karışık ve numuneye özel kalibrasyonu çok iyi tanımlanmış matris numunelerinin analizini kısıtlar. Ancak, elektrokimyasal yöntemler sensör kararsızlıklardan ve sürekli kalibrasyon gerekliliklerinden dolayı kötüdür.

Montijano H, Borrego F, Tomas-Barberan FA ve arkadaşı yoğun tatlandırıcı neohesperidin dihidrokalkon (DC) 'in stabilitesi, gazlı limonata formülasyonun saklanması sırasında değerlendirmiştir. İçecek örneklerin neohesperidin DC seviyelerin de, gün ışığında ve karanlıkta oda sıcaklığında 1 yıla kadar depolandıktan sonra ya da 40° C sıcaklıkta 3 aylık bir depolama süresinden sonra hiçbir değişiklik göstermediği yüksek performanslı sıvı kromatografik (HPLC) analizi ile hazırlanan model sistemin doğruluğu gösterilmiştir.[39]

Güvenilir matriksler söz konusu ise numune (katı ve sıvı tatlandırıcılar, içecekler, toz içecekler, şuruplar, meyve suları) sulandırılarak ya da deiyonize suda çözerek, metanol ya da etanol ile uygun bir tampon ya da tampon karışımı ile analize uygun hale getirilebilir. Karbonatlı içeceklerde ise numuneler analiz öncesinde mutlaka degaze edilmelidir. (Örneğin; sonikasyon, nitrojen gazı, püskürtme ya da vakum altında tutmak). İsteğe bağlı olarak numune solisyonları saflaştırıcı bir ajan kullanılarak saflaştırılabilir. (Carrez belirteci, ZnSO₄, NaOH ya da benzeri). Saflaştırıcı ajanlar proteinleri ayırdığı için (emilme ile) ve ayrıca tanecikleri ve yağlı maddeleri askıya aldığı için kullanışlıdır. Saflaştırma olsun olmasın, numuneler tayinden önce filtrelendir. Membran ile tek bir aşamada filtreleme çoğu durumda yeterlidir. Ancak bazı ekstraktlar için santrifüj ya da öncesinde filtre kağıdı filtrasyon için gerekir. Bu basit numune hazırlama işlemi evrensel olarak yayınlanan hemen hemen her metodta yer alır. Hızlı, ucuz ve basittir. Ancak suda iyi çözünürlüğü ile hiçbir kimyasalla etkileşiminin olmaması gerekir. Bununla beraber böyle bir prosedür birçok numune ve analiz yöntemi için yeterlidir.

Daha karışık örnek hazırlama işlemlerinde oldukça etkili olan katı faz ekstraksiyon tekniği (SPE) kullanılır. Bu teknik bileşik ya da bileşiklerin sabit faza afinitesine dayanarak numune bileşiklerin ayrılmasını sağlar. SPE düşük çözünürlüklü sıvı kromatografisi (LC) olarak kullanılabilirler. Birçok farklı SPE türleri arasında apolar C18 dolgu maddesine çok sık rastlanır. Diğerleri dedeskan, polistiren ve diğer polimer bazlı dolgulardır [39,40]. Bir SPE prosedürü şu işlemleri kapsar; kartuş şartlandırma ,örneğin uygulanması, kartuş yıkama analit elüsyonu. Bu SPE türündeki dolgu maddeleri, çözücüler, pH ve akış hızını geçici analitleri kartuş içinde alıkoymak için uygun şekilde seçilmelidir. Engelleyici maddeler çok iyi alıkonmalı ya da hiç alı konmamalıdır. Sonuç olarak; zayıf olarak alıkonan maddeler numune okuma ya da

kartuş yıkama sırasında giderilir. Analitler elüsyon aşaması boyunca çekilir ve sorbente en çok afinitesi olan madde kartuş içinde adsorbe edilir.

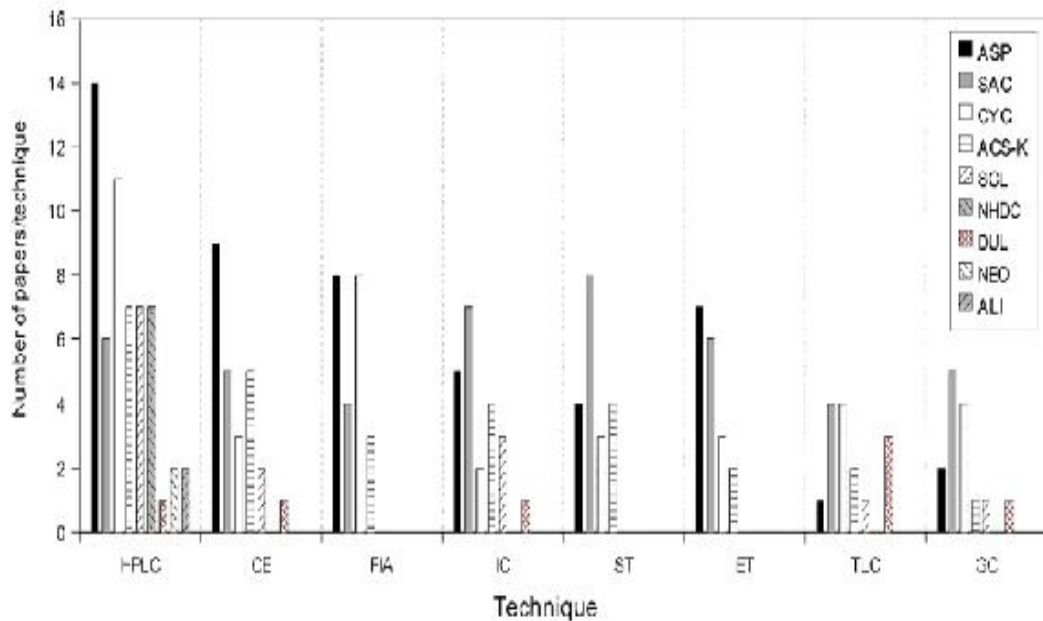
Bazı durumlar da, polar madde ile doldurulmuş SPE kartuşları (Al_2O_3 gibi) renksiz numuneler için ya da karbolsimetil selülozu (CMC) gidermek için kullanılır. Ön şartlandırılmış kolona örnek ekstraktı yüklenir. Numunenin kolonda ilerlemesi esnasında renklendiriciler ve karbolsimetilselüloz kolonda adsorblanırken, analitler kolonda tutunmazlar.

SPE bazlı örnek hazırlama şartları tekrarlanabilir, hızlı, basit ve ucuz olduğu için daha uygun görülür. Gıda analizlerinde en çok kullanılan evrensel ve uygun teknikleridir. Başka örnek hazırlama teknikleri de vardır ancak bunlar analit, örnek ve tayin için oldukça spesifiktir. Böyle durumlarda, numune hazırlamalarındaki ayrıntılar ilgili referanslarda bulunabilir.

2.14 Tatlandırıcıların Tayinlerinde Kullanılan Analitik Yöntemler

Diyet ürünlerinde söz konusu maddelerin analizi için uygulanabilen yöntemlerdir. Metodların çoğu tekil tatlandırıcıların analizleri için geliştirilmiştir. Aşağıdaki tabloda görebileceğiniz gibi en çok kullanılan tatlandırıcılar (aspartam, sakkarin, siklamat, asesülfam-K) tüm güncel analitik tekniklerle tayin edilebilir. Neohesperidin DC, alitam ve neotam tayini için de çok az sayıda veri vardır [41].

Çizelge 2.9 Yapay tatlandırıcıların analizinde kullanılan analitik yöntemler;



CE: Capillary Electrophoresis (Kapilar Elektroforez)

ET:Electroanalytical Techniques (Elektroanalitik Teknikler)

FIA:Flow-İnjection Analysis (Akış Enjeksiyon Analizleri)

GC:Gas Chromatography (Gaz Kromotografisi)

HPLC:High-Performance Liquid Chromatography (Yüksek performanslı Sıvı Kromotografisi)

IC: Ion Chromatography (İyon kromotografisi)

TLC: Thin-Layer Chromatography (İnce Tabaka Kromotografisi)

ST: Spectroscopic Techniques (Spektroskopik Teknikler)

Tatlandırıcıların kombinasyon halinde kullanılmaya başlanılmasından beri, tek seferde birkaç tatlandırıcının tayinini bir arada yapan analitik metodların geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Şimdiye kadar yayınlanmış çoklu tatlandırıcıların tayinleri için geliştirilen metodlar sadece birkaç maddenin tanımlanmasına odaklanmıştır. Ancak son zamanlarda, yapay tatlandırıcıların tayininde çok daha geniş bir aralık kaplayan metodlar görülebilir. Şu anda bu alandaki en popüler teknik HPLC'dir. HPLC tekniğinin kullanım aralığının çok geniş olması onu evrensel bir teknik yapar. Ters-faz sıvı kromatografisi (RF-LC) en çok bilinen ve tatlandırıcıların ayrılmasında en çok uygulanan bir yöntemdir.

HPLC'den başka ayırma metodları da bu alanda kullanılmıştır. İyon kromotografisi (IC) gıda ürünlerindeki çoklu-tatlandırıcı analizleri için uygundur. Organik çözücü kullanılarak ayırma yerine IC ayırmalarında elüent olarak zararsız ve ucuz tuz çözeltileri kullanılır.

Kapiler elektroforez (CE) çoklu tatlandırıcıların birarada tayini için kullanışlı bir başka cazip ayırma tekniğidir. Bazı durumlarda CE tekniğinin HPLC ye göre analiz süresi yönünden ve düşük çözücü kullanımı açısından üstünlüğü vardır

Çizelge 2.10 Piyasada bulunan örneklere uygulanan metodlar [42]

Aspartam	HPLC-UV	Diet ürünleri, alkolsüz içecekler, kolalı içecekler, toz içecekler, çeşitli yiyecekler
Asesülfam -K	HPLC-UV	İçecekler, reçeller, alkolsüz içecekler, kolalı içecekler, toz içecekler
Aspartam, Asesülfam -k	HPLC, ESI-MS	Çeşitli yiyecekler, içecekler, konserve meyveler, kekler
Aspartam	FIA(spektrofotometrik yöntem)	Tablet tatlandırıcılar, sakızlar, şeker ve reçeller
Aspartam	Kare dalga voltametri	Toz içecekler, diet ürünleri
Aspartam, Asesülfam-K	FTIR	Tablet tatlandırıcılar
Asesülfam -k	Kemometrik analiz	Katı ve sıvı tatlandırıcılar, meyve suları, içecekler, yoğurt ve sütlu içecekler
Aspartam, Asesülfam-K	HPLC-UV	Diet ürünleri, alkolsüz içecekler kolalı içecekler, toz içecekler , çeşitli yiyecekler, reçeller
Aspartam,	HPLC, ESI-MS	Çeşitli yiyecekler, içecekler, konserve meyveler, kekler

2.14.1 Kantitatif Tayin Yöntemleri

2.14.1.1 Spektrofotometrik Yöntemler

Gıda maddelerindeki tatlandırıcıların analizi için spektroskopik tekniklerin çeşitli türlerine başvurulmuştur. UV-spektrofotometrik metodlar en çok kullanılan yöntemlerdir. Raman ve infrared spektroskopisi de bu amaç için kullanılır.

H.K. Khurana ve arkadaşları içeceklerdeki aspartamın tayini için bir başka spektrofotometrik metod da α -kimotrispsin-alkol sistemi ile aspartam formaldehite enzimatik dönüşmüş ve daha sonra formaldehit Fluoral-P ile türevlendirilmiştir. Alkolsüz içeceklerdeki aspartamın tayini için hızlı bir metod olan Fourier Transform Infrared Spektroskopisi'nden yararlanılmıştır. Bu yüzden içecek üretim sektöründeki aspartamın rutin miktar kontrol analizleri için uygundur [43].

C.S.P.Sastry ve arkadaşları asp, sakarin ve ace-K'yı çok çeşitli gıda ürünlerinde reaktif olarak oksazin boyası ve Sevron Mavisi 5G kullanılarak ekstraktif spektrofotometrik teknik ile tayin edebilmişlerdir (aynı anda değil). Bu tatlandırıcılar boya ile kloroforma ekstrete edilebilen kompleksler oluştururlar. Bir tatlandırıcının içeriği 655 nm de kloroform ekstraktının absorbansının ölçülmesiyle tayin edilir [44].

Pierini, G. D, Llamas ve arkadaşları eş zamanlı olarak acesulfam-K ve aspartam miktarını belirlemek için basit ve hızlı bir yöntem önermiştir. Bu yöntem çok değişkenli kalibrasyon araçları ile analitlerin örtüşen sinyallerini gidermek amacıyla doğrusal alan voltametri yöntemidir. Çok değişkenli kalibrasyon yöntemi en küçük kareler yöntemi (PLS) algoritması kullanılarak geliştirilmiştir. Döner disk elektrodun duyarlılığını (RDE) artırmak için numune uygulaması 8000 rpm de yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar, HPLC yöntemi ile elde edilen sonuçlar ile iyi bir uyum göstermiştir [45].

N.E.Llamas ve arkadaşları diğer bir çalışmada sıvı, katı tatlandırıcılarda ve toz meyve sularındaki Ace-K ve sakarinin tayini için basit ve hızlı bir yöntem önerilmiştir. Kemometrik analizle (kısmi en küçük kareler (PLS)) UV-VIS spektrofotometrenin birlikte kullanımı gerçek örneklerdeki bu bileşiklerin tayinine izin vermiştir. Aspartamın neden olduğu güçlü engelleme, kalibrasyon ve validasyon sırasında göz önüne alınmıştır[46].

Y.Ni ve arkadaşları ace-K, sodyum siklamat ve sodyum sakarin tatlandırıcılarının bir

arada basit ve hızlı şekilde tayin edilebilmesi için hassas bir spektroskopik yöntem uyarlamışlardır. Bu analitik yöntem potasyum permanganatın bir alkali çözeltisi içinde oksidatif reaksiyonuna dayanır. Kinetik verileri çözmek için PLS-PCR ve CLS (Kısmi kareler -temel bileşen regresyonu -Klasik enküçük kareler yöntemi) sonuçları kullanılmıştır. Önerilen bu yöntemler gıda örneklerinde üç tatlandırıcının belirlenmesi için uygulanır ve sonuçlar HPLC yöntemi ile karşılaştırılmıştır [47] .

YE Shan yaptığı çalışmada yaygın olarak gıda aroma maddeleri olarak kullanılan ace-K, asp ve sakkarinin uv spektral bölgede Britton Robinson(BR) tamponu içinde pH 3.25 iken birbirine çok benzer pikler verdiğini bildirmiştir. Bu çalışmada kemometrik yaklaşımların yardımıyla PLS ve PCR metodu uygulayarak analitleri ayırmak mümkündür. PCR sonuçlarının PCL den daha iyi olduğu görülmüştür. Bu bileşiklerin belirlenmesi için yararlanılan lineer aralık sırasıyla 1.0 -30.0 mg-L⁻¹ ,1.0-20.0 mg-L⁻¹ ,1.0-14.0 mg-L⁻¹ ‘dir [48].

Liu Shaogang ve arkadaşları bazı içeceklerdeki sakkarin ve benzoik asidin analizlenebilmesi için Uv spektrofotometre ve Kalman Filtresi kullanmışlardır. Örnekleri asit çözeltisi içinde etil eter ile ekstre edilmiştir kalan parçacıklar NaCO₃ çözeltisinde çözünmüştür. Böylece sakkarin ve benzoik asit matriks etkilerden uzaklaştırılmıştır. Absorbansları 245 nm ve 281 nm aralığında bulunmuştur. Sakkarin ve benzoik asit kalman fitresi ile analizlenebilmiştir. Bu yöntem örneklere basit ve hızlı şekilde uygulanabilir [49] .

S.Armenta ve arkadaşları Fourier-transform infrared spektrometresini tablet tatlandırıcılardaki asp ve ace-K nın tayini için kullanmışlardır. Off-line ve on-line FTIR metodu HPLC ile elde edilen verileri istatistiksel olarak karşılaştırmak için geliştirilmiştir [50].

Fizik Amerikan Enstitüsü konferansında (AIP Conference) asp, ace-K, sodyum siklamat, sodyum sakkarin karışımlarını hızlı ve etkili bir şekilde tayin edebilmek için FT-IR ve EI-MS metodlarının kullanılabileceği bildirilmiştir. FT-IR ile yapılan ölçüm sonucunda analitlerin piklerinin belirlenebildiği görülmüştür. MS ile de karakteristik piklerin değerlendirmeleri yapılmıştır. Farklı formülasyonlar denenerek hazırlanan örnekler sonucunda EI-MS ölçümleri sonuçları ile FT-IR sonuçlarının uygunluk içinde olduğu görülmüştür. Hassas ve düşük maliyetli alternatif yollarla hazırlanan farklı formülasyonlar içeren tatlandırıcıların kalite kontrolleri bu çalışmadaki yöntemle tespit

edilebilir [51] .

Maes, P ve arkadaşları ¹H Nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi (400 MHz) ile birçok colalı içecek markalarını ayırt etmek ve meşrubatlarda ölçümlerin güvenilir bir şekilde yapılabilmesi için bir analiz yöntemi geliştirmişlerdir. Örnekler önce gazdan uzaklaştırılması için ultrasonik banyoda degaje edilmiştir. Sonra pH ın 4.5 olarak ayarlanması için D₂O içine %0,1 Trisodyum Fosfat (TSP) eklenmiştir. Elde edilen NMR spektrumları ‘parmak izi ‘olarak kabul edilir ve Foton Kolerasyon Spektroskopisi (PCS) ile analiz edilmiştir. Aynı marka kola örneklerinde yüksek ve düşük kaliteli seçenekleri arasında önemli farklılıklar bulunmuştur. Sülfite, amonyak, karamel (E 150D) hariç, kaf, ace-K, asp, siklamat, benzoat, hidroksimetilfurfural (HMF)’ın miktar tayini için iç standart yöntemi uygulanmıştır. Kaf, asp, ace-K ve benzoat için limit değerler sırasıyla 1.7,3.5,0.8, ve 1.0 mg/L olarak bulunmuştur. Bu nedenle kemometrik sonuçlar ile NMR spektroskopisi alkolsüz içecekler ve seçilmiş içeceklerin bileşenlerinin aynı anda analizi için etkili bir araçtır [52].

2.14.1.2 Kromatografik Yöntemler

Likit kromatografi (LC) yüksek yoğunluklu tatlandırıcıların tayinleri için kullanılan en popüler tekniktir. LC ile birlikte çeşitli tayin sistemleri kullanılır. HPLC izokratik veya gradient ters-faz kromatografik ayırmaya dayanır. LC ile birlikte çeşitli tayin sistemleri kullanılır. Örneğin: ultraviyole (UV) spektrofotometri, amperometri, kolorimetri, kütle spektrometresi (MS), spektrofluorometri, ışık saçılması ve kondüktometri)

Aspartam miktar tayini için birçok HPLC metodu rapor edilmiştir. Ters-faz HPLC yöntemi ile UV dedektör kullanılarak asetonitril ve /veya metanol mobil fazında fosfat tamponu ile aspartam tayin edilmiştir. L.M. Nollet bunların birçoğunu 250 mm kolonda geliştirmiştir. Ancak aspartam ve metabolitleri 30 mm kolon kullanılarak UV dedektör ile ayrılabilir. Kolon boyu kısalsa analiz süresi 10 dakikadan daha az sürer ancak seçicilik 250 mm kolondakinden daha kötü olur [53] .

D.Odacı ve arkadaşları aspartam ve onun hidroliz ürünlerini kolon öncesi türevlendirme ile spektrofluorometrik olarak tayin edebilmiştir. Yöntem de asetil fenilalanin, aspartik asit ve fenilalanin reaktanları naftalin 2,3 dikarmoksaldehit ile hafif alkali ortamında siyanür iyonu varlığında floresan 1-siyano-2- substitue benzen [f] izoindole türevlenir [54]. S.Armenta benzer bir metodta fluoreksamin kullanarak kolon öncesi türevlendirme

yapmıştır[55]. Bu yöntemlerin en büyük dezavantajı uzun türevlendirme prosedürleri gerektirmesidir. Aspartamın doğal floresansı HPLC tayini için kullanılabilir.

Aspartam ve fenilalanin maksimum 284 nm’de doğal floresans yayar. K.Wro’bel 205 nm’de en iyi sinyal-gürültü oranının elde edildiğini bulmuştur. Bu metod için türevlendirmeye gerek yoktur. Ayrıca spektrofotometrik tayin, spektrofotometrik tayine göre çok daha iyi duyarlılık ve biraz daha iyi hassasiyet sağlar [56].

Basit bir yöntem olan normal faz HPLC yöntemiyle tablet tatlandırıcılardaki aspartamın tayini mümkündür. F.A Thomas–Barberan ve arkadaşlarının verdiği yöntem aspartamın 2,4 dinitrofloro benzen ile türevlendirilmesinden sonra 332 nm de tayin edilmesine dayanır. Ayrım bir silika kolonda mobil faz olarak hekzen-etil asetat (60;40) kullanılarak 1m /min akış hızında gerçekleştirilmiştir. Metodun LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 1 mg ve 4 mg olarak bulunmuştur. Metod 20-180 ng konsantrasyon aralığında lineer olup geri kazanım değeri %97 den daha iyidir [57] .

H.Masumoto ve arkadaşları aspartamın HPLC yöntemi ile elektrokimyasal olarak tayin edilebileceğini bildirmiştir. Aspartam, normalde elektrokimyasal olarak inaktiftir ancak kolon öncesi türevlendirme ile oksitlenebilir hale geldiğini (254 nm de ışık saçır) ve kolon öncesi fotokimyasal dedektör kullanılarak aspartamın kesin tayinin yapılabilceğini bildirmişlerdir [58].

HPLC-UV metodu Neohesperidin DC (NHDC) nin tayini için en çok kullanılan yöntemdir. Tomas-Barberan ve arkadaşları NHDC gradient modda standart C18 kolon kullanılarak analiz edilebileceğini bildirmişlerdir. Birçok gıda bileşeni bu dalga boyun da çok az absorbans yaptığı için 282 nm dalga boyu analiz için en uygun dalga boyu olduğunu bildirmişlerdir.

[59-60].

Ozkan, G. Ve arkadaşları üç yapay tatlandırıcı (ace-K, asp ve sakarin) ve diğer katkıları olan vanilin, benzoik asit ve sorbik asidin izotarik yöntem ile C18 kolonda ayrılmalrı ve miktar tayinleri yapmıştır. Diod–Array Detektörü (DAD) her bir analit için farklı dalga boyları seçilerek kullanılabilir. (asesülfam-K; 230 nm, sodyum sakkarin: 220 nm, α -aspartam: 203 nm, vanilin 280 nm, benzoik asit: 225 nm, sorbik asit: 256 nm). Metod kola ve tozlu içeceklerdeki tatlandırıcı ve koruyucu bileşenlerinin izlenmesi için faydalı bulunmuştur [61].

N.Dossi ve arkadaşları ters faz HPLC (RP-LC) metodu ile toz içeceklerde ve sıvı içeceklerde tatlandırıcı tayininin mümkün olduğunu bildirmişlerdir. Bunun için 10µm LiChrosorb RP18 içeren kolon kullanılmıştır. Gradient elüsyon programına uygun olarak analitler metanolle birlikte pH 4.0 sulu 0,1 M fosfat tamponu ile elüe edilmiştir. Ayrılma işlemi yirmi dakikadan daha az bir sürede gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Spektrofotometrik deteksiyonun duyarlılığı teknik switch dalga genişliğine göre ayarlanmıştır. Bundan dolayı tatlandırıcıların limit aralığı 1.0 ve 3.0 mg/l⁻¹ olup maksimum limit değerin altındadır. Methot direk enjeksiyon öncesi analizi yapılan bazı ticari içecekler için başarılı kılınmıştır [62].

H.Masumoto ve arkadaşları Neotam, alitam ve aspartamın HPLC-UV yardımıyla çeşitli gıdalarda miktar tayinleri yapılmıştır. Dahası, bu üç tatlandırıcının Ultra-HPLC (UHPLC)-MS² yöntemini kullanarak başarılı şekilde tanınması gerçekleştirmiştir. İyi bir ayırmayı uygun hassasiyet ile 20 dakikadan daha kısa sürede gerçekleştirmiştir [63].

V.George, Arora ve arkadaşları çoklu tatlandırıcıların ve onların bozunmuş ürünlerinin tayini için C18 kolonu ile solid faz ekstraksiyon metodunu kullanılmışlardır. HPLC için analitik şartlar UV detektör C18 kolonuna göre standardize edilmiştir. Bu yöntemle çoklu tatlandırıcıların ve onların türevlerinin aynı anda tayini mümkündür. Sukralozun kantitatif ve kalitatif tayini içinse HPTLC amino grup ve silika gel plakalar üzerinde standardize edilmiştir [64].

H.So Lim ve arkadaşları ace-K, siklamat, sodyum sakkarin, asp, alitam, neotam, sukraloz, dusin ve NHDC'nin birarada tayini için HPLC-MS/MS metodunu önermişlerdir. Örnekler pH 4.5 tampon çözeltisi ile ekstrakte edilmiştir. Örnek seçici reaksiyon monitör modunda (SRM) MS/MS metodu kullanılarak termo hipersil BPS C18 (250 X3 mm,5-µm) kolonunda ayrıştırılmıştır. $r > 0,99$ dir. Gerikazanım 90.0-107.5 % aralığındadır. Bu methot değişik yiyecek ve içeceklerdeki bu dokuz tatlandırıcının başarılı şekilde gerçekleştirilmiştir. [65].

Ji C ve arkadaşları yeni bir methot olan ultra performans sıvı kromatografisi (UPLC) ile sodyum sakkarin, aspartam ve neotamın aynı anda analizi mümkündür. 220 nm de tekli enjeksiyon uygulanmıştır. Gradient programı ile ACQUITY UPLC BEH C18 kolonu kullanılmıştır. Örneklerdeki geri kazanım 80.5 %- 95.2 % aralığındadır. Yöntem toz tablet tatlandırıcılarda ve tatlandırıcı içeren içeceklerde başarıyla cevap vermiştir [66]

Son yıllarda kafein ve benzoik asit birçok içecekte bulunmaktadır. Diyet içeceklerde kullanılan düşük kalorili yapay tatlandırıcılar şekerin yerini almıştır. İlk bulunan yapay tatlandırıcının sakkarin olmasına rağmen aspartamın kullanımı daha yaygındır. Cola zero, Diet Cola, Nestle Diet Tea bunları içeren örneklerdendir. M.Ree ve arkadaşı E.Stoa karışım standartları ,HPLC yöntemi ile bu tatlandırıcıların içeceklerde bulunan konsantrasyonlarının belirlenmesinde kullanmışlardır . [67].

D.Yang ve arkadaşları yeni HPLC –MS metodu ile yedi yapay tatlandırıcının (aspartam, sakkarin, asesülfam-K, neotam, sukraloz, siklamat ve alitam) ve bir doğal tatlandırıcının (Steviosid) tayinini gerçekleştirmişlerdir. Diğer birçok metodun aksine, bu yöntem saflaştırma basamağı içermez . Gıda örnekleri metanol-su karışımı ile ekstrakte edilir ve süzildükten sonra HPLC-MS sistemine enjekte edilir. Siklamat, sukraloz, neotam, aspartam, steviosid, alitam, asesülfam-K ve sakarin için seçici iyonizasyon kaydı (SIR) kullanılarak miktar tayinleri yapılmıştır [68].

Yapay tatlandırıcılar Avrupa Parlementosu tarafından kontrol edilen gıda katkı maddeleridir. Bu nedenle güven düzeyleri ve analitik verileri kontrol edilmesi için her geçen gün yeni metodlar geliştirilmektedir. Bu çalışmada LC-MS/MS yöntemi kullanılarak bazı yapay tatlandırıcıların

(asp,ace-K, siklamat, sakkarin, sukraloz) tayini mümkün kılınmıştır. İkili methot yapılan çalışma için çok duyarlı olduğu bulunmuştur [69].

I.Trandafir ve arkadaşları kola içeceklerindeki ace-K, sakarin, asp, kaf ve benzoik asitin tayini için basit ve seçici ve hızlı bir yöntem olan terz faz HPLC yöntemini geliştirmişlerdir. DS Hipersil C18,5 µm kolonu kullanılmıştır. Ace-K için $\lambda=227$ nm, sac $\lambda=265$ nm, asp , caf, ve benzoik asit için $\lambda=217$ nm de diode array dedektörle analiz gerçekleştirilmiştir. Analiz 40 dakikadan daha az sürede gerçekleşmiştir. Kromatografik ayırım için potasyum dihidrojen orta fosfat tamponu (pH 4,3) ve asetonitril (88:12, v/v) mobil faz olarak kullanılmıştır. Yöntem 0-100 mg/L konsantrasyon aralığında lineerdir. Metodun validasyon parametreleri sonuçların analitik parametrelere uygun olduğunu göstermiştir [70].

A.Zygler ve arkadaşları yüksek duyarlıklı tatlandırıcıların tayini için (SPE) ekstraksiyonunu ardından HPLC-MS spektroskopisini gerçekleştirmişlerdir. Örnekler ace-K, asp, alı, cyc, dul, NHDC, sac, ve scl içermektedir. Numune formik asit ve N,N-

diizopropiletilamin bileşiminden oluşan pH 4,5 tampon kullanılarak ultrasonik banyoda ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra Strata-x 3µm polimerik SPE kolonu kullanılarak temizlenmiştir. Ayrışma C18 kolonunda gradient elüsyon yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar ace-K, sac ve sukraloz için lineer sonuç vermiştir. Konsantrasyon 0,25 µg/ml altında bulunmuştur. Geri kazanım değerleri tüm tatlandırıcılar için 84,2 ve 106,7 % aralığında bulunmuştur. Bu method ile çeşitli içeceklerde, yoğurt ve balık ürünlerinde rutin kalite kontrol analizleri yapılabilir [71].

M.Idris ve arkadaşları tablet tatlandırıcılardaki aspartamın analizi için basit ve yeni yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemi geliştirmişlerdir. Bu yöntem ile 332 nm de aspartamın 2,4-dinitro floro benzen türevi amaçlanmıştır. Ayırma işlemi hekzan: etil asetat (60;40,v/v) mobil fazı kullanılarak silika kolon üzerinde gerçekleştirilmiştir (pH % 1 asetik asit kullanılarak 4,5 a ayarlanmıştır). LOD ve LOQ değerleri beklenildiği gibi 1 ng ve 4 ng bulunmuştur. Lineer konsantrasyon aralığı 20-180 ng 'dır ve bu yöntem ile geri kazanım değerleri %97 den daha iyi sonuç vermiştir.[72].

M.Grembecka ve arkadaşları çeşitli diyet takviyeleri ve alkolsüz içeceklerdeki kafein ve aspartamın aynı anda tayini için kromatografik bir yöntem sunmuştur. Corona charge analit dedektör ile analitler çift dedektörlü bir HPLC sisteminde (Corona CAD-UV DAD) tayin edilmiştir. Yöntem de 5 mikron çapında partiküllerle doldurulmuş Termo –Hypersil altın C18 kolonu ve asetonitril-su (15/85%v/v) 1 ml / min bir akış hızında mobil faz kullanılmıştır. HPLC-CAD-UV-DAD yöntemi diyet ürünlerinde ve alkolsüz içeceklerdeki kafein ve aspartamın kantitatif ve kalitatif tayini için uygundur. Belirlenen konsantrasyon limit aralığı 0,25 -0,75 mg/L'dir. Dedeksiyon limiti kafein için 62 aspartam için 43 ng/ml'dir. Her analitin kalibrasyon eğrisinde korelasyon değeri 0.9999 dur ve lineerdir. Bu teknik ile içecekler ve diyet takviyelerinde biyolojik aktif maddelerin tayini için uygundur [73].

Son yıllarda, gıda güvenliği hakkında endişeler artmaktadır. Farklı ülkelerde gıda katkı maddelerinin kullanımı özel düzenlemelerle sınırlandırılmıştır. Demiralay E.Ç ve arkadaşları aynı anda tatlandırıcılar ve koruyucuları (aspartam, sodyum sakkarin, asesülfam-K, vanilin, sorbik asit ve benzoik asit) tayin edebilmek için ters faz sıvı kromatografisi kullanarak analitik yöntem ortaya koymuşlardır. Yüksek oranda organik değiştiriciler kullanılarak ayırma işlemleri sağlanmıştır. Optimum kromatografik ayırma işlemi için mobil faz %15 amonyum asetat tamponu (0,005 M) içeren asetonitril

çözeltisi kullanılmıştır. En iyi sonuç pH 4.0 deki mobil faz kullanılarak YMC-ODS pack kolonu üzerinde elde edilmiştir. Tüm katkı maddeleri 40 dakika içinde ayrılmıştır. RP-HPLC-UV metodu LOD/LOQ, doğrusallık, geri kazanım ve tekrarlanabilirlik açısından valide edilmiştir. Bu yöntem toz içecekler ve alkolsüz gazlı içeceklerde bulunan α -aspartam, asesülfam-K ve benzoik asidin tayininde kullanılmıştır. [74].

Altı sentetik gıda katkı maddelerinin (aspartam, asesülfam-K, benzoik asit, sodyum sakarin, tartrazin ve sarı sünset) başarılı şekilde ayrılabilmesi için ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntem geliştirilmiştir. Yan Q. ve arkadaşları bu ayrılmayı sağlayabilmek için oda şartlarında metanol ve 0.02 mol/L amonyum asetat (pH 6.0) (30;70,v/v) içeren mobil faz ile A Eclipse XDB-C18 kolonunu kullanmışlardır. Başarılı ayırma koşulları 10 dakika içinde tüm bileşikler için optimize edilmiş gradient elüsyonu kullanılarak elde edilmiştir . Geri kazanım değerleri %90- % 109,87 arasındadır. Bu önerilen yöntem içecek numunelerine başarılı bir şekilde uygulanmıştır [75].

Amperometrik dedektör ile birleşmiş iyon kromatografisi metodu içecek ve toz formlardaki Asp tayini için önemlidir Qu, F., Qi, Z. H., Liu ve arkadaşları Dionex AS4A-SC ayırma kolonunu tatlandırıcıların diğer katkı maddelerinden ayrılmasında kullanmışlardır. Bu yöntemde ayrıca, en çok kullanılan tatlandırıcılar (sodyum sakarin, ace-K ve siklamat gibi) hiçbir elektrokimyasal sinyal vermediği için elimine edilmişlerdir [76].

Q.Chen ve arkadaşları basınçlı iletken dedektörü (Suppressed Conductivity Detector) ile iyon kromatografisinde KOH elüent olarak kullanıldığında Acoustic Echo Cancellation (AEC) tekniği ile gıda maddelerindeki dört tatlandırıcıyı (asp, ace-K, sodyum sakkarin, sodyum siklamat) ve koruyucu olan kafein, teofilin ve teobromin için uygun olduğunu bildirilmiştir [77].

Gaz kromatografisi, tatlandırıcıların çok az uçuculuğa sahip olmaları nedeniyle bu bileşenlerin tayininde çok kullanılmaz. Analiz öncesinde tatlandırıcılar mutlaka gaz hallerine dönüştürülmelidir ve bu da gaz kromatografisinin en önemli dezavantajıdır. Türevlendirme basamağı sadece çok iş ve zaman harcamaz aynı zamanda bazı düzensizliklerde meydana getirir.

Gıda maddelerindeki sakarin ve ace-K 'nın bir arada tayini GC-Azot Fosfor Detektör

(NPD) kullanılarak yapılmıştır. İki tatlandırıcıda diazometan ile analiz öncesinde metillenir [78].

2.14.1.3 Diğer Yöntemler

Kapilar Elektroferez (CE) gıda analizleri için güçlü bir analiz araçtır. Yüksek çözme gücü, az miktarda solvent tüketimi ve otomasyon kolaylığından dolayı CE çeşitli gıda maddelerindeki yüksek yoğunluklu tatlandırıcıların tayini için HPLC ye uygun bir alternatiftir. CE 'in farklı türleri tekli tatlandırıcıların ya da tatlandırıcı kombinasyonlarının analizinde kullanılır. Kapiler-bölge elektroferez (CZE), misel elektrokinetik kromatografi (MECK) ve kapiler izotakoferez (CITP) en çok kullanılan CE türleridir. Silika kapilerle doldurularak kullanılan elektrolitler genellikle fosfat, borat, benzoat yada pH 6-9 aralığındaki glisinata dayanan tamponlardır.

J.J.Pesek ve arkadaşları yaptığı çalışmalarda CZE metodu ile gıdalardaki aspartamı tayin etmek için 30 mM fosfat -19 Mm TRIS tamponulu ortamda 212 nm de dalga boyunu kullanmışlardır. HPLC den çok daha kısadır ve test edilen numunelerde hiçbir yabancı maddeye rastlanmamıştır. Bu metodun asıl dezavantajı kullanılan tamponun düşük pH (2,14) olmasıdır. Çünkü aspartam pH 3'ün altında kararsızdır [79] .

J.C.Walker alkolsüz içeceklerdeki aspartam, kafein ve benzoik asidin borattan çok daha kısa sürede göç edebilen glisin tamponu kullanılarak tayin edilebileceğini bildirmiştir. Analitlerin ayrılması pH: 9'da glisin tamponu ile sağlanmıştır ve 215 nm de spektrofotometrik olarak tayin edilmişlerdir. Yöntemin tekrarlanabilirliğinin oldukça iyi olduğu belirtilmiştir [80].

Neohesperidin DC tatlandırıcı karışımlarındaki en küçük bileşendir. J.McCourt ve arkadaşları NHDC'ni 100 mM borat tamponlu (pH:8,3) ortamda 282 nm dalga boyunda diğer tatlandırıcılardan kolayca ayrılabilmişti. Metod alkolsüz içecekler, meyve suları ve yoğurtlarda düşük miktarda olan Neohesperidin DC'nin için başarılı bir şekilde uygulanmıştır [81].

Son yıllarda tatlandırıcı tayinler için birçok yeni metod geliştirilmiştir. Fernandes V.N.O ve arkadaşları UV dedeksiyon altında kapiler zone elektroferez ile (CZE) ace-K, sakkarin ve siklamatin tayini için geliştirmişlerdir.. Aspartam, asesülfam ve sakkarini direkt, siklamati ise indirekt yoldan tayin edebilmişlerdir. Yöntemin uygulanabilirliği aspartam, siklamat ve sakkarin içeren limon poşet örneklerinin analizi ile gösterilmiştir

[82].

Alkolsüz içeceklerde gıda katkı maddeleri olarak kullanılan asp, ace-K ve sakkarinin analizi için R.A.Frazier ve arkadaşları hızlı CE metodunu sunmuştur. Bu katkı maddelerinin karışımı misel faz olarak kullanılan 62 mM Sodyum dodesil sülfat ile pH 9,5 te 20 mM karbonat tamponu kullanılarak uygun şartlar altında MECK yöntemi ile başarılı bir şekilde ayrılabilir. Numune içerikleri DAD detektörü ile UV-VIS aralıkta tayin edilmiştir [83].

CE - C⁴D (with capacitively coupled contactless conductivity) yöntemi ile tablet tatlandırıcılarda ve içeceklerdeki aspartam, siklamat, sakarin, ve asesülfam-K aynı anda, hızlı ve basit şekilde tayin edilebilmiştir. Background elektrot (BGE) 100 mmol L⁻¹ tris(hidroksimetil) aminometan (TRIS) ve 10 mmol⁻¹ histidin(His) içeren bir tampon çözeltisiyle kullanılmıştır. Fodometrik deteksiyon ile CE yöntemi ile belirlenen LOD ve LOQ değerleri düşünüldüğünden daha iyi bulunmuştur. Geri kazanım 94%-108 % aralığındadır [84].

O.Fatibello-Fihlo ve arkadaşları başka geliştirilen yöntemde spektrofotometrik FIA metodu olarak Bakır(II) fosfat ve katı faz reaktörü kullanarak uygulamışlardır. Aspartam Bakır (II) iyonları ile reaksiyona girerek Cu(II) (asp) kompleksini verir. Cu(II) iyonlarının serbest kalması başka bir renkli karışım olan alizarin kırmızısı S solüsyonu ile kompleks oluştuğu zaman gerçekleşir. Bu yöntem tablet tatlandırıcılardaki aspartamın tayini için kullanılır [85].

L.F.Capitan-Valvey çok basit duyarlı, akış yolu spektrofotometrik sensör ile düşük kalorili ve diyet ürünlerindeki aspartamın tayinini geliştirmiştir. Sensör SepHdex CM-C25 katyon değiştirici kullanılarak UV spektrofotometrik detektör ile tek kanallı akış-enjeksiyon (FI) sistemine uygulanmıştır. Aspartam hiçbir türevlendirme olmadan kendi absorbanı olan 219 nm de ölçülerek tayin edilir [86].

FIA işlemleri, kemilüminesans, spektrofotometri, FAAS ya da amperometri detektörleri ile gıda maddelerindeki Siklamatin tayini içinde önerilir.

J.F.Garcia ve arkadaşları aspartam ve asesülfam-K nın tablet tatlandırıcılarda bir arada tayini için çok analitli akış yollu sensör kullanılarak yürütmüşlerdir. İşlem taşıyıcı olarak 0,06 M pH 2,70 ortofosforik asit/Sodyum dihidrojen fosfat tamponu kullanılarak,

tek kanallı Akış Enjeksiyon Analizi (FIA) sisteminin akış yolu hücresine yerleştirilen SepHdex DAEA A-25 iyon değiştiricisinde asesülfam-K'nın geçici alıkonmasına dayanır. Bu şartlarda aspartam çok zayıf tutulur, taşıyıcının kendisini desorpsiyonundan sonra, önce aspartam sonra asesülfam-K'nın gerçek UV ölçümlerinin yapılması mümkündür[87].

Yine J.F.Garcia ve arkadaşları aspartam, asesülfam-K'nın, sakkarin, birkaç antioksidan ve koruyucuların kısa monolitik C18 ön kolonu içeren tek kanallı FIA sistemi kullanılarak, seçilmiş gıdalarda bir arada tayin etmişlerdir. Analitlerin ayrılması DAD ile yapılan miktar tayinine ve alıkonma zamanına dayanır. Bu sistem basit, düşük çözünürlüklü likit kromatografisi ile uygulanmalıdır [88].

Elektrokimyasal teknikler yapay tatlandırıcıların tayini için güçlü ve çok yönlü bir araçtır. Basit, hızlı ve ucuzdur. Ayrıca, bulanık ve renkli çözeltilerdeki analitleri bile direkt olarak tayin edebilme şansı tanır. Gıda ürünlerindeki bazı bileşikler tek başına ya da karışım halinde analiz edebilmek için geliştirilmiş birkaç elektrokimyasal teknik vardır.

2.15 Spektroskopik Yöntemlerle Miktar Tayini

Spektroskopi, bir örnekteki atom, molekül veya iyonların, bir enerji düzeyinden diğerine geçişleri sırasında absorplanan veya yayılan elektromanyetik ışımının ölçülmesidir. Tüm spektroskopik analizler, madde çözeltisinden geçen enerji miktarı ile madde içermeyen çözücünden geçen enerji miktarının karşılaştırılmasına dayanır ve böylece tayin edilen T değeri, sonrasındaki hesaplamalarda kullanılır. Bir spektrofotometrenin geçen ışın alanı genellikle 100 eşit birime bölünmüş olup % geçirgenliği onda birine kadar okuma olanağı vardır; bununla beraber konsantrasyon tüm skala üzerinde aynı doğrulukla tayin edilemez. Analizlerde T değeri 0,6 ile 0,2 arasında yer almalı, ancak konsantrasyondaki % hatanın minimuma inebilmesi için ideal absorbans değeri 0,434 olmalı ve bunun için de çözeltiler, absorbans değeri yaklaşık 0,45 olacak şekilde hazırlanmalı, pratikte ise bu değer 0,3'den az 0,6'dan çok olmamalıdır .

Nitel analizler: Geniş uygulama alanları, yüksek duyarlılık, seçicilik ve tekrarlanabilirliğin iyi olması, uygulanabilirlik ve hızlılığın iyi olması gibi nedenlerle tercih edilirler.

Nitel analizlerde, gıdalardaki saf maddelerin yapılarının saptanmasında, fonksiyonel grubun bulunup bulunmadığının incelenmesinde, bir fonksiyonel grubun bileşikteki yerinin saptanmasında kullanılır.

Nicel analizler: Nicel analizde Lambert–Beer kanunundan yararlanılır. Bu kanuna göre, absorbans konsantrasyonla doğru orantılıdır.

Tayin tek standartla, kalibrasyon eğrisi ile ve standart katma metodu ile yapılabilir. Bunun için analiz edilecek maddenin absorblayacağı ışığın dalga boyu belirlenir (bu genellikle maddenin maksimum absorbans gösterdiği dalga boyudur). Belirlenen dalga boyunda hazırlanan standart çözeltilerin absorbansları ölçülür ve konsantrasyona karşı kalibrasyon grafiği çizilir. Kalibrasyon grafiğinde standart çözeltilerin absorbası grafik denkleminde y değeri yerine, konsantrasyonu x değeri yerine konularak çizilir.

Sonra bilinmeyen (örneğin) absorbansı okunarak grafikten absorbansının kalibrasyon eğri-sini kestiği yerden x eksenin dikme indirilerekte aynı şekilde bilinmeyen konsantrasyonu tayin edilir.

2.16 Ultraviyole (UV) ve Görünür Bölge (VIS) Moleküler Absorpsiyon Spektroskopisi [89]



Şekil 2.6 UV-VIS Spektrofotometresi

UV ve görünür bölgede spektrofotometrik ölçümler gıdaların nitel ve nicel analizlerinde en çok kullanılan yöntemlerden birisidir. Maddenin ışığı soğurma

(absorplama) derecesini ölçmek ve bundan yararlanarak derişimi saptamak için, absorpsiyon (soğurma) ile derişim arasındaki ilişki bilinmelidir. Bir ışın demeti katı, sıvı veya gaz tabakasından geçerse belirli bir frekanstaki ışınların şiddeti seçimli olarak azalır. Bu olaya absorpsiyon denir. Absorbsiyon da elektromanyetik enerji maddenin atomlarına veya moleküllerine aktarılır. Moleküllerdeki her bir elektronik enerji düzeyi çok sayıda titreşim, bunlarda çok sayıda dönme enerji düzeyi içerirler. Bunun sonucu olarak moleküldeki mümkün enerji düzeylerinin sayısı fazladır ve çok sayıda absorpsiyon ihtimali vardır. Bu yüzden elektronik geçişe karşı gelen dalga boyu civarında birçok absorpsiyon piki gözlenir. Ayırma gücü çok yüksek olmayan cihazlarda, birbirine çok yakın olan bu absorpsiyon pikleri bir band şeklinde görülür. Bu tip spektruma “sürekli spektrum” denir. Atomların veya tek atomlu iyonların absorpsiyonu sonucu meydana gelen spektrum ise kesikli yani hat spetrumudur. Monokromatik (tek dalga boylu ışımaya) ve I_0 şiddetindeki bir ışık demeti, kalınlığı b cm olan bir tüpte bulunan çözeltideki herhangi bir molekül tarafından absorplandığında şiddeti azalır ve tüpü I şiddetinde terkeder. Geçirgenlik (T): Geçen ışık şiddetinin gelen ışık şiddetine oranıdır. Genellikle yüzde geçirgenlik olarak ifade edilir.

$$\%T = \frac{I}{I_0} \times 100 \quad (2.1)$$

Absorbans ile geçirgenlik arasında,

$$A = -\log T = \log I / T = \log 100 / \%T$$

$$A = \log 100 - \log \%T$$

$$A = -\log T = 2 - \log \% T \text{ ilişkisi vardır.}$$

$$A = \log(I_0/I) \quad (2.2)$$

Absorbans(A): Gelen ışık şiddetinin geçen ışık şiddetine oranının logaritmasıdır. Absorbans ile geçirgenlik ters orantılıdır. Biri artarken diğeri azalır. Absorbans birimi yoktur.

Bir çözeltinin geçirgenliği ve absorbansı; ışığın geçtiği yolun kalınlığına (küvet kalınlığı), çözeltinin konsatrasyonuna ve her bileşik için sabit olan molar absorpsiyon katsayısına bağlıdır. Moleküllerin seçilen dalgaboyundaki ışımayı absorplaması sonucu ortaya çıkan azalma Beer- Lambert eşitliği ile verilir. Bu eşitlik:

$$\log \frac{I}{I_0} = \epsilon \cdot m \cdot C = A \text{ şeklinde ifade edilir. (2.3)}$$

Burada:

I_0 : Örnek kabına giren ışık şiddeti

I : Örnek kabını terkeden ışık şiddeti

ϵ : Molar absorpsiyon katsayısı (lt / mol.cm)

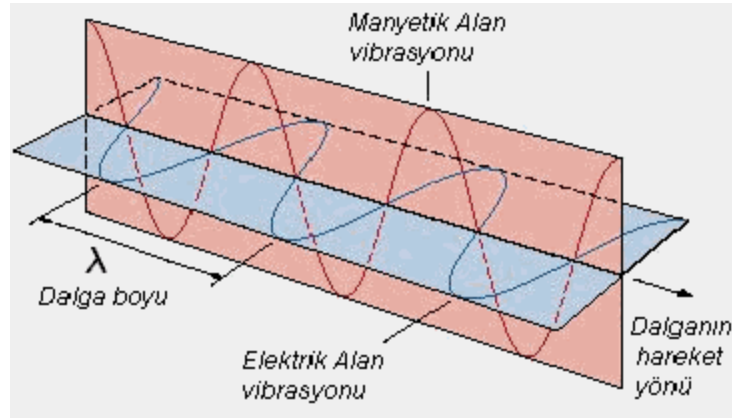
b : Örnek kabının kalınlığı (cm)

C : Derişim (mol / lt)

A : Absorbans

Molar Absorpsiyon Katsayısı (Absorptivite (ϵ)): Birim konsantrasyonda birim kalınlıktaki numunenin absorbansıdır. Birimi, b ve C 'ye bağlıdır. Çözeltinin konsantrasyonu molarite (mol/litre) cinsinden verilmişse, absorptiviteye “**Molar absorpsiyon katsayısı**” adı verilir. Absorbans, ışın demetinin geçtiği çözeltinin genişliği ve absorblayıcı türlerin konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

$$A = \epsilon \cdot b \cdot C \text{ yani } A = \epsilon \cdot b \cdot C \text{ (2.4)}$$



Şekil 2.7 X yönünde yol alan elektromanyetik dalganın elektriksel ve manyetik alan bileşenleri, dalga boyu (λ)

Işının tanecik ve dalga olmak üzere iki özelliği bulunmaktadır. Elektromanyetik ışın, dalga boyu, frekans, hız ve genlik gibi parametreleri içeren sinüs dalga modeli ile açıklanabilir.

Dalga boyu (λ) Bir ışının dalga hareketinin ard arda gelen iki maksimumu veya minimumları arasındaki doğrusal uzaklıktır ve λ ile gösterilir. Dalga boyu metre, santimetre, milimetre, mikrometre, nanometre, angström gibi çeşitli birimlerle

verilebilir.

$$1 \text{ cm} = 10 \text{ mm} = 10^4 \text{ } \mu\text{m} = 10^7 \text{ nm} = 10^8 \text{ } \text{\AA}$$

Frekans (v): Bir ışının saniyedeki periyot sayısı olup birimi s^{-1} veya buna eşdeğer Hertz (Hz) dir. Frekans, dalga boyu ve ışının yayılma hızı arasında,

$$\lambda v = v \text{ bağıntısı vardır. (2.5)}$$

Bir ışının frekansı içinden geçtiği ortama bağlı değildir. Sadece kendini meydana getiren kaynağa bağlıdır. Kaynağın sıcaklığı yükseldikçe ışının frekansı da yükselir.

Işının havadaki hızı, her çeşit ışının vakumdaki hızı aynıdır ve c ile gösterilir. Dolayısıyla yukarıdaki eşitlik,

$$C = \lambda v = 3.10^{10} \text{ cm/s şeklinde yazılabilir. (2.6)}$$

Bir ışın saydam ortamlardan (maddelerden) geçer ve hızında azalma olur. Bu azalma ortamın kırma indisiyle ilgilidir ve ortamda ışının hızı ne kadar azalırsa kırma indisi o kadar büyür. Çözeltide, uygulanan dalgaboyundaki ışığı absorplayacak birden fazla molekül varsa, absorbans toplamsal olduğundan,

$$A = A_1 + A_2 + \dots = \epsilon_1 \cdot b \cdot C_1 + \epsilon_2 \cdot b \cdot C_2 + \dots \text{eşitliği geçerlidir. (2.7)}$$

ϵ her madde ve her dalga boyu için farklı değerlerdir.

Bu eşitlikle ifade edilen kanuna Lambert – Beer Kanunu denir. Absorpsiyon ölçümlerinin temel kanunudur. Lambert-Beer kanunu seyreltik çözeltiler için geçerlidir. 0.01 M ‘dan daha seyreltik çözeltiler için uygundur.

2.16.1 Lambert-Beer Yasasından Sapmalar

➤ **Derişim Etkisi (Tabii sapma):** 0.01 M ‘dan daha derişik çözeltilerde sapma olur. Nedeni artan tanecik sayısı nedeniyle taneciklerin etkileşimleri artar ve molar absorpsiyon katsayısını değiştirirler. Ortamdaki absorpsiyon yapmayan türler fazla ise de sapma olur. Kırılma indisi derişimle artar. Ancak bu düzeltilebilir. 10^{-2} M ‘dan daha derişik çözeltilerde kırılma indisi önemsizdir.

➤ **Kimyasal Sebepler (Kimyasal sapma):** Absorplayıcı türlerin çözücü ile kimyasal reaksiyonları sonucu gözlenen sapmadır. Absorpsiyon yapan türün derişimi kimyasal reaksiyonlar sonucu değişiyorsa absorbans da değişir. Ortamdaki asitler ve çözücü

önemli etkindir.

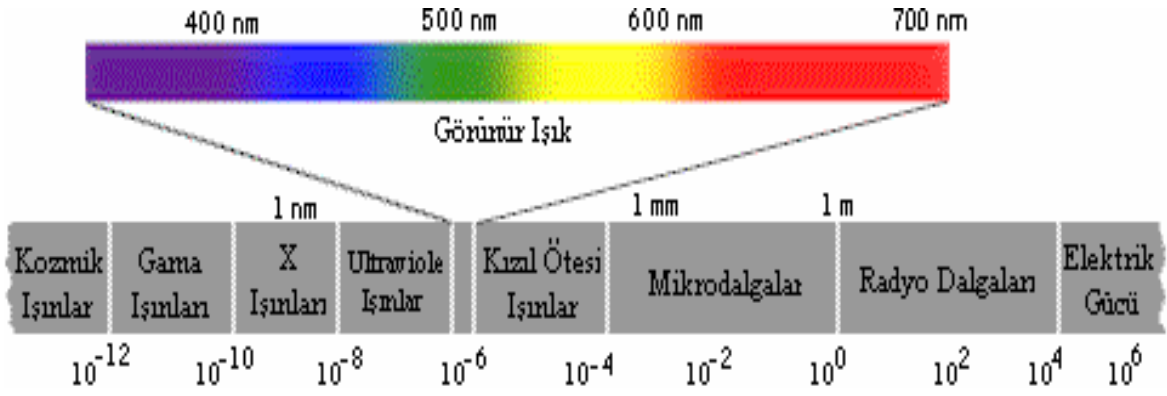
➤ **Cihazdan Kaynaklanan Sebepler (Aletsel sapma):** Kullanılan ışığın tek dalga boyulu olmamasından kaynaklanan sapmadır. Etkin bant genişliği geniş olan cihazlarda seçimlilik az olacaktır. Çünkü dalga boyu aralığı biraz fazla olacağı için soğurma yapan başka türlerde ölçülmüş olur. Cihazın parçalarından kaynaklanan saçılmalar ve yansımalar dedektöre ulaşırsa yanlış değerler elde edilir. Beer'den sapma olduğunda A (Absorbans) ve C (Konsantrasyon) arasındaki ilişki lineer değildir.

Beer- Lambert eşitliğinin geçerli olması için şunlar sağlanmalıdır:

- Uygulanan ışık monokromatik olmalıdır.
- Örnek homojen olmalıdır. (absorpsiyonun örneğin her yerinde eşit olması için)
- Birden fazla bileşen varsa, her bir bileşen diğerlerinin absorpsiyonunu etkilememelidir.
- Absorbans ölçümü sırasında numunede herhangi bir reaksiyon olmamalıdır.
- **Elektromanyetik ışıma türleri,**
 - ➤ Gözle algılayabildiğimiz görünür ışık ve ısı şeklinde algılayabildiğimiz infrared
 - (kırmızı ötesi) ışınları;
 - ➤ X-ışınları,
 - ➤ Ultraviyole (mor ötesi),
 - ➤ Mikrodalga
 - ➤ Radyo ışımalarıdır.

Spektroskopide yaygın bir şekilde kullanılan spektrum bölgelerinin dalga boyu ve frekans aralıkları (Şekil 2.8) belirtilmiştir

Görünür bölge ve mor ötesi (UV-VIS) spektroskopisi moleküllerdeki elektronik geçişlerin verdiği spektrumları konu alır ve ikisi birden elektronik spektroskopi olarak adlandırılır. Elektronik spektrum 100-700 nm aralığını kapsar; 100-200 nm aralığı Vakum UV, 200-400 nm aralığı UV (veya yakın UV) ve 400-700 nm aralığı görünür bölgedir. Bir bileşik görünür bölgede absorpsiyon yaparsa renklidir ve absorbladığı rengin tamamlayıcı renginde görünür. Örneğin, viyolede absorpsiyon yapan bir bileşik yeşildir.



Şekil 2.8 Elektromanyetik spektrum bölgeleri

Mor ötesi ve görünür bölge spektrofotometrelerinde cam veya kuvars prizma bulunur ve kullanırken ışığın herhangi bir frekanslı UV veya görünür bölgesi seçilir. Işık örnekten geçtikten (veya örnek çözeltisinden) sonraki absorpsiyonu (soğurganlığı) veya geçirgenliği okunur. UV bölgesinde en uygun ışık kaynağı hidrojen deşarj tüpü ve görünür bölgede tungsten lambasıdır. Otomatik spektrofotometreler, frekansı düzgün olarak değiştirir.

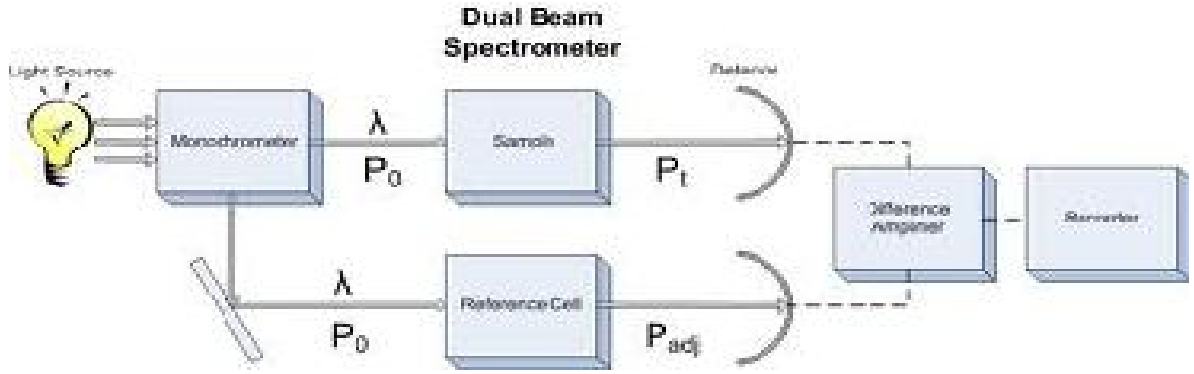
Tekışık yollu spektrofotometrelerde, bileşenlerin tümü aynı ışık yoluna yerleştirilmiştir. Bu aletin başlıca üç ayar düğmesi vardır: Bunlardan biri, alette kullanılan optik ağ veya prizmayı mekanik olarak döndürmeyi sağlayan düğmedir. İkinci düğme, ışık yolunu tamamen kapatarak galvanometre “sıfır” geçirgenlik ayarını yapmak içindir. Üçüncü düğme, ışığın geçtiği aralığın enini değiştirir. Ölçümün yapılacağı dalga boyu birinci düğme ile ayarlandıktan sonra ışık yolu kapatılarak ikinci düğme ile “sıfır” ayarı yapılır. Daha sonra üçüncü düğme ile ışığın geçtiği aralığın eni değiştirilerek ve örnek kabında sadece çözücü kullanılarak galvanometre 100 değerine getirilir. Sıfır ve 100 ayarları her dalga boyunda yeniden yapılmalıdır.



Şekil 2.9 Tek Işık Yollu Spektrofotometre

Çift ışık yollu spektrofotometrelerde, monokromatörden çıkan ışık, eşit şiddette iki demete bölünerek biri örneğe diğeri sadece çözücünün bulunduğu kaba gönderilir. İkiye ayrılan ışık, iki ayrı dedektörle algılanır ve dedektörlerde oluşan sinyallerin oranı

ölçülür. Böylece örnekteki geçirgenlik değeri sürekli olarak çözücününki ile karşılaştırılmış olur.



Şekil 2.10 Çift Işık Yollu Spektrofotometre

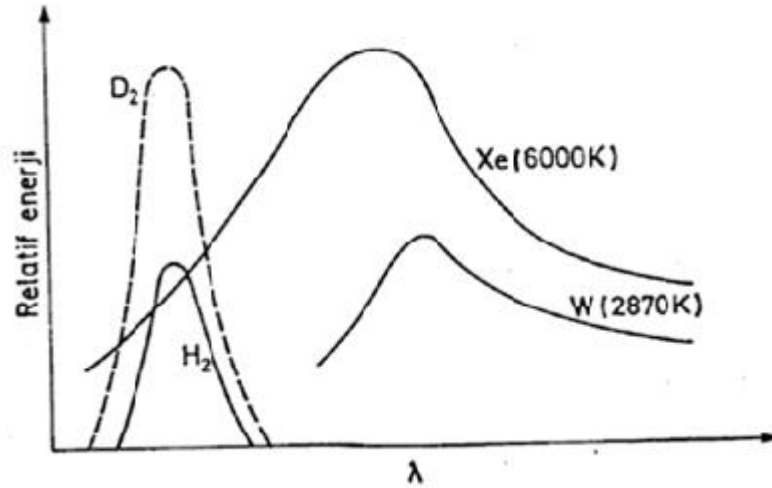
Burada iki dedektörün tam uyumlu olması, yani eşit şiddetteki ışık ile aynı sinyal oluşması gerekir [90] .

1. Çift ışık yollu spektrofotometrelerde, tek dedektör kullanılarak da ölçüm yapmak mümkündür. Örnekten ve çözücüden geçen ışık demetleri dedektör üzerine art arda gelir ve alternatif türden sinyal oluşturur. Işık şiddetleri eşit ise dedektörde herhangi bir sinyal oluşmaz; örnek bölmesinden gelen ışığın şiddeti absorpsiyon nedeniyle azaldığı zaman dedektöre gelen sinyal alternatif sinyal olarak algılanır. Çift ışık yollu spektrofotometrelerin bir başka türü çift dalga boylu spektrofotometrelerdir. Çift dalga boylu spektrofotometrelerde iki farklı monokromatör vardır; iki farklı dalga boyundaki ışık, dönen bir ışık bölücü yardımıyla örnekle art arda etkileştirilir. Bulanık çözeltilerde dalga boylarından biri çözeltideki maddenin absorplayacağı, diğeri ise absorplamayacağı değerlere ayarlanır. Bulanıklıktan dolayı her iki dalga boyunda aynı miktarda ışık kaybı olacağından iki dalga boyunda yapılan ölçümlerin farkı, sadece örneğin absorbansı ile ilişkilidir.

a) Işın Kaynakları

UV-görünür bölgede döteryum (D_2), tungsten (W), hidrojen (H_2), ksenon (X_e), civa buhar lambası gibi sürekli ışık kaynakları kullanılır. Tungsten flaman lambası, görünür ve yakın IR bölgede (320-3000 nm) ışık yayar. Tungsten lambasının içinde bir miktar iyot veya brom buharı bulunursa lambanın ömrü artar ve bu lamba tungsten-halojen lambası olarak adlandırılır. Ultraviyole bölgede en çok kullanılan lambalar, H_2 ve D_2 elektriksel boşalım lambalarıdır. Bu lambalar 180-380 nm arasında ışık yayar. Daha

pahalı ve daha uzun ömürlü olan D_2 lambasının yaydığı ışığın şiddeti H_2 lambasına göre çok daha fazladır. Xe ark lambası, UV-görünür bölgenin tümünde (150-700 nm)kullanılabilecek şiddetli ve sürekli ışık kaynağıdır. Civa buhar lambası, her iki bölgede ışıma yapabilen bir ışık kaynağıdır; sürekli spektruma ek olarak kesikli hatlar da içerir [91] .



Şekil 2.11 D_2 , W, H_2 ve Xe Lambalarının yaydıkları ışımın spektrumları

b) Monokromatörler

Işık kaynağından gelen polikromatik ışıktan tek bir dalga boyundan monokromatik ışık elde edilmesinden gerçekleştirilen düzeneklerdir. Monokromatör, filtreli fotometrelerde ışık filtresidir; Spektrofotometrelerde ise ışık prizmasıdır. Örnek üzerine gönderilen ışığın daha monokromatik olmasını sağlamak için bazı spektrofotometrelerde çift monokromatör kullanılır.

c) Numune Hücresi

Cam veya kuartz olabilir. Cam prizma düşük UV ışınlarını iyi geçirmediğinden görünür bölge için uygundur. Kuartz prizmalar ise hem UV ışınlarını iyi geçirir, hem de görünür ışık ve IR' e yakın bölgelerde çalışmaya elverişlidir. Kuartz prizmalar cam prizmalarla karşılaştırıldığında daha pahalıdır.

d) Dedektör

Maddenin ışığı absorplayıp absorplamadığını anlamak için ışık kaynağından gelen ışığın şiddetinin ölçülmesi amacıyla kullanılan düzenektir. UV-görünür bölgede

kullanılabilen üç tür dedektör vardır.

-Fotovoltaik dedektör

-Fototüp

-Fotoçoğaltıcı tüp

2.16.2 UV-VIS Spektroskopisinin Uygulama Alanları [92]

a) Yapı Bulunması

Elektronik spektrum, özellikle bir kromofor grubunun olup olmadığını anlamak için kullanılır. Bir kromofor için bilinen bir yerde, bir absorpsiyon pikinin varlığı, örnekte böyle bir grup bulunduğuna dair bir kanıttır. Ama diğer grupların da aynı yerde absorpsiyon yapabileceği düşünülürse yalnız UV spektrumu ile yapı hakkında karar verilemeyeceği anlaşılır. Fakat olasılıkların sayısı azaltılırsa çok faydalı bilgi elde edilebilir. Örneğin, asetonun kendi-kondenzasyon ürünü iki izomerdir. UV spektrumu ile maddenin hangi izomer olduğu kolayca bilinebilir çünkü biri konjuge dir.

b) Kalitatif Analiz

Bilinmeyen bir madde, spektrumu bilinen ve o olduğu sanılan bir maddenin spektrumu ile karşılaştırılarak veya literatürdeki spektrumlardan yararlanılarak bulunabilir.

c) Kantitatif Analiz

Bir karışımdaki bir bileşiğin yüzdesi, karışımın ve saf bileşiğin spektrumlarındaki pik yüksekliklerinin ölçülmesiyle bulunabilir.

d) Moleküllerin Stereokimyasının Araştırılması

Bifenillerde engellenmiş dönme UV ile araştırılabilir. Moleküldeki halkaların aynı düzlemde oluşunu ortaya çıkaran $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişi maksimum $\lambda_{\text{maks}} = 260 \text{ nm}$ ($\epsilon = 163000$) dedir. o-durumunda büyük guruplar varsa aynı düzlemde oluş engellenir; dimesitil'de ise $\lambda_{\text{mak}} = 267 \text{ nm}$ 'dedir ve bu değer mesitilenin değerinden çok az farklıdır.

e) Geometrik İzomerlerin Konformasyonlarının Bulunması

Geometrik izomerlerde cis şekli daha çok sterik engellenmiştir. Trans şekli ise elektron sisteminin aynı düzlemde oluş özelliği daha kolay kazanır. Dolayısıyla trans şekli daha yüksek dalga boyunda absorpsiyon yapar; molar absorptivitesi de daha büyüktür.

f) Denge Sabitlerinin Bulunması

Tautomerik sistemlerde ve diğer dengelerde bileşiğin iki şekli değişik dalga boylarında absorpsiyon yaparlar ve her birinin kantitatif analizi, denge konsantrasyonlarını ve denge sabitini verir. Mesela keto ve enol şekillerinde bulunabilen asetoasetesteri için enol şekli konjuge olduğundan daha yüksek şiddette absorpsiyon yapar.

g) Reaksiyon Kinetiği ve Reaksiyon Ara Ürünlerinin Bulunması

Zamana bağlı olarak bir reaksiyon süresince ortamdaki bazı moleküllerin azalmasını ile absorp-siyonundaki değişmeye bağlı olarak reaksiyon kinetikleri bulunabilir. Ayrıca enzimatik tepkime-lerde de yine aynı yöntemle enzim kinetiği sabitleri olan K_m ve V_{max} kinetik sabitleri de bulunabilir. Tepkimeler sonucu oluşan yeni ürün farklı bölgelerde farklı absorpsiyon vermesi ile bu ara ürünün oluşumu takip edilebilir.

2.16.3 UV-VIS Spektroskopisini Etkileyen Etmenler [93]

2.16.3.1 Absorbans Ölçümlerinin Hassasiyetini Etkileyen Faktörler

a) Rastgele Dalgalanmalar

Büyük veya küçük absorbansların ölçümü yapıldığında rastgele dalgalanmalar ile ortaya çıkan belirsizlikler daha büyüktür. Absorpsiyon ölçümünde hassas bir sonuç almak için örneğin konsantrasyonunu ya da hücre yolunu düzenleyerek absorbans değerinin 0.1 ile 1.0 arasına çekilmesi gerekir (genellikle üst sınır 5.0'dır). Fotodiyot ve Fototüp gibi ısı gürültü sınırlı dedektörle teorik en düşük hata absorpsiyonun 0.43 civarındayken; Fotoçoğaltıcı gibi vuruş gürültü sınırlı dedektörlerde ise bu değer 0.86 civarındadır.

b) Sıcaklık Etkisi

Örneğin absorbansı sıcaklığa bağlı olarak değiştiğinden ölçüm sırasında sıcaklığın sabit olması önemlidir. Sıcaklık ile absorbansın değişmesi şöyle açıklanabilir: Yüksek sıcaklıklarda elektronik geçişlerin çok daha kolay gerçekleşebilmesinden dolayı pikler çok net olarak görülmeyebilir. Başka bir ifadeyle ortamdaki ısı enerjisi elektronları kinetik enerjisi değiştirdiğinden sıcaklık ile absorbans değişebilir.

c) Homojen Olmayan Örnekler

Homojen olmayan örneklerin her bölgesinde farklı absorpsiyon spektrumları elde edileceğinden absorpsiyonu incelenen madde hakkında doğru bilgi vermez. Hassas, doğru sonuçlar için çözeltinizin homojen olması gerekir.

2.16.3.2 Absorbans Ölçümünün Doğruluğunu Etkileyen Faktörler

a) Spektrofotometrik Etmenler

Dedektör cevabının doğrusallığından ölçülen radyant güce doğru herhangi bir sapma doğrusal olmayan hata doğurabilir.

Eğer herhangi bir absorpsiyon piki çok hızlı okunursa veya hesaplama yapmak için okumaya yeterli zaman olmadığı koşullarda bir hesaplama hatası oluşabilir.

İki ışınlı spektrofotometrelerde iki ışık iletim güç kaynağında birbirine tamamen eş değilse ya da eş olduğu doğrulanmadıysa bir base-line hatası oluşur.

b) Dalga Boyu Hassasiyeti

Eğer örnek hücreğine giren ışının (ortalama) dalga boyu ile spektrofotometrede belirtilen dalga boyu arasında fark varsa soğurmada bir hata belirebilir. Bu hataya dalga boyu hatası denir.

c) Spektral Bant Genişliği

Doğru spektrumun görüntülenmesi için, özellikle bir soğurma bandının gerçek maksimum değerini, cihazın spektral bant genişliği $\Delta\lambda$, absorpsiyon bant genişliğinden daha az olmalıdır.

d) Kaçak Işıma

Belirli bir dalga boylu ışını geçirmek üzerine kurulmuş spektrofotometreler her zaman başka dalga boyuna sahip kaçak ışınları da örnekten geçirir. Eğer örnek bu kaçak ışını ölçülmek istenilen dalga boylu ışıdan daha fazla soğursa hata oluşur.

Bu hataya kaçak ışın hatası denir.

e) Polarizasyon

Monokromatörü terk eden ışın nadiren tek kutuplu (unpolarized) olmayabilir. Bir örneğin (özellikle bir katının) absorbandsının etkileştiği ışının polarizasyonuna bağlı olduğu gerçeğinden ve fotodedektörün polarizasyon bağımlı cevabından dolayı polarizasyon hatası oluşur.

f) Optik Işın Demeti Etkileri

Dalga boyu tarayan spektrofotomelerde bulunan fotodedektörlerdeki görüntü konumunun değişmesi ile hata oluşur. Etkileşen ışığın yansıması (mesela hücre duvarlarından) diğer bir hatadır ve gerçek absorbands değerinden daha yüksek bir değer okunmasına sebep olur.

g) Saçılma

Parçacık maddelerin (emülsiyonlar, miseller...) varlığı ışının saçılmasına neden olur. Bu iletilen ışının zayıflamasına neden olur. Ayrıca ölçülen absorbands çok fazla olabilir.

h) Floresan Etkiler

Bazı örnekler, etkileştiği ışınım demeti ile floresan ışığı yayarlar. İletilen ışın demetine ek olarak floresan hatalı okumalara sebep olur. Eğer fotodedektör örneğe yakın ise bu hata daha rahat fark edilir.

İ) Hücre Faktörleri

Eğer kaynaktan çıkan ışık numune kabının camına dik olarak düşmez ise ya da camda kirlilik var ise (parmak izi gibi) ya da camda kusurluluk varsa örneğin ölçülen absorbandsında hata görülebilir.

İ) Örnek Kararlılığı

Bazı örneklerin absorpsiyonlarında fotokimyasal tepkimeler, agregatların oluşumu gibi olaylar sonucunda değerleri değişebilir.

2.16.3.3 Absorpsiyon Spektrumunda Cihaz Kaynaklı Olmayan Etmenlerin Etkileri

Absorpsiyon spektrumunu etkileyen, Lambert-Beer yasasından sapmalara neden olan bazı faktörler Çizelge 2.11’de belirtilmiştir. Spektrumdaki değişimler az bir bant şeklindeki değişim ile dalga boyu kayması şeklinde ya da bant şeklinde ve konumunda büyük değişiklikler şeklinde görülür.

Çizelge 2.11 Cihaz harici absorpsiyon spektrumunu etkileyen etmenler ve bu etmenlerin sebep olduğu sorunlar [93]

Faktör	Sorun
Konsantrasyon	Kendiliğinden Birleşme (Agregat Oluşumu)
pH	Asit-Baz Dengesi
Zaman	Isıl Kimyasal Reaksiyonlar
Güç (Işık Saçma)	Fotokimyasal Tepkimeler, Fotokromizm
Başka Bir Reaktif Molekül Varlığı	Kompleks Oluşumu
Sıcaklık	Termokromizm
Çözücü	Çözünen-Çözücü Etkileşimleri

a) **Spektroskopik Yöntemlerde Kullanılan Küvetler**



Şekil 2.12 Kuvars Küvetler

Küvet içine ölçüm yapılacak çözeltinin konduğu kaptır. Tüp veya dört köşe olabilir. Daha çok dört köşe küvetler tercih edilir. Küvetlerin ışık geçiren kısmı cilalı diğer yerleri ise buzludur. Küvetler soft veya borosilikat cam, kuvars veya plastikten yapılır. Cam küvetler görünür bölgedeki (320-700 nm) ölçümler için kullanılır. UV dalgalar için cam küvetler uygun değildir.

Çünkü cam küvetler bu bölgede absorpsiyon yaparak ölçüm hatasına yol açar. Asidik çözeltilerde soft camlar, bazik çözeltilerde ise borosilikat camlar uygundur.

Kuvars küvetler ise hem UV hem de görünür bölge için kullanışlıdır. Özel üretilmiş kaliteli plastik küvetler ise 200-700 nm arasında rahatlıkla kullanılabilir.

Plastik küvetler ucuz olmalarına karşılık kullanım sırasında kolayca çizilebilmeleri sebebiyle uzun ömürlü değildir. Kuvars küvetler ideal olmakla birlikte çok pahalıdır. Cam küvetler ise ucuz ve dayanıklı oldukları için en çok kullanılan küvetlerdir.



Şekil 2.13 Cam Küvet

Spektrofotometrede doğru bir ölçüm yapabilmek için;

- Dalga boyuna uygun, birbiriyle uyumlu, iyi kalite küvetler kullanılmalı,

Küvetlerin temiz ve çizilmemiş olmasına dikkat edilmeli,

- Aşınma ve eskimeden gelebilecek farklılıkları belirlemek için küvetler düzenli olarak birbirlerine karşı kalibre edilmeli,

- Küvetler cihaza yerleştirilirken ışık giriş ve çıkış yönlerine küvetlerin cilalı kısımlar gelmeli,

- Kullanım esnasında cilalı olan kısımlardan tutulmamalı,

- Cihaza yerleştirmeden önce saydam olan temiz kağıt ile kurutulmalı,

- Küvetler kurutma veya başka amaçlarla ısıtılmamalıdır.
- Küvetler kullanıldıktan hemen sonra eşme suyu ve ardından saf sudan geçirilmelidir.
- Aşırı kirlenen küvetler deterjanlı su, eşme suyu ve saf su ile sırasıyla yıkanmalıdır.
- Kesinlikle fırça kullanılmamalıdır.
- Deterjanla da temizlenemeyen küvetler %20'lik nitrik asit içerisinde bir gece bekletildikten sonra saf sudan geçirilmelidir. Küvet temizliğinde %10'luk NaOH'da kullanılabilir. Ancak küvetler bu çözeltide fazla bırakılmamalıdır [94].

b)K r (blank ya da baseline) Alma

Spektrofotometrik cihazların birçoğunda ( zellikler UV, FTIR) absorpsiyon ölçümü yapılırken ışık sadece hedef moleküllerle değil çözelti ile de etkileşime girer. Dolayısıyla cihaz bize hedef molekülün absorpsiyon spektrumunu vermez, çözeltinin spektrumunu verir. Bunu önlemek için, sadece hedef molekül türünün absorpsiyonunu öğrenmek için k r (blank) alınır. Bu işlemin bir diğer adı dara almaktır. Çift ışık yollu spektroskopilerde bir hücreye numune konulurken diğerine çözücü konulur. Tek ışık yollu spektroskopilerde ilk önce  z c n  kuvartz küvete konularak dara alınır. Daha sonra ölçüm alınır.

Başka bir kaynakta k r şöyle tanımlanmıştır:

Spektrofotometrede okuma yapmadan önce absorbansı sıfıra veya % transmittansı 100'e ayarlamak için kullanılan çözeltidir. Bu amaçla yapılan işleme k r ayarı veya 0 ve 100 ayarı denir. Üç tip k r çözeltisi vardır.

Bunlar:

c) Optik k r; standart çözelti serisi hazırlanırken stok standart çözelti hariç diğer kimyasalların konulmasıyla hazırlanan 0.0 konsantrasyonlu çözeltidir.  zeltilerden ve küvetten gelebilecek absorbansları ortadan kaldırmak için kullanılır. Bunun analiz öncesi yapılması zorunlu olmakla beraber analiz sırasında da yapılması gerekebilir.

d) Reaktif k r ; bulanık veya renkli reaktifler kullanıldığında içinde sadece o reaktifin olduğu k r çözelti olup o reaktiften gelebilecek absorbansı tespit etmek için

kullanılır.

e) Numune körü; renkli veya bulanık numunelerin kullanıldığı ölçümlerde numunenin renginden gelebilecek absorbansı tespit etmek için kullanılan, içinde sadece numunenin bulunduğu kör çözeltilidir. Spektrofotometre optik köre karşı sıfıra ayarlanmışsa reaktif körünün absorbans değeri, numune ve standartların absorbansından çıkarılır. Numune körünün absorbansı ise sadece numunenin absorbansından çıkarılarak hesaplama yapılır.

2.17 Türev Spektrofotometrisi [95]

2.17.1 Türev Tekniğinin Gelişimi

1978'de yüksek kalitede UV-VIS türev spektrumlarını online ölçüm yaparak henüz yeni geliştirilmiş, düşük gürültülü RC devresi olan, düşük geçirgen filtreli ve düzleme modülü olan cihaz aracılığıyla dokuzuncu dereceye kadar üreten ilklere dendi. Fell ikinci derece türevleri üretmek amacıyla online bağlanmış analog cihazlarını kullandı. Butler dijital metodlarla altıncı ve sekizinci derece spektrumları hesapladı ve Sasaki on üçüncü dereceye kadar boyaların üst düşümlü türev spektrumlarını dijital metodlar kullanarak çalıştı.

Yıllar geçtikçe ticari olarak elde edilebilir türev cihazları geliştirildi. Şu anda pratik olarak bütün yeni spektrofotometreler en az ikinci derece türev sistemine uyumlu, birçoğu en çok dördüncü derece ve bazıları altı hatta dokuzuncu dereceye kadar çıkabilmektedir.

2.17.2 Teorik Önemi

Sarmal spektrumların açık çözümlenmesi için birçok metod vardır. En önemli olanlar kısaca bu bölümde işlenmiştir.

a) Optik metod

Monokromatör sliti ışık kaynağının band genişliğini sınırlayan bir faktördür. Bu yüzden slit aralığının daraltılması doğrusal olarak spektral çözünürlüğü artırır, fakat ışık enerjisi üstel ikinci derece ile azalır. Optik bölgedeki aralık uzaması aynı zamanda çözünürlüğü arttırmaktadır. Tersinir olarak ışık enerjisi ışık kaynağı ile çoğaltıcı arasındaki uzaklığın karesi ile azalır. Şüphesiz optik ağda mm başına ne

kadar çok çizgi varsa çözünürlük o kadar fazla yüksek olacak ve optik ağ çözünürlük sınırına 2000-2400 çizgi sınırlarında ulaşılacaktır.

Belirli bir süre önce çok dar band genişliğine sahip lazerler geliştirildi. Daha önceleri belirli bir noktaya odaklanmış lazer ışığı odaklanmış noktadaki maddelerin bozunmasına neden olmakta bundan da öte lazer tarafından yayılan ışının dalga boyu çok küçük bir aralıkta değiştirilebilmekteydi (50–100 nm) .

b) Düşük sıcaklık spektroskopisi

Düşük sıcaklıklar, komşu moleküller arasındaki enerji alışverişini azaltır. Bazı maddelerin absorpsiyon bandları sıvı halde oda sıcaklığında ölçüldüğünde gaz fazındaki gibi keskin bandlar elde edilir. Buna ilave olarak absorpsiyon band yüksekliği soğutularak bir katı buz kristal yapısına yerleştirildiğinde düşebilir. Bu durum zayıf bandların gözlemlenmesinde yararlı bir durumdur. Band yüksekliğindeki artış ise ışığın geçtiği yoldaki uzamadan kaynaklanır ve aynı zamanda katı yapı içerisindeki mikro kristal yapılar yansıma yoluyla bu artışı etkileyen sebeplerdendir. Eğer band genişliği düşük sıcaklıklarda düşürülürse analiz için birbiriyle örtüşmeyen uygun bandlar elde edilir.

Pratik ölçümlerde, maddelerin spektrumlarının alınması için özel aletlerin kullanılması gerekir. Bir Dewar kabı iki düzlemsel silika diski etrafına yerleştirilebilir. Kuru azot gazı akımı bu pencereler üzerinde oluşacak yoğunlaşmayı önleyebilir. Diğer bir yöntemde ise fiber optik kablolar kullanılarak, vakum altında yine iki silika disk arasında ölçümler gerçekleştirilebilir. Temel olarak sıvı azot ve helyum soğutucu maddeler olarak kullanılır .

c) Hesaplama metodları

- Eğriye uydurma metodu

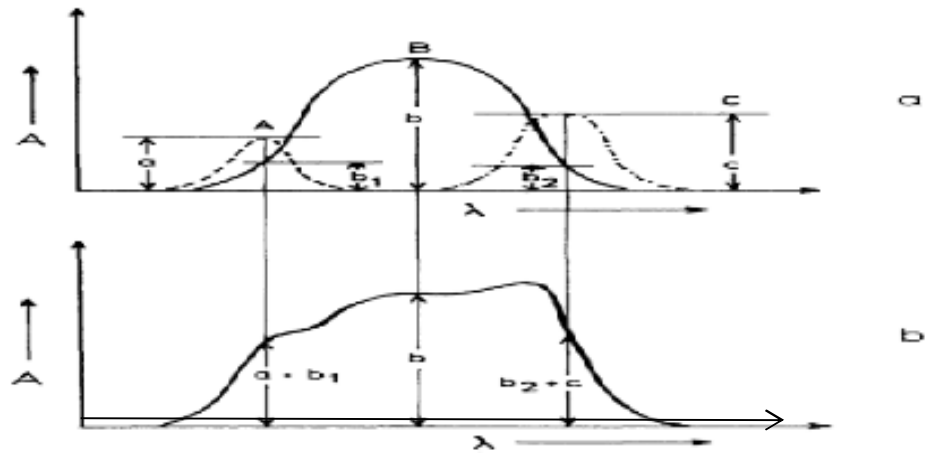
Eğriye uydurma metodu görsel pik tanınmasına en uygun yaklaşımı vermektedir. Fakat bu açık bir şekilde bilinen bir profil fonksiyonunu gerektirir. Bunun için en yüksek nokta bulunur. Daha sonra spektrum profil fonksiyonu yardımı ile ana bileşenlerin teorik spektrumları hesaplanır. Daha sonra en küçük kareler metodunun başarısız olduğu noktalarda belirli değerlere ulaşmak için spektruma ilave pikler eklenir. Eğer en küçük kareler toplamı yeterince küçükse hesaplamalara devam edilir. Büyük

belirsizlikleri ortadan kaldırmak için pik profilleri ve pik sayısı kesin olmalıdır. Piklerin birbiri üzerine örtüşmesi halinde pik şekline, yüksekliğine ve genişliğine bağlı olarak pik sayısını değiştirir.

-Sayısal çok bileşenli analiz

Eğer birbiri üzerine örtüşmüş üç pik düşünülürse ve her üçünün ayrı ayrı saf standart absorpsiyon spektrumu bilirse Lambert-Beer yasasına göre herhangi bir dalga boyundaki absorpsiyon (A) her bir maddenin ayrı absorpsiyonları toplamına eşittir.

Pratikte çok bileşenli analiz için genel olarak iki yol vardır. a) Ölçülen dalga boyu sayısı ve denklem sayısı madde sayısına eşittir. b) Ters durumda ise ölçülen dalga boyu sayısı ve kullanılan denklemlerin sayısı madde sayısını geçebilir. Her iki durumda, eğer en uygun nokta seçilirse bilinmeyen madde ve açıklanamayan bir zemin sinyali bulunmaması durumunda çok kesin sonuçlar elde edilir. Karışık spektrumları doğru bir şekilde çözmenin bir yolu türev hesaplamaları kullanmaktır. Her bir standart spektrum çözücü spektrumu ile birlikte birinci, ikinci ve daha yüksek derecedeki bir türeve dönüştürülür.



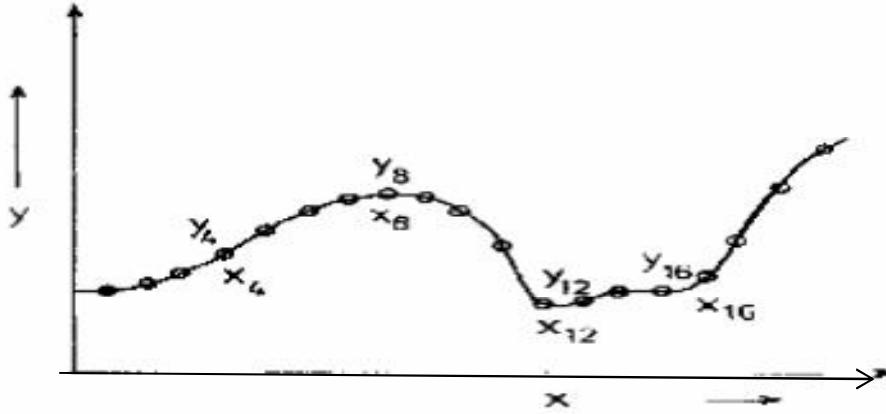
Şekil 2.14 Üç pikin üst üste gelmesi

a) Tek pik A (---), B (___), ve C (-..)

b) Toplu şekilde kullanılan denklem sayısı (denklem sayısı madde sayısını belirtir), eğer doğru nokta alınırsa bilinmeyen madde veya karışım her iki durumdan da bulunabilir.

- Fourier yöntemi

Karışık sinyallerin çözümü için alternatif bir sayısal metod da, eğrilerin frekans spektrumlarını analiz eder. Fourier transform analizi olarak adlandırılan bu metod deneysel olarak oluşturulmuş sinyallerin sinüs ve kosinüs fonksiyonlarını kullanır. İlk olarak eşit aralıklarla yerleşmiş $2m$ noktaları seçilir.



Şekil 2.15 Fourier için bir eğri üzerinde noktalar; simetriden sinüs ve cosinüs bulunur. Bu durum sinüs ve kosinüs fonksiyonlarının simetrik oluşunu sağlayacağından çözüm için avantaj sağlayacaktır. Fourier analizinde en karışık operasyon:

$$f(x) = a \sum_{n=1}^{\infty} \left(a_n \cos \frac{nx}{1} + b_n \sin \frac{nx}{1} \right), n = 1 - \infty \quad (2.8)$$

Bu denklem Fourier katsayıları olan a ve b 'nin hesaplanmasında kullanılır.

2.17.3 UV-VIS Türev Spektroskopisinin Alanları [92]

λ_{max} 'ın belirlenmesi:

Orijinal spektrumda, maksimum absorpsiyon dalga boyunda 1. türev eğrisini sıfırdan geçiyorsa, bu dalga boyu daha doğru bir şekilde saptanabilir.

Rezolüsyondaki artış:

Türev spektrumlarında, orijinal spektrumda zor görülebilen ince yapı ortaya çıkar, yani rezolüsyonda artış meydana gelir. Bunun için çift sayılı türev spektrumları daha

avantajlıdır. çünkü orijinal spektrumda bulunan maksimum ve minimumlar, bu spektrumlarda yine aynı dalga boylarında birer ekstremum halinde ortaya çıkar.

İdentifikasyon:

Özellikle absorpsiyonu görünür bölgede olan renkli maddelerin absorpsiyon spektrumları geniş bantlar halinde olduğu için, bu spektrumlar maddenin tanınmasında önemli değildir. Buna karşın orijinal spektrumdaki yan çıkıntının türev spektrumlarında, özellikle yüksek dereceli olanlarda ekstremum haline dönüşmesi, piklerin sayısının artması ve keskinleşmesi ile spektrumun ince yapısı ortaya çıkan infrared spektrumlarına benzeyen spesifik durumlar elde edilir.

Bulanık Çözeltiler Kantitatif Analiz:

Bulanık çözeltiler ve içinde süspanse ya da emülsifiye katı veya sıvı maddeler olan çözeltilerle spektrofotometrik ölçümlerin yapılması zordur. Özellikle UV alanda ışın saçılması sebebi ile analitin spektrumu kuvvetli ya da zayıf absorpsiyonu ile çakışır. Türev spektrumundaki uygun pik-pik uzaklıkları değerlendirilerek, bulanıklığın spektrum üzerindeki bu olumsuz etkisi giderilebilir.

Matriks etkisinin giderilmesi:

Türev spektrumları alınması ile orijinal spektrumdaki keskin spektral özellikler kuvvetlenmekte ve keskinleşmekte, buna karşın geniş ve yaygın bantlar daha da basıklaşmaktadır. Böylece analit piki ile çakışan değişken zemin absorpsiyonu etkisi giderilebilir.

Saflık kontrolü:

Türev spektrumlarındaki spektral ayrıntılar, maddelerin saflık testlerinde de avantajlıdır. Eser miktardaki safsızlıkların küçük absorpsiyon pikleri, türev spektrumlarında daha kolay saptanabilen pikler haline dönüşür. Bu spektrumların, saf maddenin aynı koşullarda kaydedilen türev spektrumları karşılaştırılması ile saflık kontrolü yapılabilir.

Eser madde analizi:

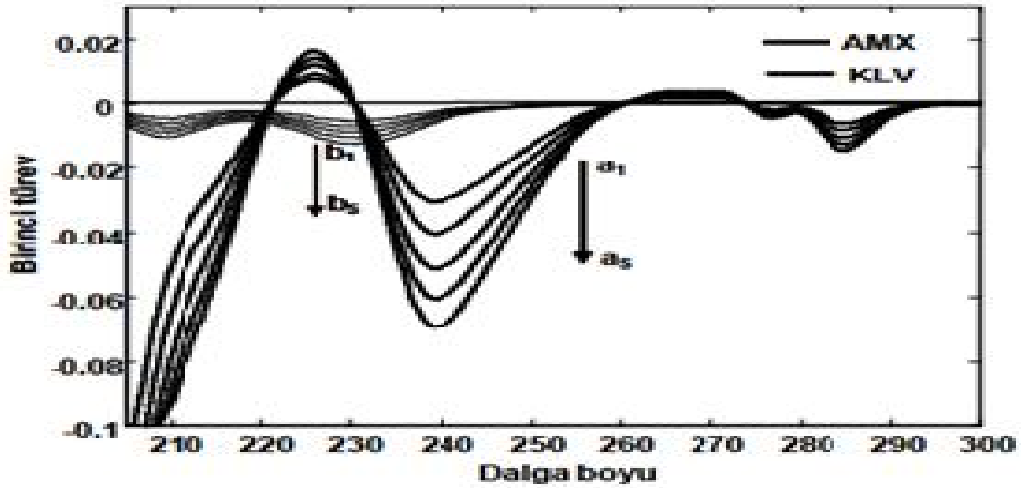
İlaç maddesi, besinler v.b. maddelerdeki eser miktardaki safsızlıkların saptanması ve miktarının tayin edilmesi de türev spektrofotometrisinin bir başka uygulama alanıdır. Buna örnek olarak, etanolde eser miktarda bulunan benzenin tayini

gösterilebilir.

Karışımların simultane analizi:

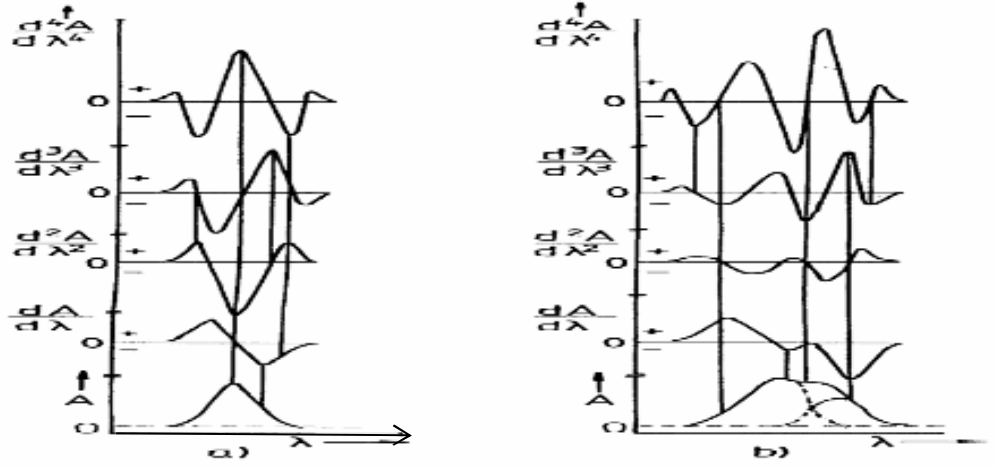
Türev spektrofotometrisinin oldukça yaygın bir uygulama alanı da absorpsiyon bantları ile çakışan ve bir sebeple absorpsiyon spektrofotometrisi ile bir ön ayırma yapılmaksızın tayin edilemeyen karışımların simultane analizidir. Bu konuda yapılmış çalışmalar, kombine ilaç preparatlarında ve besinlerdeki katkı maddelerinin analizinde yoğunlaşmıştır. Bu analizlerde pik-sıfır, pik-pik ve pik/pik oranı ölçümleri uygulanmıştır.

2.17.4 Türev Alma ve Türev Spektrumu [96]



Şekil 2.16 Türev spektrofotometresi spektral eğri

Türev Spektrofotometresi bir spektral eğrinin matematiksel türevlerinden birinin çizilmesi ve hesaplanmasını kapsar. Böylece çok bileşenli çözülmesi, azaltılmış örnek türbidimetresi ve spektral detayların azaltılması gibi birçok analitik probleme uygun çözümler getirir. Bilindiği gibi daha yüksek dereceli türevler daha sivri pik genlikleri vardır fakat bant genişlikleri daha düşük türev absorbans birimleri verir. Türev derecesinin en iyi seçimi geniş perdelemelerin daha azattığı zamandır. Türev spektrumlarında sinyalin gürültüye oranını ve pik şeklini etkileyen ana parametrelerden biri $\Delta\lambda$ değeridir. Bu parametre iyi çözümlenmiş geniş bir pik vermesi için iyileştirilmiş olmalıdır. Örneğin; tayinde yüksek hassaslık ve iyi seçicilik vermesi gibi. Daha yüksek $\Delta\lambda$ değerlerinde sinyal-gürültü oranı daha iyileşir böylece türev spektrumlarındaki iniş çıkışlar azalır.



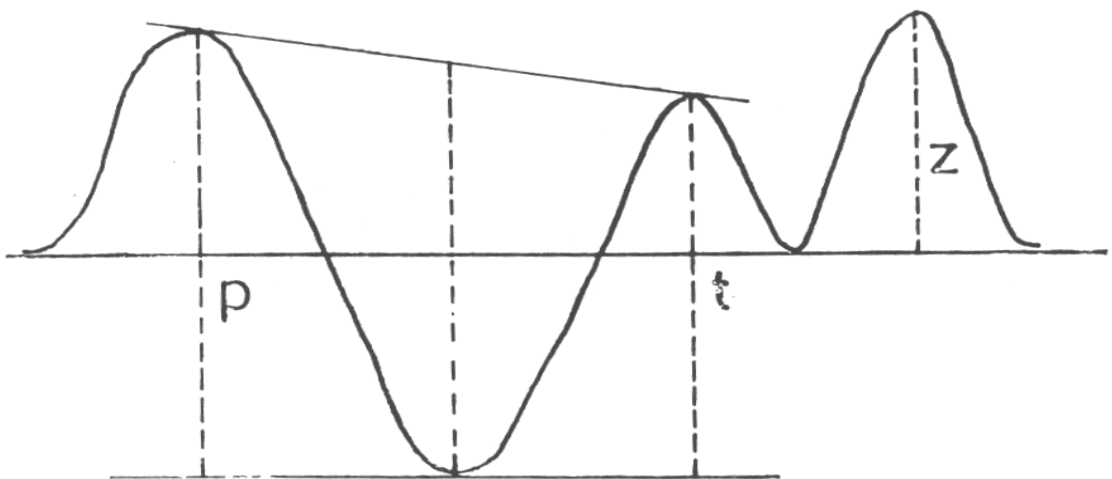
Şekil 2.17 Analitik bandın Gauss olarak hesaplanması

a) Birinci eğri dördüncü türeve kadar

b) Birinci eğrinin dördüncü türevinin iki gauss bandında üstten görünüşü

Birinci ve ikinci türev spektrumunda ordinat değişimleri normal spektrumdaki ordinat değerinin büyüklüğü ile değil, eğim değişimi ile ilişkili oluşu nedeniyle türev eğrisinin absisteki konumu ile dönüm noktalarının birbirine karşı durumları karakteristik olur. Nicel analizlerde yalnızca bitişik, peşpeşe ekstremum noktaları değerlendirilerek bu iki noktanın mutlak değer olarak farkı ölçülür. Birkaç ekstremum nokta varsa ordinat farkının en yüksek olduğu bir bitişik çift seçilir [96]

Türev spektrumlarının değerlendirilmesinde üç yöntem vardır.



Şekil 2.18 Türev spektrumlarının değerlendirilmesi [96]

t: Eğim yöntemi

p: Pikten-pike ölçüm

z: Sıfır-pik maksimumu yöntemi

a. Pikten Pike Ölçüm Yöntemi: Yan yana olan maksimum ve minimum farkı ölçülerek, özellikle bulanık örneklerde saydam standartlara karşı nicel analiz kolay yapılır.

b. Teğet Yöntemi: Peşpeşe gelen iki maksimum üzerinden geçirilen teğetin iz düşümü noktasında, arada kalan minimuma uzaklığı veya iki minimumdan geçen teğetin aradaki maksimuma iz düşüm noktasındaki uzaklığı ölçülür. Özellikle geri zemin absorpsiyonunun belirlenemediği bulanık örnekler için uygulanır. Uzaklık yine standartların eşdeğer piklerine çizilen teğete karşı değerlendirilerek sonuca gidilir.

c. Pikten Sıfıra Ölçüm Yöntemi: Ölçümü yapılacak olan pikin maksimumu ile sıfır arası veya minimumu ile sıfır arası uzaklığı ölçülür. Özellikle apsise göre simetrik sinyaller içeren yüksek derece türevler için üst üste çakışan eğrilerden biri sıfırdan geçtiğinde kullanılır. Bulanık örneklerde bulanıklık genellikle spektrumun kısa dalga boyu tarafına doğru artar. 1. ve 2. türevde nicel analiz için kullanılan yukarıdaki yöntemler bu artışın etkisini ortadan kaldırır.

Türev spektrofotometresi ile tek boya içeren numunelerdeki boyanın kantitatif tayininde bir karışımda türev alma yoluyla bileşenlerden birine ait bir pik elde edilmesi durumunda, aynı bileşene ait bir dizi standard çözeltiden hareketle, elde edilen aynı türev dereceli spekturumlarında, aynı pik değerlendirilerek çizilmiş kalibrasyon doğruları yardımıyla karışımdaki söz konusu bileşenin nicel analizi yapılmaktadır.

Türev spektrofotometresi ile çift boya içeren numunelerdeki boyanın kantitatif tayinin de analizi yapılan numune iki boya maddesi içeriyor ve bu maddelerden birinin absorpsiyon yaptığı bölgede öteki yapmıyorsa, maddeleri ayırmaksızın yan yana tayin etmek mümkündür.

2.17.5 Türev ve Çift Dalga Boylu Spektrofotometri [97]

Türev spektrofotometride, absorbans ya da geçirgenliğin dalga boyuna göre birinci veya daha yüksek dereceden türevi dalga boyuna karşı kaydedilerek spektrum çizilir.

Çoğu kez bu eğriler, normal bir spektrumda görülmeyen spektral ayrıntıları ortaya çıkarırlar. Buna ek olarak, bazen bozucu maddeler varlığında bir analitin derişiminin ölçümü daha kolay ya da daha doğru olarak yapılabilir. Ne yazık ki, spektrumunun üstünlükleri, türev eldesine eşlik eden sinyal/gürültü oranının düşürülmesi ile en azından kısmen ortadan kalkar ancak, ultraviyole ve görünür bölgenin çoğu kısmında sinyal /gürültü oranı, ciddi bir sınırlandırıcı faktör değildir; türev spektrumlarından işte burada en fazla yararlanılır. Türev spektrofotometresinin bir diğer dezavantajı ise gerekli cihazın daha pahalı oluşudur. Türev spektrumlarını elde etmek için çeşitli yöntemler kullanılır. Mikro işlemci kontrollü dijital spektrofotometreler için türev alma işlemi sayısal olarak, analog cihazlarla spektral verilerin türevleri, uygun bir işlemsel yönetici devresiyle elde edilebilir. Üçlü bir işlem, dalga boyu modülasyonu ile gerçekleştirilir .

2.17.5.1 Fark Türev Spektrofotometrik Yöntem [98]

Karışımlarda yer alan çeşitli maddeleri kantitatif olarak analiz etmeyi ya da çevre koşulları nedeniyle küçük değişimlere rağmen hassas bir ölçüm sağlar. Fark yöntemi ile spektrofotometrik analizlerin doğruluğu ve seçiciliği belirgin bir biçimde geliştirilmiştir. Fark yönteminin önemli özelliği eşit kütlelere sahip çözeltilerin farklı formlarını elde etmektir. Diğer absorban maddelerin varlığında fark spektrumlarının uygulama kriterleri şunlardır.

*Bir ya da daha fazla belirteç eklenmesi örneğin spektrumda tekrarlanabilirliğini azaltır.

*Girişim yapan bileşenlerin absorbansları belirteç eklenmesi ile değişmez.

Örneğin spektral özelliklerinin değişimi asit, baz ve tampon çözeltileri ile yapılır. Birçok örneğin UV-VIS absorpsiyon spektrumları iyonize olabilen fonksiyonel gruplar içermektedir. Örneğin fenol, aromatik karboksilli asit ve aminler gibi. Fonksiyonel grupların iyonize olmaları çözeltinin pH'sına bağlıdır. Eğer örneklerin asit ve baz değerleri konsantrasyonları ile orantılı ise $\Delta A: abC$ dir. Girişim yapan bileşenlerin etkisini azaltmak ve absorbansın değişmesini engellemek yani ΔA prosedürünün seçiciliği pH değerlerinin doğru seçimine bağlıdır. Analitin ΔA değerlerinin uygun olabilmesi için 0,1M HCl ve 0,1M NaOH kullanılması gerekir. Böylece girişim yapabilecek bileşenlerin absorbans etkileri en aza indirilmiş olur.Yöntemi açıklayabilmek için M ve N gibi iki etken maddeden oluşan bir ikili karışım numunesini

ele alalım. Her iki etken maddenin de kullanılan dalga boyu aralığında karışımlarının absorbansı, spektrumlarındaki her bir etken maddenin absorbans değerlerinin toplamına eşittir (Toplanabilirlik kuralı). Bu ifade matematiksel olarak;

$$A_{\lambda i} = \epsilon M_{\lambda i} \cdot C_M + \epsilon N_{\lambda i} \cdot C_N \text{ şeklinde ifade edilmiştir. (2.9)}$$

$A_{\lambda i}$ =Karışımın i dalga boyundaki absorpsiyonu $\epsilon M_{\lambda i}$ ve $\epsilon N_{\lambda i} = M$ v N 'nin molar absorpsiyon katsayıları C_M ve $C_N = M$ ve N 'nin molar konsantrasyonlarıdır.

Yöntemin analitik amaçlı uygulanması için; $N+M$ 'den oluşmuş bir karışımda N tayin edilmek isteniyorsa, analiz edilecek saf numunenin (N) değişik bilinen konsantrasyonlardaki çözeltileri hazırlanarak spektrofotometre yardımıyla spektrumları alınır ve bilgisayar hafızasına kayıt edilir. Daha sonra C_M^0 konsantrasyonunda saf olarak M 'nin standart çözeltisi hazırlanır ve hazırlanan C_M^0 konsantrasyonundaki çözeltinin absorpsiyon spektrumu çizdirilerek bilgisayarın hafızasına kayıt edilir.

Önceden kayıt edilen N 'nin spektrumları tek tek C_M^0 'nin spektrumuna bölünür(oran spektrum). Ve böylece oran spektrumu elde edilmiş olur. Elde edilen oran spektrumlarının türev spektrumları çizdirilerek belirlenen dalga boyunda oran türev absorbans değerleri okunur. Okunan oran türev absorbans değerleri C_N 'e karşı grafiğe geçirilerek çalışma grafiği hazırlanır. Sonra işlem $M + N$ karışımına uygulanıp daha önce N için hazırlanan çalışma grafiği yardımıyla karışımda N 'nin miktarı tayin edilir. Karışımdaki M 'nin miktarının tayini içinde bu defa C_N^0 'da hazırlanan konsantrasyonda ki N çözeltisi bölücü olarak kullanılmaktadır. Diğer işlemler yukarıda anlatıldığı gibidir. Eğer bölücü standardın konsantrasyonu artırılıp azaltılırsa, elde edilecek türev absorbans değeri de buna bağlı olarak artar ya da azalır. Fakat maksimum ve minimum dalga boyları değişmez.

2.17.5.2 Oran Türev Spektrofotometrik Yöntem [99]

İlk kez 1987 yılında Blanco ve arkadaşları tarafından geliştirilen yöntem Berzas Nevado ve arkadaşları tarafından modifiye edilerek kullanılmıştır. Yöntemi açıklayabilmek için M ve N gibi iki etken maddeden oluşan bir ikili karışım numunesini ele alalım. Her iki etken maddenin de kullanılan dalga boyu aralığında karışımlarının absorbansı, spektrumlarındaki her bir etkin maddenin absorbans değerlerinin toplamına eşittir (Toplanabilirlik kuralı). Bu ifade matematiksel olarak;

$A_{mi} = \epsilon M \lambda_i \cdot C_M + \epsilon N \lambda_i \cdot C_N$ şeklinde ifade edilmiştir. (2.10)

$A_{m\lambda_i}$ =Karışımın i dalga boyundaki absorpsiyonu $\epsilon M \lambda_i$ ve $\epsilon \lambda_i = M \vee N$ 'nin molar absorpsiyon katsayıları C_M ve $C_N = M$ ve N 'nin molar konsantrasyonlarıdır.

Yöntemin analitik amaçlı uygulanması için; $N+M$ 'den oluşmuş bir karışımda N tayin edilmek isteniyorsa, analiz edilecek saf numunenin (N) değişik bilinen konsantrasyonlardaki çözeltileri hazırlanarak spektrofotometre yardımıyla spektrumları alınır ve bilgisayar hafızasına kayıt edilir. Daha sonra C_M^0 konsantrasyonunda saf olarak M 'nin standart çözeltisi hazırlanır ve hazırlanan C_M^0 konsantrasyonundaki çözeltinin absorpsiyon spektrumu çizdirilerek bilgisayarın hafızasına kayıt edilir.

Önceden kayıt edilen N 'nin spektrumları tek tek C_M^0 'nin spektrumuna bölünür (oran spektrum). Ve böylece oran spektrumu elde edilmiş olur. Elde edilen oran spektrumlarının türev spektrumları çizdirilerek belirlenen dalga boyunda oran türev absorbands değerleri okunur. Okunan oran türev absorbands değerleri C_N 'e karşı grafiğe geçirilerek çalışma grafiği hazırlanır. Sonra işlem $M + N$ karışımına uygulanıp daha önce N için hazırlanan çalışma grafiği yardımıyla karışımda N 'nin miktarı tayin edilir. Karışımdaki M 'nin miktarının tayini içinde bu defa C_N^0 'da hazırlanan konsantrasyondaki N çözeltisi bölücü olarak kullanılmaktadır. Diğer işlemler yukarıda anlatıldığı gibidir. Eğer bölücü standardın konsantrasyonu artırılıp azaltılırsa, elde edilecek türev absorbands değeri de buna bağlı olarak artar ya da azalır. Fakat maksimum ve minimum dalga boyları değişmez.

2.17.6 Uygulamaları;

Ultraviyole ve görünür bölgelerde türev spektroskopinin en önemli uygulamalarından pek çoğu, spektrumları birbiriyle çakışan bileşiklerin farklılandırılmasını mümkün kılan türev spektrumunun kullanıldığı kalitatif tayinlerle ilgilidir. Şekil 2.17 üç adet çakışan absorpsiyon pikinden oluşan bir spektrumun ayrıntılarını bir türev eğrisinin nasıl ortaya koyabildiğini göstermektedir. Çift-dalga boylu spektrofotometri, özellikle ışığın saçılması ile bir absorpsiyon spektrumunun ayrıntılarının karmaşık hale geldiği durumlarda, bulanık çözeltilerdeki analitlerin ultraviyole/görünür alan absorpsiyon spektrumlarının eldesinde belirgin yarar sağlamıştır. Çift dalga boylu spektrofotometri aynı zamanda spektral bir girişim varlığında bir analitin tayin edilmesinde de yararını kanıtlamıştır. Burada, cihaz tarayıcı olmayan modda çalıştırarak, girişim

yapan türün aynı molar absorptivite değerlerini gösterdiği iki dalga boyunda absorbans ölçümü yapılır. Bunun tersine, analit bu dalga boylarından birinde, diğerine nazaran daha kuvvetli absorpsiyon yapmalıdır. Bu durumda fark absorbans, analit derişimi ile doğru orantılıdır

Ultraviyole Spektroskopisinden Sağlanan Yararlar

Ultraviyole spektroskopisinden çeşitli yönlerinden yararlanılır. Bunlar başlıca şunlardır:

- 1) Kalitatif analizde
- 2) Kantitatif analizde
- 3) Titrasyonda
- 4) Molekül ağırlığı tayininde
- 5) Yük aktarma kompleksi oluşumunda
- 6) Asit ve bazlık sabitleri tayininde
- 7) Kompleks stokiometrisinin ve sabitinin bulunmasında

2.17.7 Türev Spektroskopisinin Avantajları ve Dezavantajlar

Avantajları

- a. Türev çalışması orijinal spektrumun eğimleri hakkında bilgi verir ve bunun omuz noktaları ile dönüm noktalarının daha belirgin hale gelmesine neden olur. Böylece bir bileşik daha kolay ve kesin olarak tanınabilir
- b. Çoğunlukla orijinal spektrumda elde edilen eğriler bir çok pikin üst üste gelmesi ile meydana gelmiştir. Türev alma ile bu absorpsiyon eğrileri daha şekle girer ve böylece bir arada bulunan piklerin tek tek görülmesi sağlanır.
- c. Spektrofotometrede bulanık çözeltiler ile çalışılırken çökme hızı, tanecik büyüklüğü gibi etkenlere bağlı olarak büyük oranda hata yapılırken, türev eğrilerinin hazırlanması ile bulanıklığın oluşturduğu bu olumsuz etki ortadan kaldırılabilir ve bulanık ortamlarda da çalışılabilir.
- d. Birden fazla maddenin karışım halinde bulunduğu ortamlarda ekstraksiyon

ve kromatografi gibi herhangi bir ayırma işlemine başvurulmaksızın tek tek miktarları tayin edilebilir.

e. Reaksiyon ortamından kaynaklanan gürültü piklerinin yok edilmesini sağlar.

Dezavantajlar

a. Kullanımı çok kolay olmasına karşılık pahalı spektrofotometrelere ve oldukça karmaşık bir elektronik yapıya ihtiyaç vardır.

b. Türev spektrumlarında çok sayıda uydu pikleri görülür. Bu pikler, bir karışım ile çalışılır iken başka bileşenlerin de varlığını gösterir. Türev derecesi arttıkça bu cins piklerin sayısı da artacağı için karışıklık daha da fazla olacaktır.

2.18 Validasyon (Yöntem Doğrulaması) [99,100]

Analitik yöntem doğrulaması, yöntemin amaçlanan analitik uygulamanın tüm gereklerini karşıladığının, laboratuvar çalışmaları ile kanıtlanması işlemidir.

Doğrulamanın yapılması gereken durumlar:

- * Tanınma testleri
- * Safsızlıkların miktar tayini
- * Safsızlıkların limit testleri
- * Bitmiş üründe etken maddenin (ya da seçilen başka bir maddenin) kantitatif analizi

Analitik yöntem parametreleri:

a)Özgünlük

b)Doğrusallık

c)Konsantrasyon aralığı

d)Doğruluk

e)Kesinlik

- * Gün içinde tekrarlanabilirlik
- * Günler arası tekrarlanabilirlik
- * Laboratuvarlar arası tekrarlanabilirlik

- f) Deteksiyon limiti (LOD)
- g) Kantitatif tayin limiti (LOQ)
- h) Sağlamlık (Robustness)
- i) Sistem uygunluk testi

2.18.1 Özgünlük

Validasyonun en önemli parametresidir, metod geliştirilirken ilk yapılması gereken testtir. İki şekilde gerçekleştirilir:

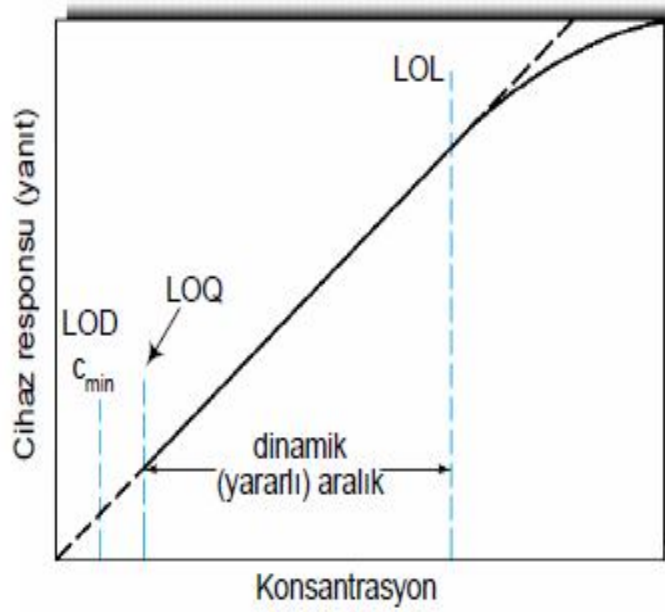
- a) Safsızlıklar ve bozunma ürünleri gibi girişim yapabilecek maddelerin standartları mevcutsa geliştirilen yöntemde bu maddelerin etken maddeden uygun bir ayrılma gücü değerleriyle ayrıldığı ispat edilmelidir.
- b) Girişim yapan maddelerin standartları sağlanmıyorsa, örnek; ısı, ışık, nem, asit, baz, oksidasyon gibi stres şartlarına maruz bırakılıp sonuçlar referans maddeyle karşılaştırılır.

2.18.2 Doğrusallık

Bu test, standart stok çözeltisinin seyreltilmesiyle ve/veya ayrı tartımlar alınarak gerçekleştirilir. Dedektör cevabına karşılık konsantrasyon grafiği çizilir (kalibrasyon eğrisi). Eğrisinin doğrusallığı en küçük kareler yöntemi ile değerlendirilir. Doğrunun eğimi, kayım değeri, korelasyon katsayısı doğrusallığı belirler.

2.18.3 Konsantrasyon Aralığı

Yöntemin doğruluk, kesinlik, doğrusallık testlerini geçtiği konsantrasyon aralığıdır ve doğrusallık çalışmalarından metodun sınırları belirlenir. İncelenen konsantrasyon aralığı yöntemin kullanımına göre değişir.



Şekil 2.19 Bir kalibrasyon eğrisi grafiği; cihaz response-konsantrasyon değişimi

2.18.4 Doğruluk

Bir yöntemin doğruluğu, ölçülen miktarın gerçek değere yakınlığı olarak tanımlanır. Genellikle geri kazanım çakışması yapılmakla beraber, bu test üç yöntemle gerçekleştirilir.

a) Standart ile karşılaştırma: Analiz edilecek madde karışık bir matriks içinde değilse bu yöntemden yararlanılır. Saf standart madde sağlayan kuruluşlardan analiz maddesinin standardı satın alınır. Farklı tartımla hazırlanmış en az üç farklı konsantrasyonda ki çözeltilerden 3 defa ölçüm yapılır, çıkan sonuçlar başka bir yöntemle elde edile sonuçlar ile kıyaslanır ve rapor edilir.

b) Geri kazanım: Analiz edilecek madde karışık bir matriks içinde ise bu yöntemden yararlanılır. Placebo hazırlanır ve etken maddesinin %50, 75, 100, 125, 150'sini içeren konsantrasyonlarda çözelti hazırlanır ve geri kazanım hesaplanır.

c) Standart katma yöntemi: Analiz edilecek madde karışık bir matriks içinde ise ve matriks hazırlamak imkansız ya da çok zorsa bu yöntem tercih edilir.

2.18.5 Kesinlik

Üçe ayrılır:

1.Gün içi tekrarlanabilirlik: Metodun kısa bir zaman içerisinde aynı uygulama

koşullarındaki kesinliğidir.%100 konsantrasyonda hazırlanan tek bir örneğin en az 10 defa enjeksiyonu yapılır veya yöntemin sınırları içerisinde alınan 3 konsantrasyondan 3'er enjeksiyon yapılır. Pik alanı veya pik yüksekliği değerlerinin bağıl standart sapması hesaplanır.

2.Günler arası tekrarlanabilirlik: Yöntemin farklı analizciyle, farklı cihazda, farklı günlerde uygulanmasıdır.

3.Laboratuvarlar arası tekrarlanabilirlik: Farklı laboratuvarda yöntemin uygulanmasıdır.

Pik alanı veya pik yüksekliği değerlerinin standart sapması ve bağıl standart sapması hesaplanır.

2.18.6 Deteksiyon Limiti

Deteksiyon limitinin hesaplanmasında yöntemin enstrümantal olup olmadığına göre birkaç yaklaşım vardır.

a)Görsel değerlendirmeye dayanan yöntem: Genellikle enstrümantal olmayan miktar tayini yönteminde kullanılır. Örneğin bilinen konsantrasyonları hazırlanır ve güvenilir bir şekilde ölçülebileceği minimum konsantrasyon bulunur.

b)Sinyal/Gürültü oranına dayanan yöntem: Düşük konsantrasyonda hazırlanan örnek çözeltisi ile elde edilen sinyalin baseline gürültüsüne oranı 3:1 olmalıdır.

c)Kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak istatistiksel hesaplamalara dayanan yöntem.

2.18.7 Kantitatif Tayin Limiti

Kantitatif tayin limitinin hesaplanmasında yöntemin enstrümantal olup olmadığına göre birkaç yaklaşım vardır:

a)Görsel değerlendirmeye dayanan yöntem: Genellikle enstrümantal olmayan miktar tayini yönteminde kullanılır. Örneğin bilinen konsantrasyonları hazırlanır ve doğru ve kesin olarak tayin edilebildiği minimum konsantrasyon hesaplanır

b)Sinyal/Gürültü oranına dayanan yöntem: Düşük konsantrasyonda hazırlanan örnek çözeltisi ile elde edilen sinyalin baseline gürültüsüne oranı 10:1 olmalıdır.

c)Kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak istatistiksel hesaplamalara dayanan yöntem.

Işının absorplaması üzerine kurulmuş olan tayin metodları analitik kimyacı için çok yararlı ve güçlü metodlardır. Bu metodların klasik metodlara başlıca üstünlükleri şunlardır.

- 1.Sonuç çabuk alınır ve çalışmacı fazla yorulmaz.
- 2.Doğruluk derecesi oldukça yüksektir. %1-3 hatayla sonuç alınabilir. Tedbir olarak hata binde 1-2 ye kadar indirilebilir.
- 3.Her maddenin kendine özgü bir absorplama piki olduğundan seçiciliği yüksektir.
- 4.Molar absorplama katsayısı 10000'den büyük olan maddelerin 10^{-7} M konsantrasyonları bile tayin edilebilir.
- 5.Uygulama alanı da oldukça geniştir. Şu kromofor gruplarından bir veya birkaçını içeren maddeler kolaylıkla tayin edilir.

Çifte bağlar	Karboksil grubu
Üçlü bağlar	Karbonil grubu
Nitro grubu	Amid grubu
Nitrozo grubu	Fenol grubu
Azo grubu	Renkli iyonlar veya renklendirilebilen iyonlar.

Kantitatif analiz için ilk şart, tayini yapılacak maddeyi bilmektir. Bundan sonra birtakım işlemler yapmak gerekir. Bunları şöyle özetlemek mümkündür (101).

- 1.Tayini yapılacak maddeyi saflaştırmak
- 2.Tayinin yapılacağı dalga boyunu seçmek
- 3.Tayinin sıcaklığını ayarlamak
- 4.Tayin için uygun çözücü seçmek ve pH'ını ayarlamak
- 5.Tayin için çalışma grafiğini çizmek

2.18.8 Standart Katma Yöntemi (SKY)

Kalibrasyon eğrileri içeriği bilinen standartlarla analitin kütle, hacim veya konsantrasyonunun grafiğidir. Gelen sinyaller neticesinde absorbans, elektromanyetik ışımanın emülsiyon şiddeti, elektrokimyasal hücrenin potansiyeli veya akımı, kromatografik pik alanı vb. değerler ölçülebilir. Veriler genellikle doğrudan grafiğe aktarılır. Grafik üzerinde doğrusal bir çizgi elde edilmiş fakat bazı noktalar dışarıda kalıyorsa lineer regresyon analizi ile en optimum doğru elde edilebilir. Kalibrasyon grafiklerinin kullanımı kolaydır. Çünkü numune içindeki analit konsantrasyonu eğriden kolayca okunabilir veya eğrinin doğrusal olduğu yerdeki faktörü kullanılarak hesaplanabilir.

Kalibrasyon eğrisi yönteminde saf su içinde çözündürülmüş saf bileşiklerden elde edilen standart çözeltiler kullanılır. Diğer taraftan örneğin içinde bulunan bilinmeyen diğer maddeler ve diğer bileşik matrisleri analiz işlemi üzerinde girişimlerde bulunarak büyük sistematik hataların yapılmasına neden olurlar. Buna matris etkisi denir ve bunu önlemenin iki yolu vardır.

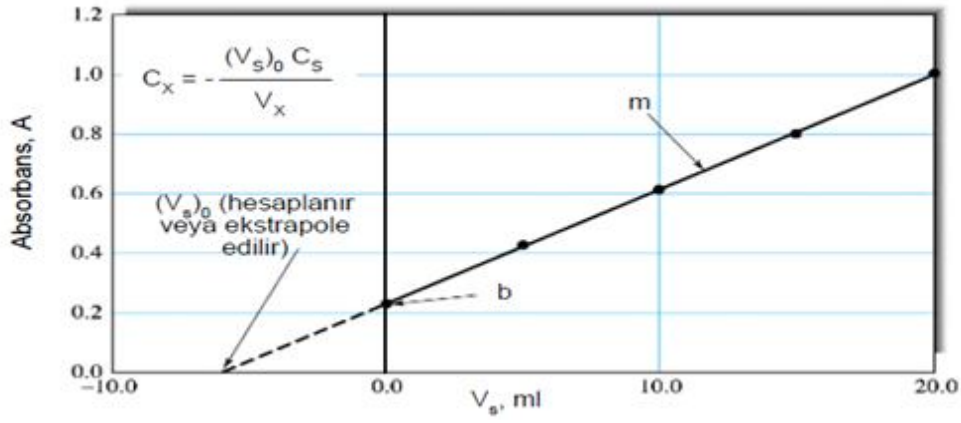
Bunlardan bir tanesi standart çözeltilerin içine bilinmeyen örnekte bulunduğu tahmin edilen maddeleri katmaktır. Bu yöntemin zorluğu bilinmeyen çözelti içindeki yabancı maddelerin ne olduklarını tahmin etmektir, zira matris bazen çok karmaşık bir karışım olabilir.

Daha genel bir yaklaşım da saf çözücü ve saf bileşik yerine örnekten bir standart hazırlamaktır. Burada bilinmeyen çözeltinin absorbansı ölçülür, içine belli miktarda bilinen bir bileşik ilave edilir ve ölçüm tekrarlanır. İki çözelti ilave yapılmadan önce ve ilaveden sonra aynı içeriğe sahip olmalıdırlar. Ayrıca içeriğe uygunluk sağlamak için bilinmeyen çözeltiden pipetle birbirine eşit miktarlar alınıp, iki dereceli erlenmayer şişesine aktarılır ve ikisine de su ilave edilerek aynı hacme getirilir.

Analizi yapılacak çözeltiye belirli miktarlarda konsantrasyonu bilinen bir madde ilave edilir ve bu işleme ***standart katma yöntemi*** adı verilir.

Genel olarak kalibrasyon eğrisi yönteminde örneğe muhtelif standart ilavesi ile oluşturulan egride en düzgün doğru elde edilir. X-ekseni ilave edilen standardın

konsantrasyonu ise (Spike konsantrasyonu) Beer Kanununa göre eğrinin lineer olması gerekir [102].



Şekil 2.20 Standart Katma Eğrisi Doğrusu

Standart Katma Eğrisi Doğrunun y eksenini kestiği nokta bilinmeyen örneğin standart ilavesi yapılmadan verdiği absorbanstır. Bilinmeyen örneğin konsantrasyonu x-kesintisinden hesaplanabilir.

BÖLÜM 3

DENEYSEL BÖLÜM

3.1 Maddeler ve Çözücüler

Kullanılan kimyasal maddeler [Hidroklorik asit (HCl), Fosforik asit (H₃PO₄) , aspartam (asp), sodyum benzoat (SB) , kafein (kaf) , neohesperidin dihidrokalkon (NHDC), asesülfam-K (ace-K)] analitik saflıktadır. Kullanılan tatlandırıcılar Elso Kimya, Yiğitoğlu firmasından ve Ülker firmasından temin edilmiştir. Piyasadan toplanan ürünler aşağıdaki tatlandırıcıları içermektedir.

Coca cola Light : Asp , ace-K, SB, kaf

Pepsi Light; Ace-K, asp, SB, kaf

Bütçem Meyve suyu: Ace-K, asp, SB, kaf

Ülker Link: Ace-K, asp, NHDC

3.2 Gereçler

- Shimadzu UV-2450 UV–VIS Spektrofotometre (Absorpsiyon bantları gıda katkı maddesine göre 200 ila 300 nm dalga boyu aralığında kayıt altına alındı) ,
- Analitik terazi (Gec Avery, 0,1 mg' a kadar duyarlı),
- Santrifüj cihazı (Hettich EBA 20) ve santrifüj tüpleri
- Ultrasonik banyo (Misung scientific Co,Ltd),
- 10.10.45 mm küvetler,
- 0,45 µm filtre, Sartorius Minisart RC 25 Membran, Almanya
- Manyetik karıştırıcı (Intersonic)

- Cam malzemeler.

Ölçümler de 1 nm slit aralığı kullanıldı ve elde edilen verilerin regresyon analizleri ve istatistik hesaplamaları için UV probe 2.35 versiyonu ve EXCEL yazılımları kullanıldı.

3.3 Çözeltiler

Ace-K (E 950) Stok Çözeltisi (100 µg/ml) : Ace-K'nın 0,1 N H₃PO₄ ve 0,1 N HCl çözeltileri ile ayrı ayrı 100 µg/ml konsantrasyondaki çözeltileri hazırlandı.

Asp (E 951) Stok Çözeltisi (100 µg/ml) : Asp'ın 0,1 N H₃PO₄ ve 0,1 N HCl çözeltileri ile ayrı ayrı 100 µg/ml konsantrasyondaki çözeltileri hazırlandı.

SB'n (E 211) Stok Çözeltisi (100 µg/ml) : Sodyum Benzoat'ın 0,1 N H₃PO₄ çözeltisi ile ayrı ayrı 100 µg/ml konsantrasyondaki çözeltileri hazırlandı.

Kaf Stok Çözeltisi (100 µg/ml) : Kaf'ın 0,1 N H₃PO₄ çözeltisi ile ayrı ayrı 100 µg/ml konsantrasyondaki çözeltileri hazırlandı.

NHDC (E 959) Stok Çözeltisi (500 µg/ml) : NHDC'in 0,1N HCl çözeltisi ile 500 µg/ml konsantrasyondaki çözeltisi hazırlandı.

Standart çözeltiler: Türev ve oran türev spektrofotometrik yöntemlerine ait deney koşullarının saptanması ve standart eğrilerinin çizimi için ace-K, asp, SB, kaf, NHDC stok çözeltilerinin 0,1 N HCl ve 0,1 N H₃PO₄ çözeltiler ile ayrı ayrı seyreltilmesiyle sırasıyla 2;4;6;8;10 µg/ml ace-K, 75;100;125;150;175 µg/ml NHDC, 3;6;9;12;15 µg/ml kaf ve 5;10;15;20;25 µg/ml asp'ın belirtilen konsantrasyon aralıklarında çözeltileri hazırlandı.

3.4 Çalışma Yöntemi

3.4.1 Spektrumların Çizilmesi

Oran türev yöntemi için dörtlü karışımların (ace-K, asp, SB, kaf) analizinde absorpsiyon (A), birinci türev (¹D) ve ikinci türev (²D) ve üçüncü türev (³D) absorpsiyon spektrumları, fosforik asit çözeltisine karşı (0,1 N H₃PO₄) 200 – 300 nm dalga boyu aralığında alındı.

Oran türev ve türev spektrofotometrik yöntem için üçlü karışımların (ace-K, asp, NHDC) analizinde hidroklorik asit çözeltisi (0,1 N HCl) ile hazırlanan standart çözeltilerin absorpsiyon (A), birinci türev (1D) ve ikinci türev (2D), üçüncü türev (3D) absorpsiyon spektrumları, hidroklorik asit çözeltisine karşı (0,1 N HCl) 200 – 300 nm dalga boyu aralığında alındı.

3.4.2 Ölçü Eğrilerinin Çizimi

3.4.2.1 Ace-K, Asp, SB, Kaf Dörtlü Karışımı İçeren Örnekler (Cola-Pepsi-Bütçem) İçin Standart Eğrilerin Çizimi

3.4.2.1.1 Oran Türev Spektrofotometrik Yöntem (Yöntem 1: iki bileşene bölme) İçin Ölçü Eğrilerinin Çizilmesi

Ace-K'ya ait ölçü eğrisinin çizimi için 100 µg/ml konsantrasyondaki (0,1 N H₃PO₄ çözeltisi ile hazırlanan) stok ace-K çözeltisinden 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 ml ayrı ayrı alınarak 10 ml'lik balon jojelere aktarıldı ve hacmine tamamlandı. İyice karıştırıldıktan sonra 0,1 N H₃PO₄ çözeltisine karşı 200-300 nm dalga boyu aralığında absorpsiyon spektrumları alındı. Orta değer konsantrasyonlar da diğer tatlandırıcıları içeren ikili standart karışım çözeltisi hazırlandı. Bunun için 10 ml'lik balon jojeye 0,6 ml kaf ve 1 ml asp çözeltisinden aktarıldı ve çözeltinin hacmi 0,1 N H₃PO₄ çözeltisi ile 10 ml'ye tamamlandıktan sonra 200-300 nm dalga boyu aralığında absorpsiyon spektrumları alındı. Cihazda kayıtlı olan 2-10 µg/ml konsantrasyonlarında ace-K'ya ait absorpsiyon spektrumları kaf+asp ikili karışımına ait absorpsiyon spektrumuna oranlandı ve 2. türev spektrumları alındı. Bu spektrumlarda SB bileşeninin 2. türev absorbans değerinin sıfır olduğu yerde ace-K'nın maksimum absorbans verdiği dalga boyları saptandı. 223,3 nm deki 2.derece oran türev absorbans değeri ($^2D_{223,3}$) kaydedildi. Çalışma üç kez tekrarlanarak ortalama değerler alındı. Bu değerler ile karşılık gelen ace-K konsantrasyonları arasında ölçü eğrisi çizildi.

Asp stok çözeltisinden 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5 ml ayrı ayrı alınarak 10 ml'lik balon jojelere aktarıldı ve 0,1 N H₃PO₄ çözeltisi ile hacmine tamamlandı. İyice karıştırıldıktan sonra 0,1 N H₃PO₄ çözeltisine karşı 200-300 nm dalga boyu aralığında absorpsiyon spektrumları alındı. Orta değer konsantrasyonlarda diğer tatlandırıcıları içeren ikili

standart karışım çözeltisi hazırlandı. Bunun için 10 ml'lik balon jöjeye 0,3 ml kaf ve 0,2 ml SB çözeltisinden aktarıldı ve çözeltinin hacmi 0,1 N H_3PO_4 çözeltisi ile 10 ml'ye tamamlandıktan sonra 200-300 nm dalga boyu aralığında absorpsiyon spektrumları alındı. Cihazda kayıtlı olan 5-25 $\mu g/ml$ konsantrasyonlarında aspartama ait absorpsiyon spektrumları kaf+SB ikili karışımına ait absorpsiyon spektrumuna oranlandı ve 2. derece türev absorpsiyon spektrumları alındı. Bu spektrumlarda ace-K'nın 2. derece türev absorbans değerinin sıfır olduğu yerde asp'ın maksimum absorbans verdiği dalga boyları saptandı. İkinci türev absorbans değerleri ($^2D_{215,2}$) okundu. Çalışma üç kez tekrarlanarak ortalama değerler alındı. Bu değerler ile karşılık gelen asp konsantrasyonları arasında ölçü eğrisi çizildi.

SB'a ait ölçü eğrisinin çizilmesi için 100 $\mu g/ml$ konsantrasyonda ki stok SB çözeltisinden 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 ml ayrı ayrı alınarak 10 ml'lik balon jöjelere aktarıldı ve 0,1 N H_3PO_4 çözeltisi ile hacmine tamamlandı. İyice karıştırıldıktan sonra 0,1 N H_3PO_4 çözeltisine karşı 200-300 nm dalga boyu aralığında absorpsiyon spektrumları alındı. Orta değer konsantrasyonlarda diğer tatlandırıcıları içeren ikili standart karışım çözeltisi hazırlandı. Bunun için 10 ml'lik balon jöjeye 1,5 ml asp ve 0,6 ml ace-K çözeltisinden aktarıldı ve çözeltinin hacmi 0,1 N H_3PO_4 ile 10 ml'ye tamamlandıktan sonra 200-300 nm dalga boyu aralığında absorpsiyon spektrumları alındı. Cihazda kayıtlı olan 2-10 $\mu g/ml$ konsantrasyonların da SB'a ait absorpsiyon spektrumları ace-K+asp ikili karışımına ait absorpsiyon spektrumuna oranlandı ve bu spektrumların 2. derece türev absorpsiyon spektrumları alındı. Bu spektrumlarda kaf'in bileşenin 2.türev absorbans değerinin sıfır olduğu, SB absorbansının maksimum absorbans verdiği dalga boyları saptandı. 235 nm de ki ikinci türev absorbans değerleri ($^2D_{235}$) okundu. Çalışma üç kez tekrarlanarak ortalama değerler alındı. Bu değerler ile karşılık gelen SB konsantrasyonları arasında ölçü eğrisi çizildi.

Kaf'e ait ölçü eğrisinin çizilmesi için 100 $\mu g/ml$ konsantrasyondaki kaf stok çözeltisinden 0,3; 0,6; 0,9; 1,2; 1,5 ml ayrı ayrı alınarak 10 ml'lik balon jöjelere aktarıldı ve 0,1 N H_3PO_4 çözeltisi ile hacmine tamamlandı. İyice karıştırıldıktan sonra 0,1 N H_3PO_4 çözeltisine karşı 200-300 nm dalga boyu aralığında absorpsiyon spektrumları alındı. Orta değer konsantrasyonlarda diğer tatlandırıcıları içeren ikili standart karışım çözeltisi hazırlandı. Bunun için 10ml'lik balon jöjeye 1,5 ml asp ve

0,6 ml ace-K stok çözeltisinden aktarıldı ve çözeltinin hacmi 0,1 N H_3PO_4 çözeltisi ile 10 ml'ye tamamlandıktan sonra 200-300 nm dalga boyu aralığında absorpsiyon spektrumları alındı. Cihazda kayıtlı olan 3;6;9;12;15 $\mu g/ml$ konsantrasyonlarında kaf'e ait absorpsiyon spektrumları ace-K+asp ikili karışımına ait absorpsiyon spektrumuna oranlandı ve 2.derece türev spektrumları alındı. Bu spektrumlarda SB bileşeninin 2.derece türev absorbans değerinin sıfır olduğu, kaf'in maksimum absorbans verdiği dalga boyları saptandı. 235 nm 'deki ikinci türev absorbans değerleri ($^2D_{243,5}$) okundu. Çalışma üç kez tekrarlanarak ortalama değerler alındı. Bu değerler ile karşılık gelen kaf konsantrasyonları ölçü eğrisi çizildi.

3.4.2.2 Ace-K, Asp, NHDC Üçlü Karışımı İçeren Örnekler (Ülker-Link) İçin Standart Eğrilerin Çizimi

3.4.2.2.1 Oran Türev Spektrofotometrik Yöntem (Yöntem 1) İçin Ölçü Eğrilerinin Çizilmesi

(Double Divisor –Ratio Spectra Derivate –zero Crossing Metod)

Ace-K'ya ait ölçü eğrisinin çizimi için 100 $\mu g/ml$ konsantrasyondaki 0,1 N HCl çözeltisi ile hazırlanan stok ace-K çözeltisinden 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 ml ayrı ayrı alınarak 10 ml'lik balon jojelere aktarıldı ve hacmine tamamlandı. İyice karıştırıldıktan sonra 0,1 N HCl çözeltisine karşı 200-300 nm dalga boyu aralığında absorpsiyon spektrumları alındı. Orta değer konsantrasyonlar da diğer tatlandırıcıları içeren ikili standart karışım çözeltisi hazırlandı. Bunun için 10 ml'lik balon jojeye 2,5 ml NHDC ve 1,5 ml asp çözeltisinden aktarıldı ve çözeltinin hacmi 0,1 N HCl çözeltisi ile 10 ml'ye tamamlandıktan sonra 200-300 nm dalga boyu aralığında absorpsiyon spektrumları alındı. Cihazda kayıtlı olan 2;4;6;8;10 $\mu g/ml$ konsantrasyonların da ace-K'ya ait absorpsiyon spektrumları NHDC+ace-K ikili karışımına ait absorpsiyon spektrumuna oranlandı ve 2.derece türev spektrumları alındı. Bu spektrumlarda ace-K'nın 2. derece türev absorbans değerinin maksimum olduğu yerdeki türev absorbans değeri ($^2D_{235}$) kaydedildi. Çalışma üç kez tekrarlanarak ortalama değerler alındı. Bu değerler ile karşılık gelen ace-K konsantrasyonları arasında ölçü eğrisi çizildi. Ölçü eğrisinin doğru denklemi, en küçük kareler yöntemi ile hesaplandı.

Asp'a ait ölçü eğrisinin çizimi için 0,1 N HCl çözeltisi ile hazırlanan 100 µg/ml konsantrasyondaki stok asp çözeltisinden 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5 ml ayrı ayrı alınarak 10 ml'lik balon jodelere aktarıldı ve hacmine tamamlandı. İyice karıştırıldıktan sonra 0,1 N HCl çözeltisine karşı 200-300 nm dalga boyu aralığında absorpsiyon spektrumları alındı. Orta değer konsantrasyonlarda diğer tatlandırıcıları içeren ikili standart karışım çözeltisi hazırlandı. Bunun için 10 ml'lik balon jodeye 2 ml NHDC ve 4 ml ace-K çözeltisinden aktarıldı ve çözeltinin hacmi 0,1 N HCl çözeltisi ile 10 ml'ye tamamlandıktan sonra 200-300 nm dalga boyu aralığında absorpsiyon spektrumları alındı. Cihazda kayıtlı olan 5;10;15;20;25 µg/ml konsantrasyonların da asp'a ait absorpsiyon spektrumları NHDC+asp ikili karışımına ait absorpsiyon spektrumuna oranlandı ve 3.derece türev spektrumları alındı. Bu spektrumlarda asp ın 3.derece türev absorbans değerinin maksimum olduğu yerdeki absorbans değeri ($^3D_{216}$) kaydedildi. Çalışma üç kez tekrarlanarak ortalama değerler alındı. Bu değerler ile karşılık gelen konsantrasyonları arasında bir grafik çizilerek ölçü eğrisi çizildi. Ölçü eğrisinin doğru denklemi, en küçük kareler yöntemi ile hesaplandı.

NHDC'a ait ölçü eğrisinin çizimi için 0,1 N HCl çözeltisi ile hazırlanan 500 µg/ml konsantrasyondaki stok çözeltisinden 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5 ml ayrı ayrı alınarak 10 ml'lik balon jodelere aktarıldı ve hacmine tamamlandı. İyice karıştırıldıktan sonra 0,1 N HCl çözeltisine karşı 200-300 nm dalga boyu aralığında absorpsiyon spektrumları alındı. Orta değer konsantrasyonlarda diğer tatlandırıcıları içeren ikili standart karışım çözeltisi hazırlandı. Bunun için 10 ml'lik balon jodeye 1 ml asp ve 0,6 ml ace-K çözeltisinden aktarıldı ve çözeltinin hacmi 0,1 N HCl çözeltisi ile 10 ml'ye tamamlandıktan sonra 200-300 nm dalga boyu aralığında absorpsiyon spektrumları alındı. Cihazda kayıtlı olan 75;100;125;150;175 µg/ml konsantrasyonlarında NHDC'a ait absorpsiyon spektrumları asp+ ace-K ikili karışımına ait absorpsiyon spektrumuna oranlandı ve 2.derece türev spektrumları alındı. Bu spektrumlarda NHDC'un 2.derece türev absorbans değerinin maksimum olduğu yerdeki 2.derece türev absorbans değeri ($^2D_{267}$) kaydedildi. Çalışma üç kez tekrarlanarak ortalama değerler alındı. Bu değerler ile karşılık gelen NHDC konsantrasyonları arasında ölçü eğrisi çizildi. Ölçü eğrisinin doğru denklemi, en küçük kareler yöntemi ile hesaplandı.

3.4.2.2.2 Türev Spektrofotometrik Yöntem (Yöntem 2: iki bileşene bölme) İçin Ölçü Eğrilerinin Çizilmesi

Ace-K'ya ait ölçü eğrisinin çizimi için 0,1 N HCl çözeltisi ile hazırlanan 100 µg/ml konsant-rasyondaki stok ace-K çözeltisinden 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 ml ayrı ayrı alınarak 10 ml'lik balon jojelere aktarıldı ve hacmine tamamlandı. İyice karıştırıldıktan sonra 0,1 N HCl çözeltisine karşı 200- 300 nm dalga boyu aralığında absorpsiyon ve 1.derece türev spektrumları alındı. Aynı şekilde diğer iki tatlandırıcının birinci derece türev spektrumları alındı ve üst üste çakıştırıldı. Diğer iki tatlandırıcının 1.derece türev absorbans değerinin sıfır olduğu yerde ace-K absorbans değerinin maksimum olduğu değer ($^1D_{247,3}$) okundu. Paralel üç çalışma yapıp ortalama değerler alındı. Bu değerler ile karşılık gelen ace-K konsantrasyonları arasında ölçü eğrisi çizildi. Ölçü eğrisinin doğru denklemi, en küçük kareler yöntemi ile hesaplandı.

Asp'a ait ölçü eğrisinin çizimi için 100 µg/ml konsantrasyondaki 0,1 N HCl çözeltisi ile hazırlanan stok asp çözeltisinden 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5 ml ayrı ayrı alınarak 10 ml'lik balon jojelere aktarıldı ve hacmine tamamlandı. İyice karıştırıldıktan sonra 0,1 N HCl çözeltisine karşı 200-300 nm dalga boyu aralığında absorpsiyon 3. derece türev spektrumları alındı. Aynı şekilde diğer iki tatlandırıcının 3.derece türev spektrumları alındı üst üste çakıştırıldı. Diğer iki tatlandırıcının üçüncü türevlerinin sıfır olduğu , asp'ın 3.derece türev absorbans değerinin maksimuma karşılık gelen değeri ($^3D_{227,5}$) okundu. Paralel üç çalışma yapıp ortalama değerler alındı. Bu değerler ile karşılık gelen asp konsantrasyonları arasında ölçü eğrisi çizildi. Ölçü eğrisinin doğru denklemi, en küçük kareler yöntemi ile hesaplandı.

NHDC'a ait ölçü eğrisinin çizimi için 0,1 N HCl çözeltisi ile hazırlanan stok NHDC (500 µg/ ml konsantrasyondaki) çözeltisinden 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5 ml ayrı ayrı alınarak 10 ml'lik balon jojelere aktarıldı ve hacmine tamamlandı. İyice karıştırıldıktan sonra 0,1 N HCl çözeltisine karşı 200-300 nm dalga boyu aralığında absorpsiyon spektrumları ve 2.derece türev spektrumları alındı. Aynı şekilde diğer iki tatlandırıcının 2.derece türev eğrileri alındı ve üst üste çakıştırıldı. Diğer iki tatlandırıcının ikinci türevlerinin sıfır olduğu yerde neohesperidin dihidrokalkonun maksimum absorbans gösterdiği ($^2D_{240}$) dalga boyu saptandı. Paralel üç çalışma yapıp ortalama değerler alındı. Bu değerler ile karşılık gelen NHDC konsantrasyonları arasında bir grafik çizilerek ölçü eğrisi çizildi. Ölçü eğrisinin doğru denklemi, en küçük kareler yöntemi ile hesaplandı.

3.4.3 Yöntemlerin Örneklerle Uygulanması

Dört bileşenli katkıları içeren; diet coca cola ,diet pepsi ve bütçem meyve suyu numune olarak seçildi. Cola ve meyve suyu örneklerinde rengin ölçümlere etkisi olup olmadığını ölçmek için önce aktif kömür ile daha sonra aktif kömür kullanılmadan ölçümler alındı. Sonuçları etkileyecek değişiklik gözlenmediğinden çalışmalara aktif kömür kullanılmadan devam edildi. Bütçem meyve suyu süzgeç kağıdı yardımıyla süzüldü. 50 ml erlene toplanan örnek koloidal partikülleri uzaklaştırmak için santrifüj işlemine tabi tutuldu. Süzme işlemi 0,45 µm filtreye sahip şırıngalar ile yapıldı. Link meyve suyu numunelerine de süzme işlemi uygulandı. Analitleri uygun dalga boylarında analizleyebilmek için farklı konsantrasyonlarda ölçümler alındı.

Dörtlü karışım için;

Diet cola ve pepsi içeceklerine ait numuneler seyreltme işleminden önce CO₂' i uzaklaştırmak amacıyla 10 dk ultrasonik banyoda degaze edildi ve ardından filtre yardımıyla süzüldü. Oran türev spektrofotometrik yöntem için 20 ml alınan örnekler 100 ml balon jöjeye aktarıldı ve hacim 0,1 N H₃PO₄ çözeltisi ile tamamlandı. Daha sonra 1 ml ve 2 ml alınan örnek çözeltiler 10 ml'ye tamamlanarak standart ölçü eğrileri çiziminde kullanılan dalga boyu aralığında absorpsiyon spektrumları alınarak kaydedildi. Bütün bu işlemler 3 kez gerçekleştirildi.

Yerel marketlerden satın alınan bütçem meyve suyunun analizinden önce 15 dakika santrifüj edildi. Daha sonra 0,45 µm filtre ile süzüldü. Süzülen meyve suyundan 20 ml ve 10 ml ayrı ayrı alınarak 0,1 N H₃PO₄ çözeltisi ile 50 ml ye tamamlandı. Ayrı ayrı 0,5 ml ve 4 ml alınıp 0,1 N H₃PO₄ çözeltisi ile 10 ml'ye tamamlanarak standart ölçü eğrileri çiziminde kullanılan dalga boyu aralığında absorpsiyon spektrumları kaydedildi. Her bir işlem 3'er kez gerçekleştirildi.

Üçlü karışım için;

Ülker Link meyve suyu süzgeç kağıdı ile iki kez arka arkaya süzüldü. Büyük partiküllerin ayrıldığı örneği daha homojen elde edebilmek için 0,45 µm tanecik boyutu olan özel fitreler ile tekrar süzme işlemine tabi tutuldu. Örnek çözeltilerden 10 ml ve 20 ml ayrı ayrı alınarak 50 ml 'lik balon jöjelere aktarıldı ve hacmi 0,1 N HCl çözeltisi ile tamamlandı. Ayrı ayrı 0,2 ml ve 1 ml alınıp 0,1 N HCl çözeltisi ile 10 ml'ye tamamlanarak standart ölçü eğrileri çiziminde kullanılan dalga boyu aralığında

absorpsiyon spektrumları kaydedildi. Her bir işlem 3'er kez gerçekleştirildi.

Bütün çalışmalar normal oda koşullarında yapılmıştır.

3.4.4 Validasyon Çalışmaları

Validasyon, bir metod veya ölçüm prosedürünün belirlenen amaçlara uygunluğunun objektif olarak test edilip belgelendirilmesidir (ISO/IEC 17025). Bölüm 2.18 'da validasyon işlemleri detaylı bir şekilde anlatıldı. Validasyon çalışmaları standart çözelti ve piyasa numuneleri için ayrı ayrı yapıldı.

a) Özgünlük

Metod geliştirilirken hazırlanan stok çözeltilerin safsızlıkları ve bozunma ürünleri gibi girişim yapan maddelerin ısı, ışık ve asit, baz oksidasyon gibi stres durumlarına zamana bağlı kontrolleri yapıldı . Tatlandırıcıların ve diğer iki katkının analiz değerlerinde zamana ve yukarıda bahsedilen stres şartlarına bağlı olarak absorbans değerlerinde sapma olup olmadığı gözlemlendi.

b) Konsantrasyon Aralığı

Ölçüm aralığı bir metodun uygulama aralığını belirtir. Metod validasyonu yapılırken bu aralık göz önünde bulundurularak planlanır. Dolayısıyla bu metodun ölçüm aralığı ace- k için 2–10 ppm, asp için 5-25 ppm, kaf için 3-15 ppm, SB için 2-10 ppm ve NHDC için 75-175 ppm olarak belirlendi.

c) Doğrusallık

Metodun doğrusallığını belirleyebilmek için Bölüm 2.18'de anlatıldığı gibi her analitin artan beş farklı konsantrasyon değeri ölçüldü ve ölçülen bu değerlere karşılık kalibrasyon eğrileri oluşturuldu. Eğrilerin doğrusallıkları en küçük kareler yöntemi ile değerlendirildi. Regrasyon analiz değerleri sonucunda korelasyon sabitlerinin $0,98 \leq r \leq 1$ aralığında bulunması yöntemlerde kullanılan ölçü eğrilerinin doğrusallıklarını belirledi.

d) Gün İçi ve Gün Aşırı Ölçümler

Bölüm 2.18’de anlatıldığı gibi çalışmaların tekrarlanabilirliğini test etmek için İntra-day (Gün İçi) ve İnter-day (Günler arası) ölçümleri alınarak validasyon işlemleri uygulandı.

100 µg/ml konsantrasyondaki stok çözeltilerden ace-K (2;4;6;8;10 µg/ ml), asp (5;10;15;20;25 µg/ ml), SB (2;4;6;8;10 µg/ ml), kaf (3;6;9;12;15 µg/ ml) ve NHDC (75;100;125;150;175 µg/ ml) çözeltileri hazırlanarak gün içinde birer saat ara ile 3 kez ölçüm alınmıştır. Gün aşırı deneyler içinse hazırlanan çözeltilerin farklı günler de ölçümü alınarak kaydedilmiştir.

e) Tayin limiti (LOD) / Ölçüm limiti (LOQ)

Kullandığımız yöntemlerin performansını izlemek için, ilgili bileşiklerin en düşük tespit edilebilir (LOD) ve en düşük hesaplanabilir (LOQ) limit değerleri her bir yöntem için ayrı ayrı hesaplandı.

Dörtlü karışım da LOD ve LOQ tayini yapabilmek için 4 ppm ace-k, 8 ppm asp, 6 ppm SB, 12 ppm kaf çözeltileri hazırlanarak aynı gün içinde her biri için 10 paralel çalışma yapıldı. Türev spektroskopik yöntem ve oran türev spektroskopik yöntem değerleri, ilgili dalga boylarında ölçülerek kaydedildi.

Üçlü karışım da oran türev spektroskopik yöntemine göre LOD ve LOQ tayini yapabilmek için 10 ppm ace-K, 15 ppm asp, 150 ppm NHDC çözeltileri hazırlanarak aynı gün içinde her biri için 10 paralel çalışma yapılarak ve oran türev absorbans yöntem değerleri ilgili dalga boylarında ölçülerek kaydedildi

Üçlü karışım da türev spektroskopik yöntemine göre LOD ve LOQ tayini yapabilmek için 10 ppm ace-K, 25 ppm asp, 150 ppm NHDC çözeltileri hazırlanarak aynı gün içinde her biri için 10 paralel çalışma yapılarak ve türev absorbans yöntem değerleri ilgili dalga boylarında ölçülerek kaydedildi.

f) Yüzde Verim Çalışmaları / Geri kazanım

Farklı oranlarda dörtlü karışımlar halinde 2;4;6;8;10 µg/ ml ace-K, 5; 10; 15; 20; 25 µg/ ml asp, 2;4;6;8;10 µg/ ml SB ve 3;6;8;9;12 µg/ ml kaf stok çözeltilerinden alınarak hazırlanan karışım çözeltilerin oran türev spektrumlarında saptanan dalga boylarındaki

türev absorbans değerleri okundu ve oran türev spektrofotometrik yöntem ile oluşturulan ölçü eğrilerine ait regresyon denklemleri kullanılarak % verim hesaplamaları yapıldı.

Farklı oranlarda üçlü karışımlar halinde 2;4;6;8;10 µg/ ml ace-K, 5; 10;15;20;25µg/ ml asp, ve 75;100;125;150;175 µg/ ml NHDC stok çözeltilerinden hazırlanan karışım çözeltilerin oran türev spektrumlarında saptanan dalga boylarındaki türev absorbans değerleri okundu ve oran türev spektrofotometrik yöntem ile oluşturulan ölçü eğrilerine ait regresyon denklemleri kullanılarak % verim hesaplamaları yapıldı.

Standart katma yöntemi, ortam etkisinin karmaşık olduğu ve girişim yapan maddelerin varlığında kullanılır. Bu amaçla, girişim yapan maddelerin varsa etkisini ortadan kaldırmak için standart katma yöntemi uygulandı.

3.4.4.1 Standart Aspartam, Asesülfam-K, Sodyum Benzoat, Kafein Ve NHDC Çözeltileri İçin Uygulanan Validasyon İşlemleri

Bölüm 2.18.8’de anlatıldığı gibi stok aspartam, asesülfam-K, sodyum benzoat, kafein ve NHDC çözeltilerinden belirli hacimler alınıp ve her bir yöntem için ayrı ayrı uygulanmak suretiyle hacimleri 10 ml’ye tamamlandı. Aynı şekilde hazırlanan 5’er adet standart çözeltiye her bir yöntem ayrı ayrı uygulanarak UV spektrofotometrede ilgili dalga boylarında absorbans değerleri okundu ve her bir yöntem için elde edilen kalibrasyon denklemleri yardımıyla miktar tayini yapıldı. Her bir yöntem için ortalama, standart sapma (SD), bağıl standart sapma (RSD) ve % verim hesapları yapıldı.

3.4.4.2 Coca Cola, Pepsi, Bütçem Ve Link Meyve Suyu Örneklerine Uygulanan Validasyon İşlemleri

Bölüm 2.18.8’de anlatıldığı hazırlanan örneklerin çözeltilere girişim yapan maddelerin matris etkisinden kurtulmak amacıyla; belirli miktarlarda örnekten alındı ve üzerine stok aspartam, asesülfam-K, sodyum benzoat ve kafein çözeltisinden artan derişimlerde ilave edildi. İlk numune çözeltisine ilave yapılmadı ve UV spektrofotometre’de absorbans değeri ölçüldü. Daha sonra örneklere artan oranda olacak şekilde standart çözeltiden ilave yapıldı. Aynı prosedür yöntem 1 için uygulandı ve kalibrasyon eğrileri elde edildi. Bu eğrilerden yararlanarak numunelerdeki aspartam, asesülfam-K, sodyum benzoat ve

kafein miktarı mg / 100 L olarak hesaplandı ve her bir yöntem için % verim değerleri saptandı.

Çizelge 3.1 Coca cola ve pepsi numunelerine standart katma yönteminin uygulanması

(Yöntem 1)

	örnek çözeltisi (20/100, v/v)	Eklenen stok çözelti miktarları (µg/ml)			
		Asp	Ace-K	Kaf	SB
1.ölçüm	2 ml örnek	-	-	-	-
	1ml örnek	-	-	-	-
2.ölçüm	2 ml örnek	10	-	6	4
	1ml örnek	-	4	-	-
3.ölçüm	2 ml örnek	15	-	12	6
	1ml örnek	-	6	-	-

- 10 ml ‘lik balon jöjelerde hazırlanan çözeltilerin hacimleri 0,1 N H₃PO₄ çözeltisi ile tamamlanmıştır. Her bir örnek 3’er kez çalışılmıştır.

Çizelge 3.2 Bütçem meyve suyu numunelerine standart katma yönteminin uygulanması (Yöntem 1)

	örnek çözeltisi (20/50,v/v)	Eklenen stok çözelti miktarları (µg/ml)			
		Asp	Ace-K	Kaf	SB
1.ölçüm	0,5 ml örnek	-	-	-	-
	4 ml örnek	-	-	-	-
2.ölçüm	0,5 ml örnek	10	4	-	-
	4 ml örnek	-	-	6	4
3.ölçüm	0,5 ml örnek	15	6	-	-
	4 ml örnek	-	-	12	6

- 10 ml‘lik balon jöjelerde hazırlanan çözeltilerin hacimleri 0,1 N H₃PO₄ çözeltisi ile tamamlanmıştır. Her bir örnek 3’er kez çalışılmıştır.

Bölüm 3.4.4.2’de anlatıldığı hazırlanan örneklerin çözeltilere girişim yapan maddelerin matris etkisinden kurtulmak amacıyla; 0,2 ve 1 ml örnekten alındı ve üzerine stok aspartam, asesülfam-K, NHDC stok çözeltilerinden artan derişimlerde ilave edildi. İlk numune çözeltisine ilave yapılmadı ve UV Spektrofotometre’de absorbans değeri ölçüldü. Daha sonra örneklere artan oranda olacak şekilde standart çözeltiden ilave yapıldı. Aynı prosedür yöntem 1 ve yöntem 2 için uygulandı ve kalibrasyon eğrileri elde edildi. Bu eğrilerden yararlanarak numunelerdeki aspartam, asesülfam-K, NHDC

miktarları mg / 100 L olarak hesaplandı ve her bir yöntem için % verim değerleri saptandı.

Çizelge 3.3 Ülker Link meyve suyu numunelerine standart katma yönteminin uygulanması (Yöntem 1)

		YÖNTEM 1		
		Eklenen stok çözelti miktarları (µg/ml)		
	örnek çözeltisi	Asp	Ace-K	NHDC
1.ölçüm	0,2 ml örnek (10/50, v/v)	-	-	-
	1 ml örnek(20/50, v/v)	-	-	-
2.ölçüm	0,2 ml örnek (10/50, v/v)	-	4	100
	1 ml örnek(20/50, v/v)	10	-	-
3.ölçüm	0,2 ml örnek (10/50, v/v)	-	8	150
	1 ml örnek(20/50, v/v)	20	-	-

Çizelge 3.4 Ülker Link meyve suyu numunelerine standart katma yönteminin uygulanması (Yöntem 2)

		YÖNTEM 2		
		Eklenen stok çözelti miktarları (µg/ml)		
	örnek çözeltisi(20/50, v/v)	Asp	Ace-K	NHDC
1.ölçüm	0,2 ml örnek	-	-	-
	1 ml örnek	-	-	-
	2 ml örnek	-	-	-
2.ölçüm	0,2 ml örnek	-	4	-
	1 ml örnek	-		100
	2 ml örnek	10		-
3.ölçüm	0,2 ml örnek	-	8	-
	1 ml örnek	-	-	150
	2 ml örnek	20	-	-

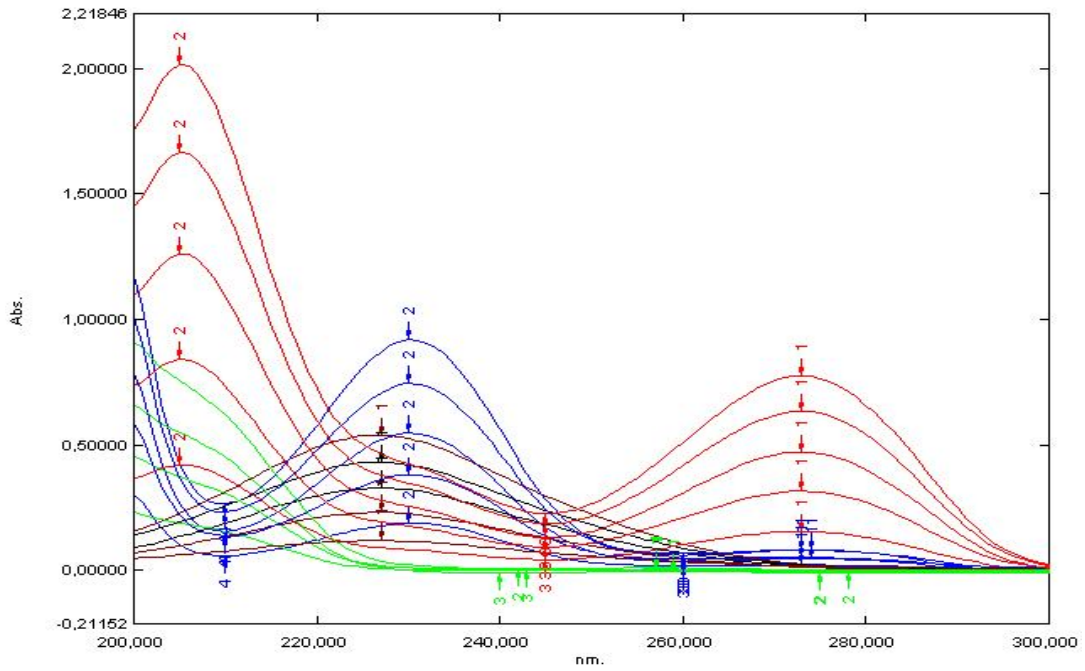
- 10 ml 'lik balon jojelerde hazırlanan çözeltilerin hacimleri 0,1 N HCl çözeltisi ile tamamlanmıştır. Her bir örnek 3'er kez çalışılmıştır.

İlerleyen bölümlerde 2.ölçüm sonuçları SK1, 3.ölçüm sonuçları SK2 olarak verilecektir.

BÖLÜM 4

ŞEKİLLER VE ÇİZELGELER

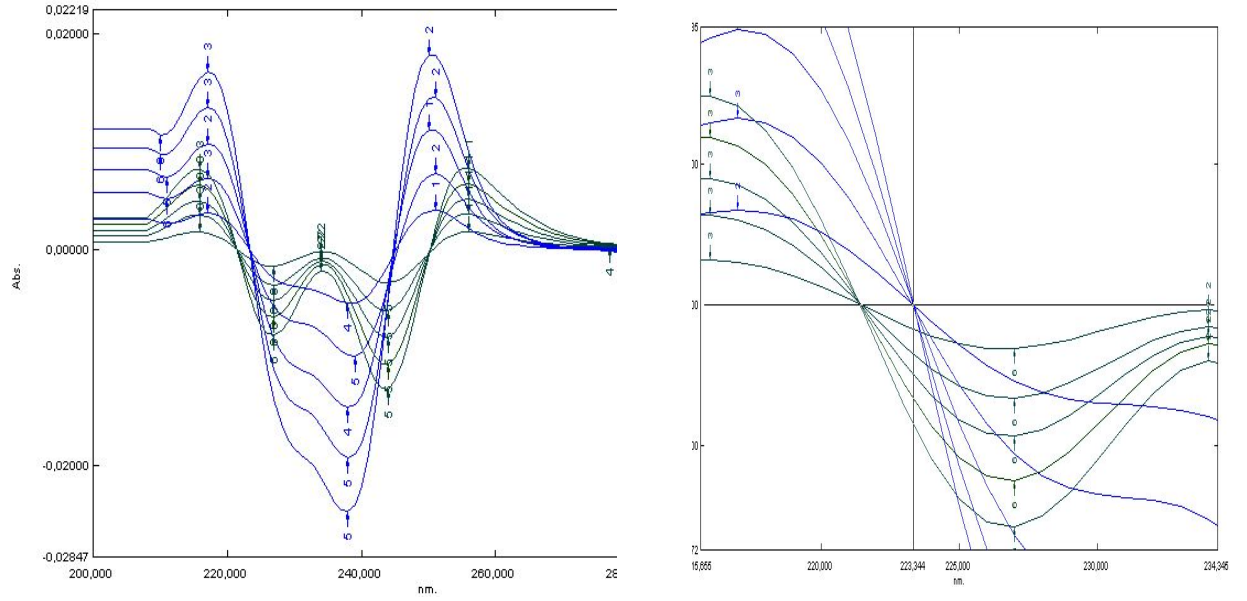
4.1 Ace-K, Asp, SB ve Kaf Dörtlü Bileşenleri İçeren Karışımların Oran Türev Spektrofotometrik Yöntem (Yöntem 1) ile Analizi



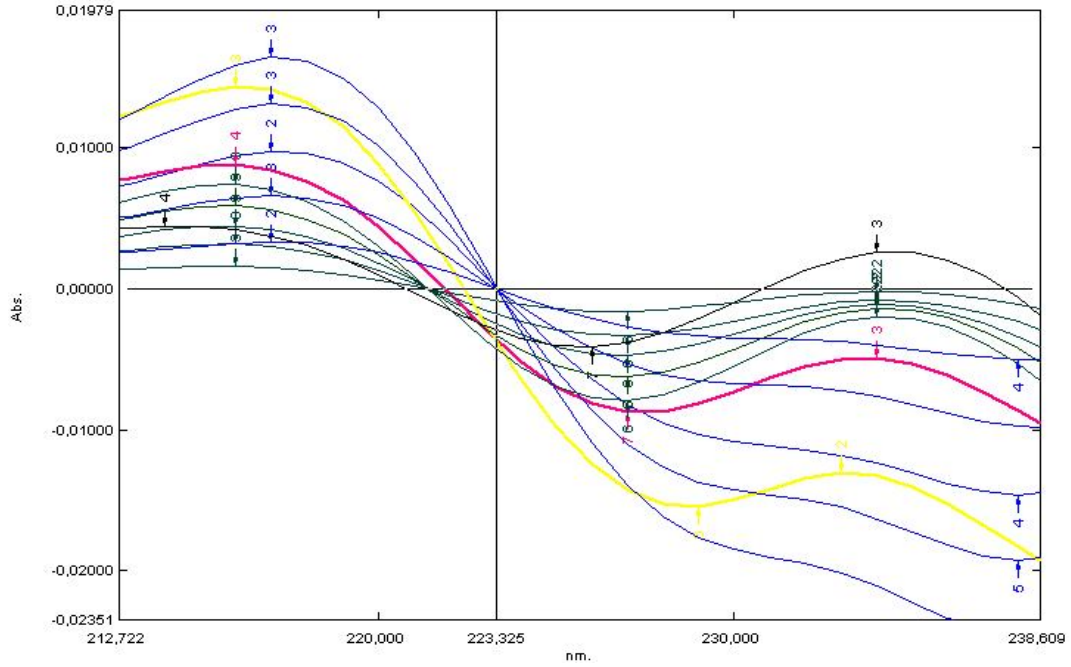
Şekil 4.1 Saf Asp (yeşil, 5-25 $\mu\text{g/ml}$), ace-K (siyah, 2-10 $\mu\text{g/ml}$), kaf (kırmızı, 3-15 $\mu\text{g/ml}$), SB 'a (mavi, 2-10 $\mu\text{g/ml}$) ait absorpsiyon spektrumları (Yöntem 1)

4.1.1 Asesülfam-K Tayini

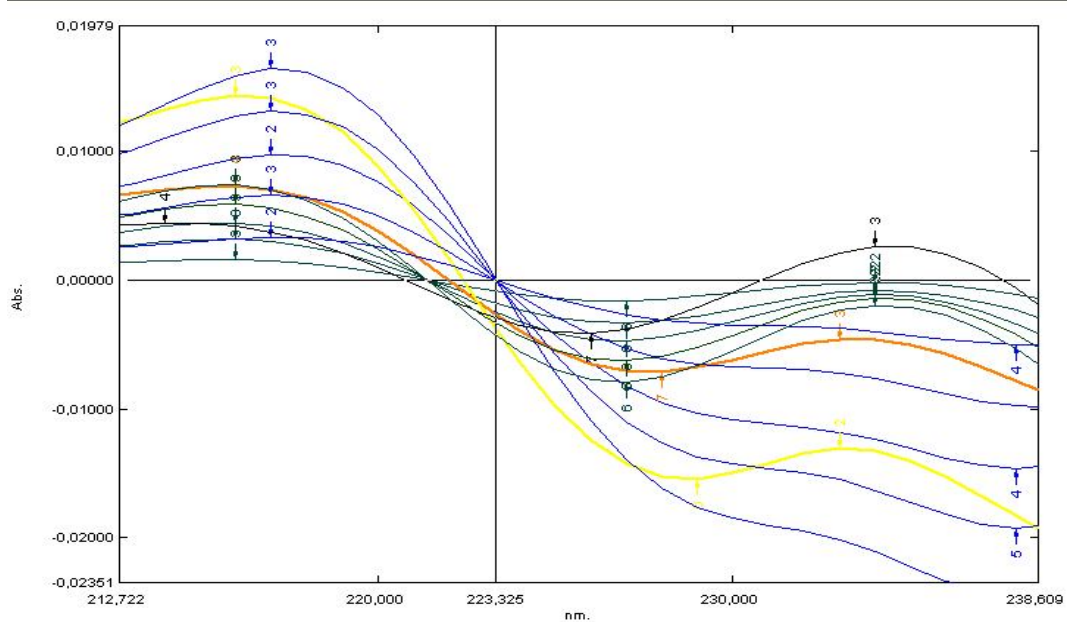
ikili bölen; 6 µg/ml kaf+ 10 µg/ml asp 'dir.



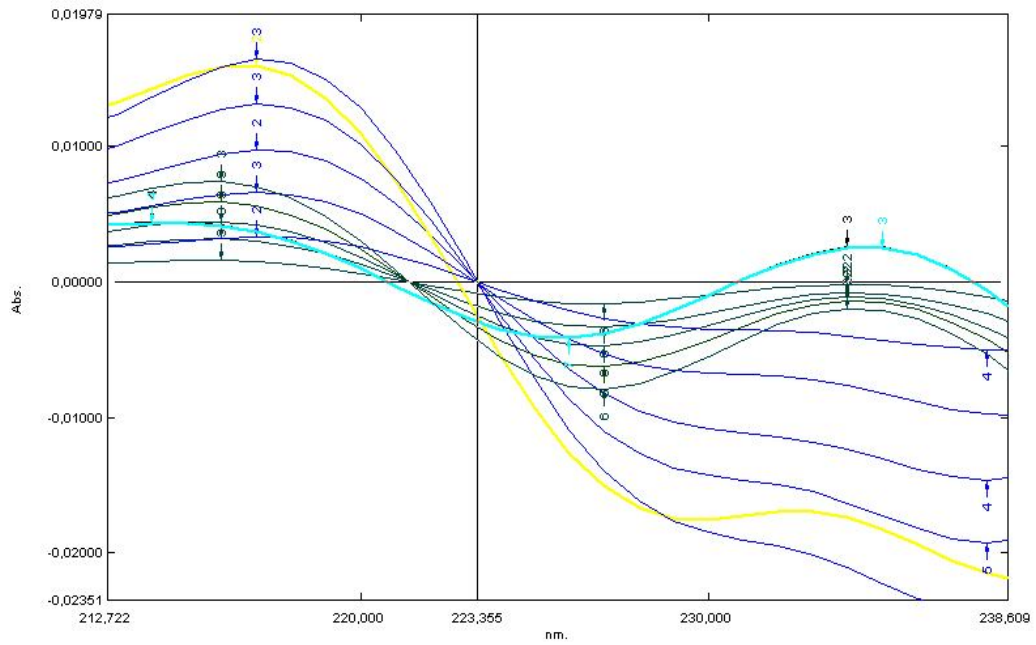
Şekil 4.2 SB (mavi, 2-10 µg/ml) ve ace-K (yeşil, 2-10 µg/ml) tatlandırıcılarına ait oran spektrumlarının 2. derece türev spektrumları ($\lambda_{\max}$: 223,3 nm) (Yöntem 1)



Şekil 4.3 Light Cola (pembe) ve dörtlü karışım içeren örneğin (sarı, 20 µg/ml asp; 8 µg/ml ace-K; 8 µg/ml kaf, 6 µg/ml asp) oran spektrumlarının 2. derece türev spektrumları ($\lambda_{\max}$: 223,3 nm) (Yöntem 1)



Şekil 4.4 Light Pepsi (turuncu) ve dörtlü karışım içeren örneğin (sarı, 20 µg/ml asp; 8 µg/ml ace-K; 8 µg/ml kaf, 6 µg/ml asp) oran spektrumlarının 2. derece türev spektrumları ($\lambda_{\max}$: 223,3 nm) (Yöntem 1)



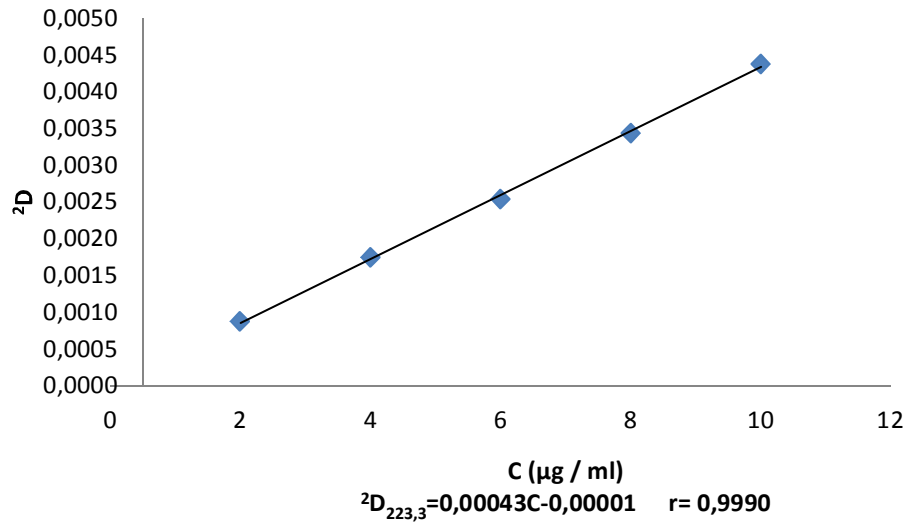
Şekil 4.5 Bütçem meyve suyu (turkuaz) ve dörtlü karışım içeren örneğin (sarı, 10 µg/ml asp; 6 µg/ml ace-K; 6 µg/ml kaf, 8 µg/ml asp) oran spektrumlarının 2. derece türev spektrumları ($\lambda_{\max}$: 223,3 nm) (Yöntem 1)

Çizelge 4.1 223,3 nm dalga boyunda ace-K için elde edilen oran türev spektrofotometrik yöntemle ait ikinci derece türev absorbans ($^2D_{223,3}$), ortalama, SD, % RSD değerleri;

C(µg/ml)	2D_1	2D_2	2D_3	$\bar{D}$	SD	%RSD
2	0,00087	0,0009	0,00088	0,00088	2x10-5	1,72
4	0,00174	0,00174	0,00178	0,00175	2x10-5	1,31
6	0,00254	0,00253	0,00255	0,00254	1x10-5	0,39
8	0,00344	0,00345	0,00342	0,00344	2x10-5	0,44
10	0,00441	0,00436	0,00437	0,00438	3x10-5	0,6
$^2D_{223,3}=0,00043C-0,00001 \quad r = 0,9990$						

Çizelge 4.2 Çizelge 4.1' e ait ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait parametreler

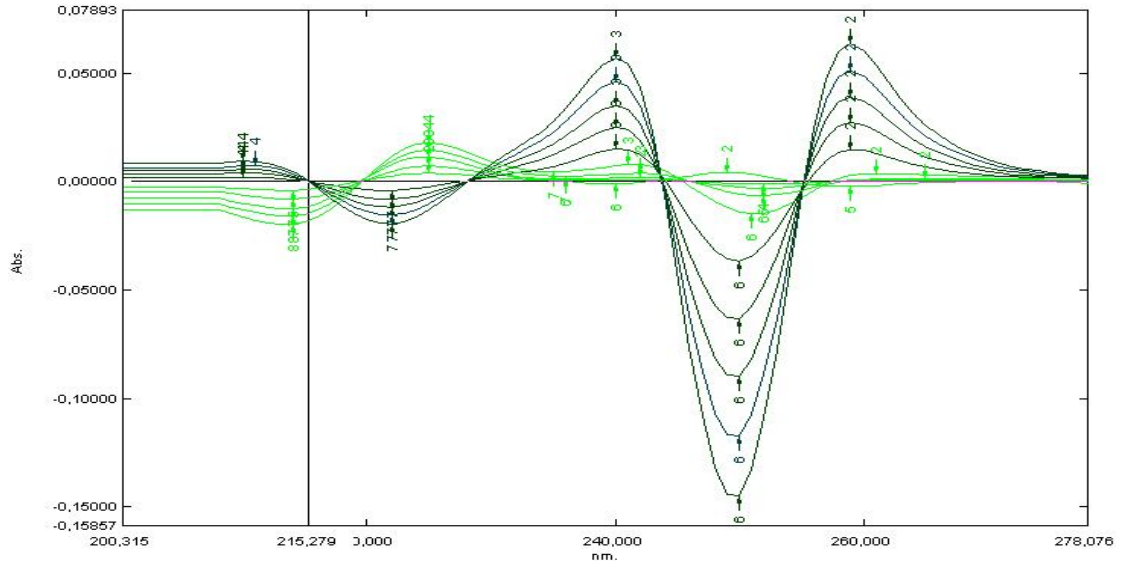
	1.ölçüm	2.ölçüm	3.ölçüm	ortalama
a	0,00044	0,00043	0,00043	0,00043
b	-0,00003	0,00001	0,00001	-0,00001
r	0,99880	0,99900	0,99890	0,99900



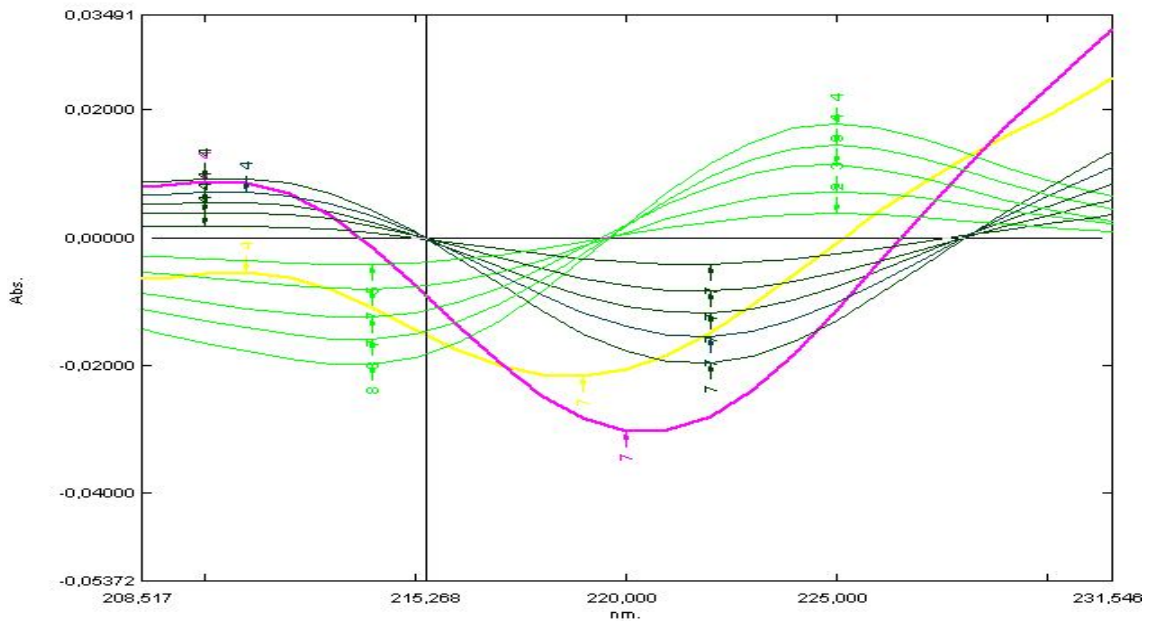
Şekil 4.6 Ace-K'ya ait ölçü eğrisi (223,3 nm) (Yöntem 1)

4.1.2 Aspartam Tayini ;

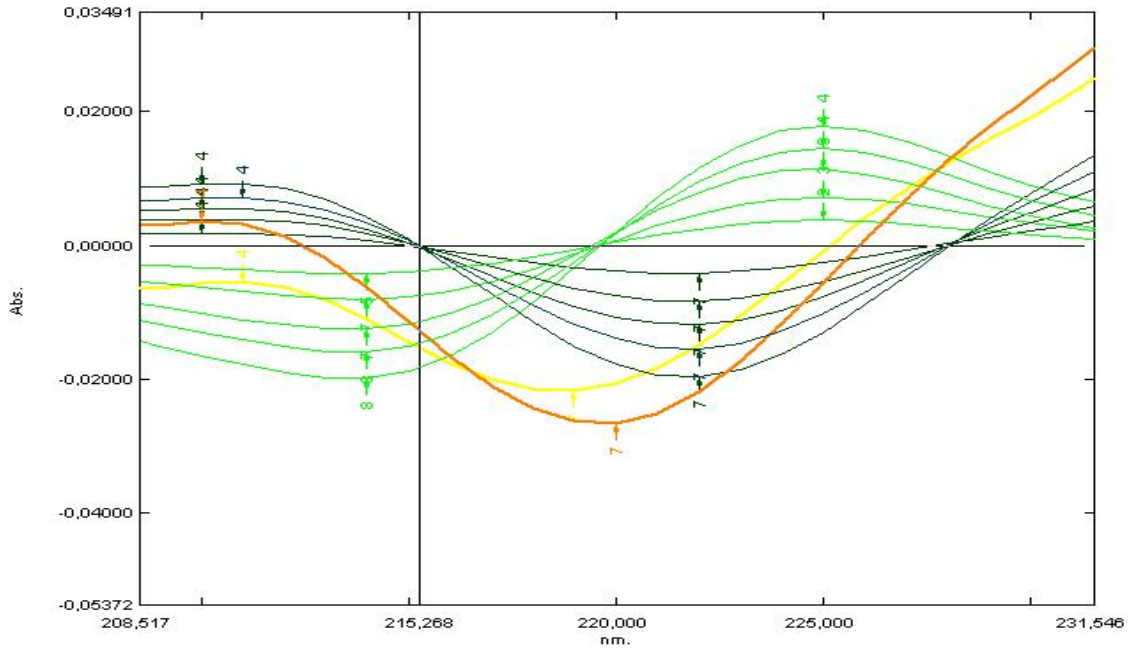
ikili bölen; 3 µg/ml kaf+ 2 µg/ml SB 'dir.



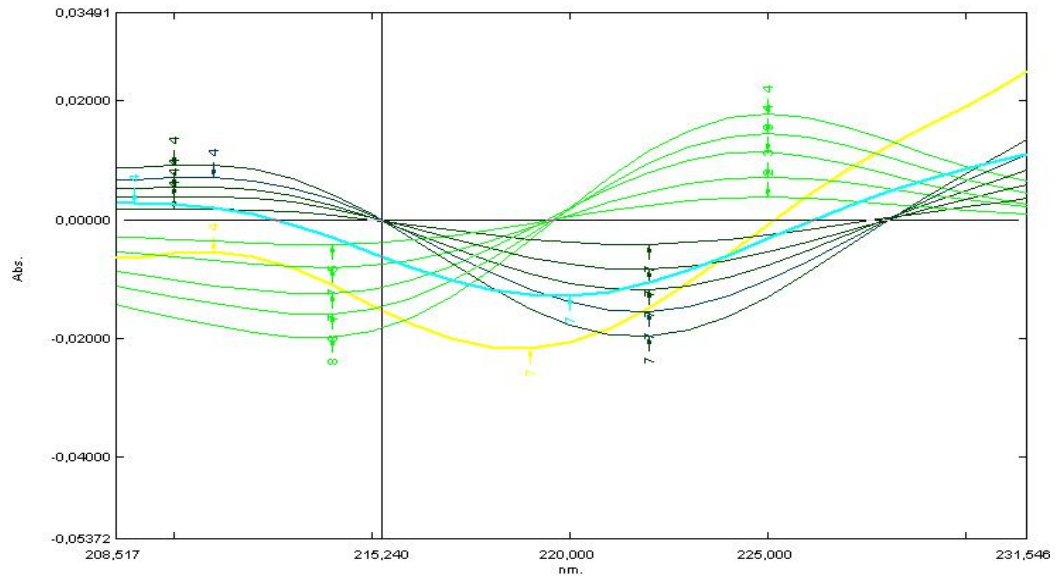
Şekil 4.7 Ace-K (siyah, 2-10 µg/ml) ve asp'ın (yeşil, 5-25 µg/ml) oran spektrumlarının 2. derece türev spektrumları ($\lambda_{\max}$: 215,2 nm) (Yöntem 1)



Şekil 4.8 Light Cola (pembe) ve dörtlü karışım içeren örneğin (sarı, 20 µg/ml asp, 10 µg/ml ace-K, 8 µg/ml kaf, 6 µg/ml SB) oran spektrumlarının 2. derece türev spektrumları ($\lambda_{\max}$: 215,2 nm) (Yöntem 1)



Şekil 4.9 Light Pepsi (turuncu) ve dörtlü karışım içeren örneğin (sarı, 20 µg/ml asp, 10 µg/ml ace-K, 8 µg/ml kaf, 6 µg/ml SB) oran spektrumlarının 2. derece türev spektrumları ($\lambda_{\max}$: 215,2 nm) (Yöntem 1)



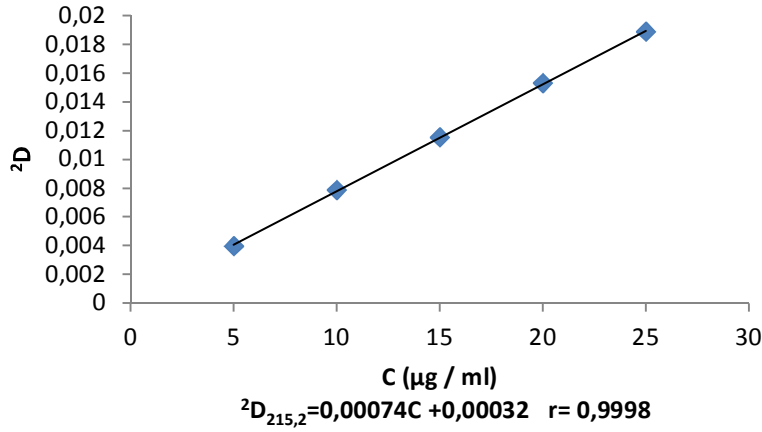
Şekil 4.10 Bütçem (turkuaz) ve dörtlü karışım içeren örneğin (sarı, 20 µg/ml asp, 10 µg/ml ace-K, 8 µg/ml kaf, 6 µg/ml SB) oran spektrumlarının 2. derece türev spektrumları ($\lambda_{\max}$: 215,2 nm) (Yöntem 1)

Çizelge 4.3 215,2 nm dalga boyunda asp için elde edilen oran türev spektrofotometrik yöntemle ait ikinci derece türev absorbans ($^2D_{215,2}$), ortalama, SD, % RSD değerleri;

C(µg/ml)	2D_1	2D_2	2D_3	$\bar{D}$	SD	%RSD
5	0,00371	0,00379	0,00372	0,00374	4,36x10-5	1,16
10	0,00754	0,00753	0,00755	0,00754	1x10-5	0,13
15	0,01135	0,01135	0,01133	0,01134	1,15x10-5	0,1
20	0,01485	0,0149	0,01489	0,01488	2,65x10-5	0,17
25	0,01828	0,01813	0,01816	0,01819	7,94x10-5	0,44
$^2D_{215,2}=0,00074C+0,00032 \quad r=0,9998$						

Çizelge 4.4 4.3’deki ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait parametreler

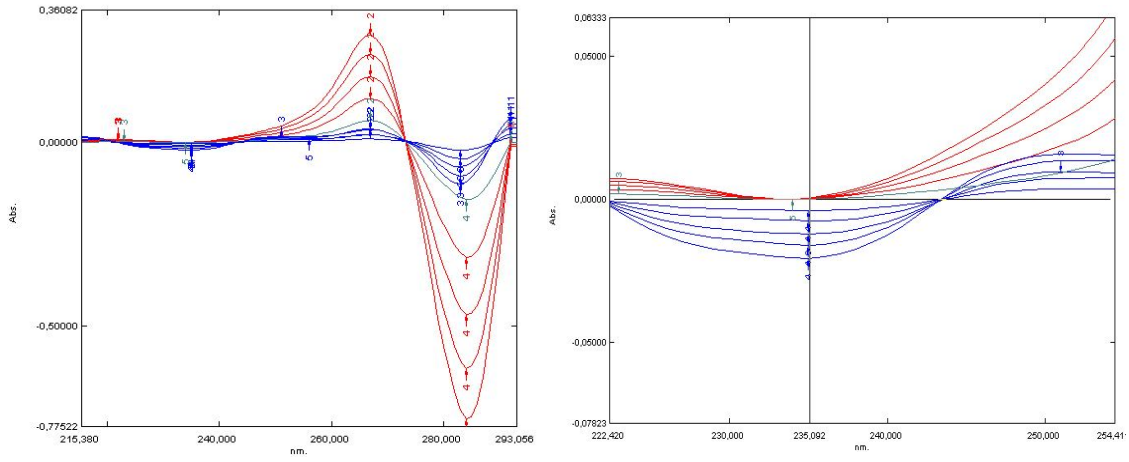
	1.ölçüm	2.ölçüm	3.ölçüm	ort.
a	0,0007	0,0007	0,0007	0,00074
b	0,0002	0,0003	0,0003	0,00032
r	0,9993	0,9999	0,9999	0,9998



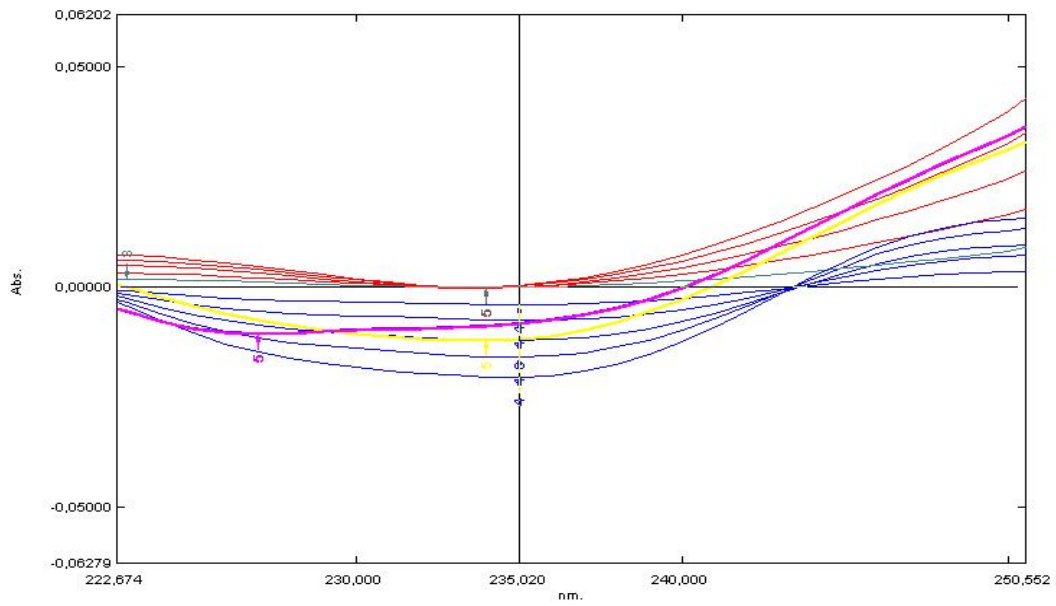
Şekil 4.11 Asp’a ait ölçü eğrisi (215,2 nm) (Yöntem 1)

4.1.3 Sodyum Benzoat Tayini;

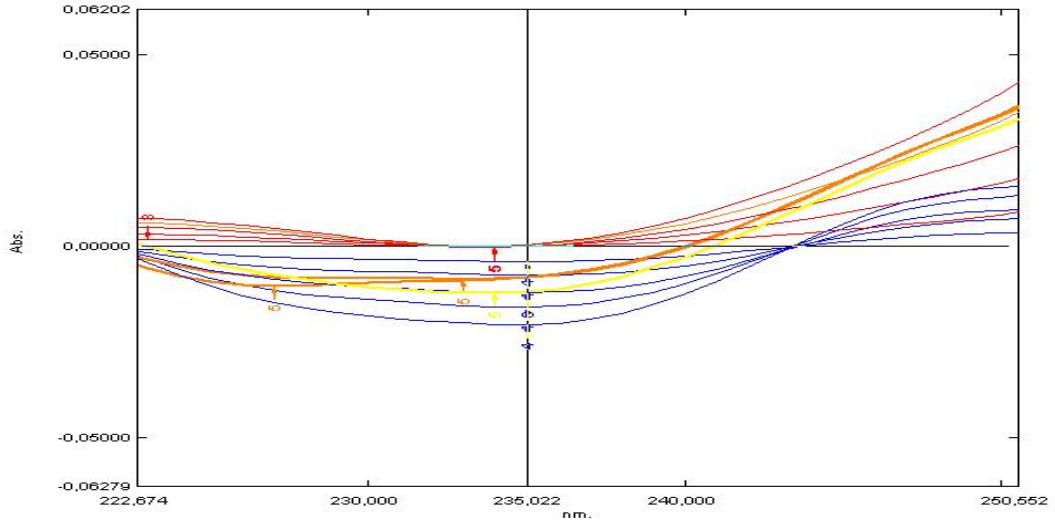
ikili bölen; 15 µg/ml asp+ 6 µg/ml ace-K ‘dir.



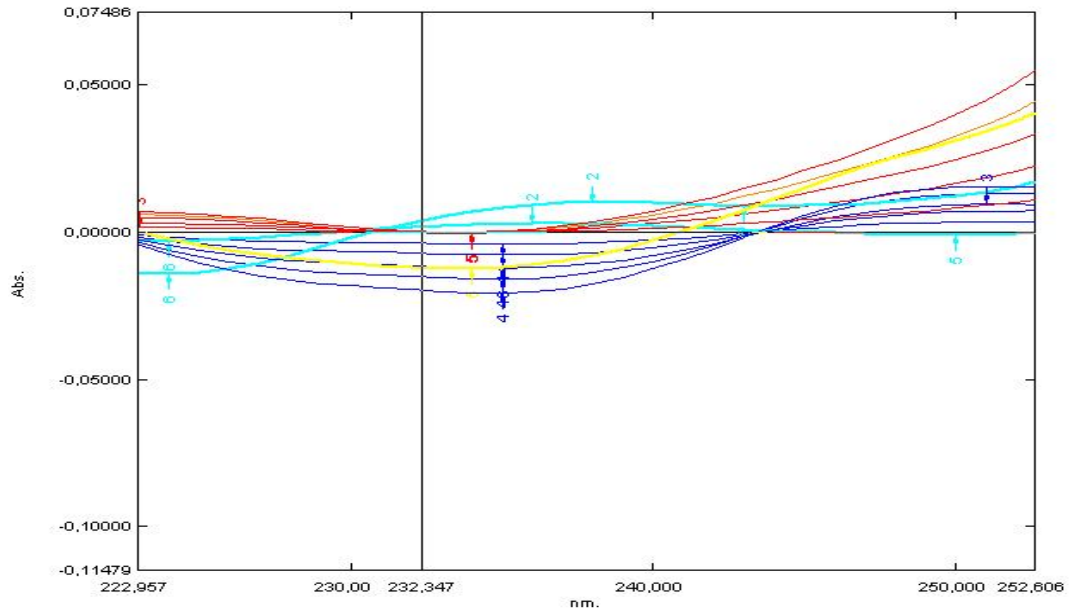
Şekil 4.12 SB (mavi, 2-10 µg/ml) ve kaf'in (kırmızı, 3-15 µg/ml) oran spektrumlarının 2.derece türev spektrumları ($\lambda_{\max}$: 235 nm) (Yöntem 1)



Şekil 4.13 Light cola (pembe) ve dörtlü karışım içeren örneğin (sarı, 20 µg/ml asp, 10 µg/ml ace-K, 8 µg/ml kaf, 6 µg/ml SB) oran spektrumlarının 2. derece türev spektrumları ($\lambda_{\max}$: 235 nm) (Yöntem 1)



Şekil 4.14 Light Pepsi (pembe) ve dörtlü karışım içeren örneğin (sarı, 20 µg/ml asp, 10 µg/ml ace-K, 8 µg/ml kaf, 6 µg/ml SB) oran spektrumlarının 2. derece türev spektrumları ($\lambda_{\max}$: 235 nm) (Yöntem 1)



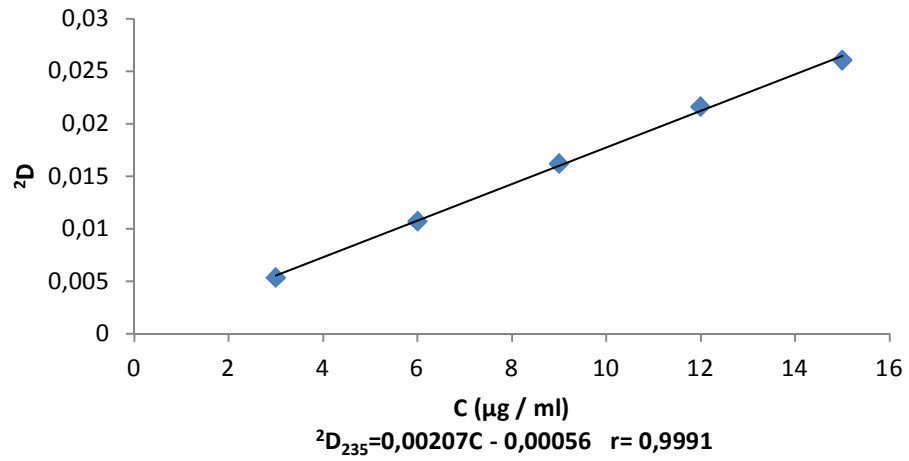
Şekil 4.15 Bütçem meyve suyu (turkuaz) ve karışım (sarı, 20 µg/ml asp, 10 µg/ml Ace-K 8 µg/ml kaf, 6 µg/ml SB) oran spektrumlarının 2. derece türev spektrumları ($\lambda_{\max}$: 232 nm) (Yöntem 1) Tayin edilemiyor

Çizelge 4.5 235 nm dalga boyunda SB için elde edilen oran türev spektrofotometrik yöntemle ait ikinci derece türev absorpsiyon ($^2D_{235}$), ortalama, SD, % RSD değerleri;

C(µg/ml)	2D_1	2D_2	2D_3	$\bar{D}$	SD	%RSD
2	0,00366	0,00378	0,003713	0,003718	6x10-5	1,6
4	0,00758	0,00754	0,00764	0,007587	5x10-5	6,7
6	0,01212	0,01196	0,011941	0,012007	1x10-4	0,8
8	0,01599	0,01548	0,015873	0,015781	2,7x10-4	1,7
10	0,02062	0,02023	0,02025	0,020367	2,2x10-4	1
$^2D_{235}=0,00207C - 0,00056 \quad r=0,9991$						

Çizelge 4.6 4.5’deki ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait parametreler

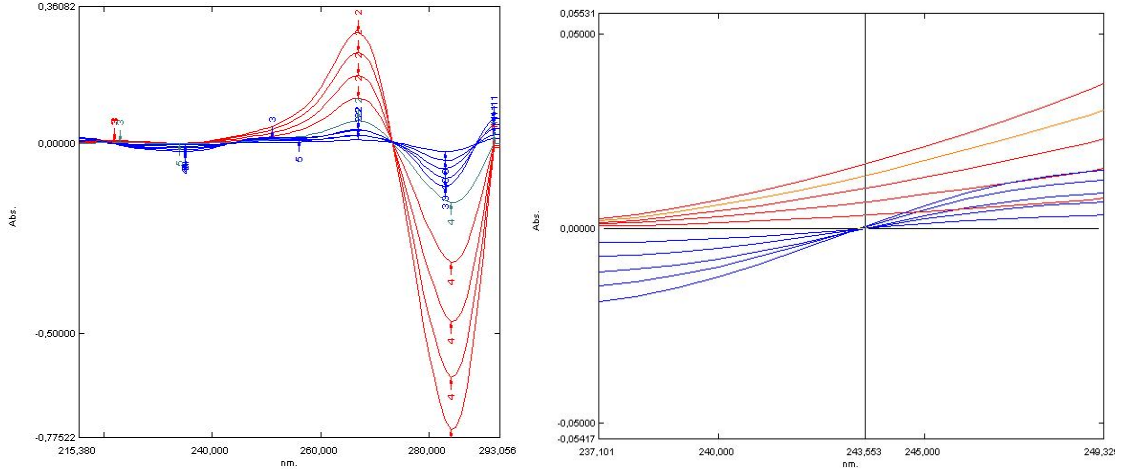
	1.ölçüm	2.ölçüm	3.ölçüm	ortalama
a	0,00206	0,00208	0,00207	0,00207
b	-0,0007	-0,0005	-0,0005	-0,00056
r	0,99920	0,99810	0,99971	0,9991



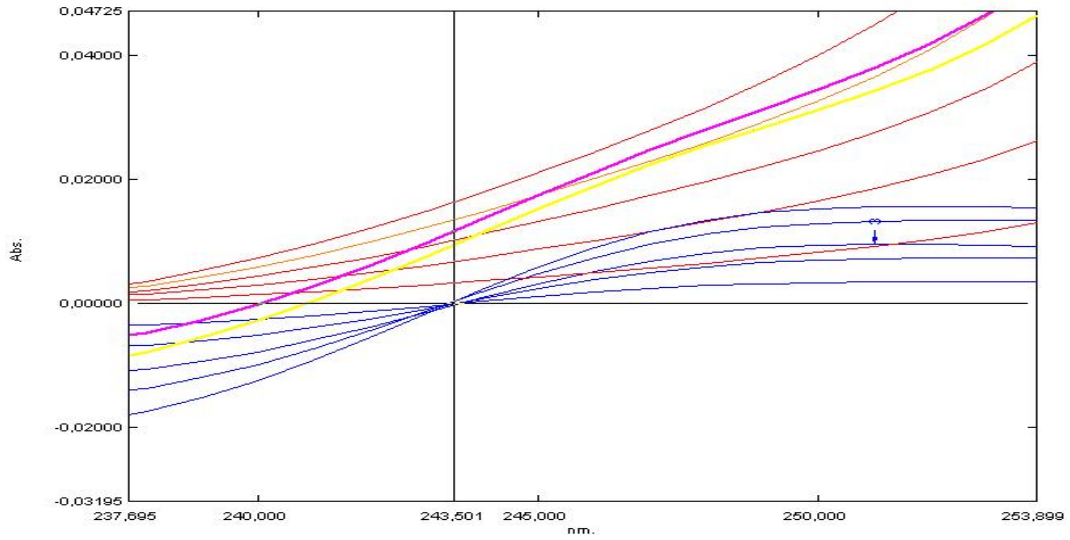
Şekil 4.16 SB’a ait ölçü eğrisi (235 nm) (Yöntem 1)

4.1.4 Kafein

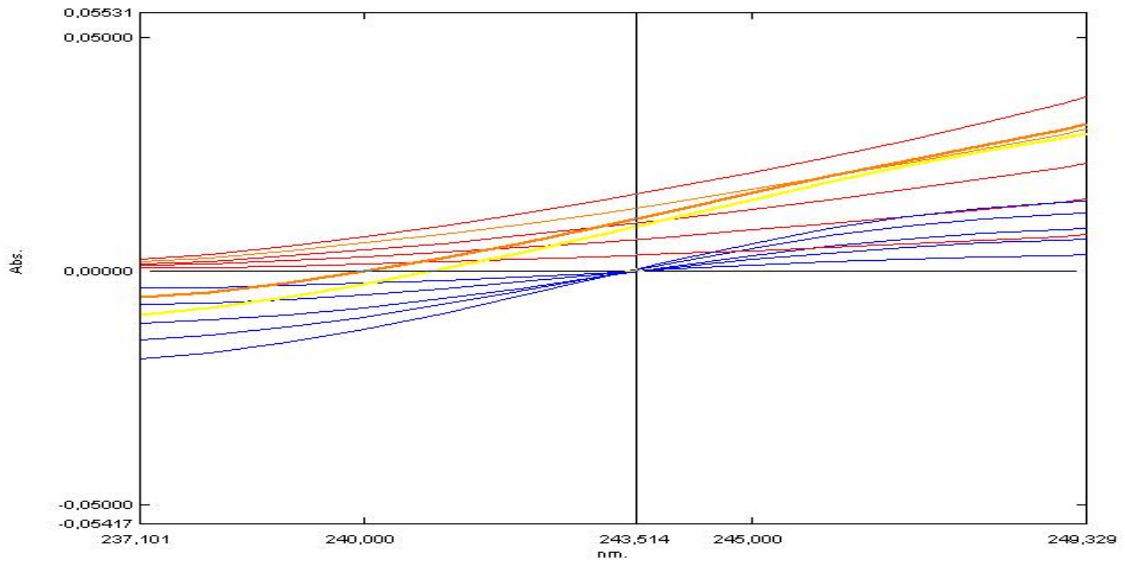
ikili bölen ; 15 µg/ml asp + 6 µg/ml ace-K'dir.



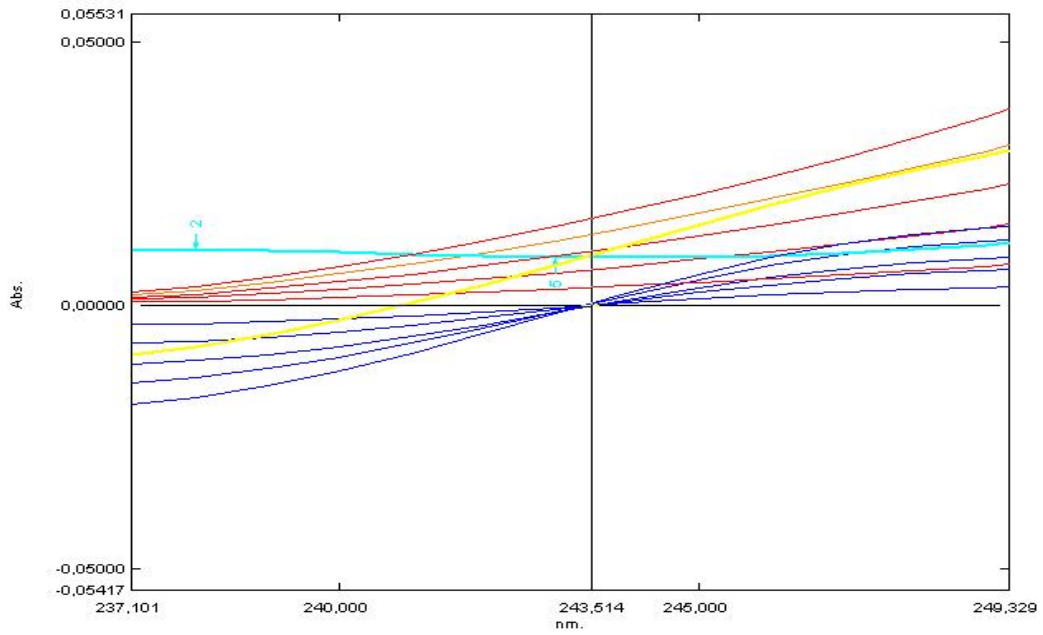
Şekil 4.17 Kaf (kırmızı, 3-15 µg/ml) ve SB'ın (mavi, 2-10 µg/ml) oran spektrumlarının 2. derece türev spektrumları ($\lambda_{\max}$: 243,5 nm) (Yöntem 1)



Şekil 4.18 Light cola (pembe) ve dörtlü karışım içeren örneğin (sarı, 20 µg/ml asp, 10 µg/ml ace-K, 8 µg/ml kaf, 6 µg/ml SB) oran spektrumlarının 2. derece türev spektrumları ($\lambda_{\max}$: 243,5 nm) (Yöntem 1)



Şekil 4.19 Light Pepsi (pembe) ve dörtlü karışım içeren örneğin (sarı, 20 µg/ml asp, 10 µg/ml ace-K, 8 µg/ml kaf, 6 µg/ml SB) oran spektrumlarının 2. Derece türev spektrumları ($\lambda_{\max}$: 243,5 nm) (Yöntem 1)



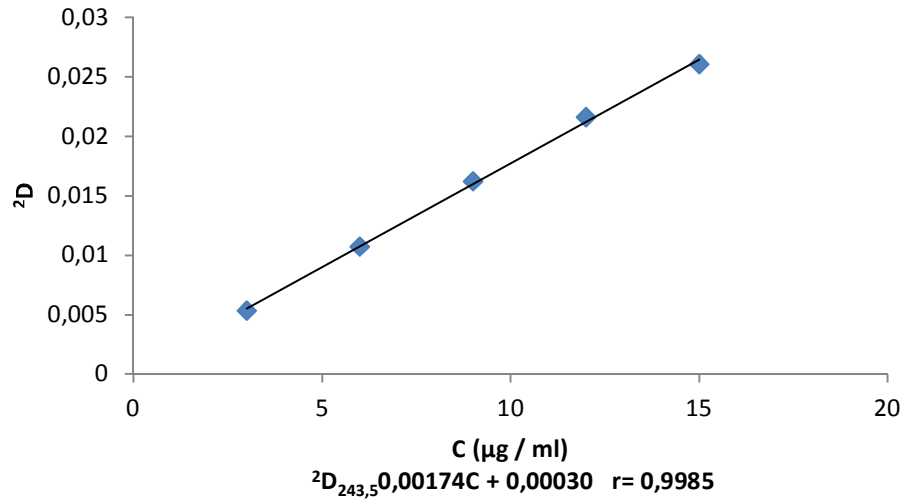
Şekil 4.20 Bütçem meyve suyu (turkuaz) ve dörtlü karışım içeren örneğin (sarı, 20 µg/ml asp, 10 µg/ml ace-K, 8 µg/ml kaf, 6 µg/ml SB) oran spektrumlarının 2. derece türev spektrumları ($\lambda_{\max}$: 243,5 nm) (Yöntem 1)

Çizelge 4.7 243,5 nm dalga boyunda kaf için elde edilen oran türev spektrofotometrik yöntemle ait ikinci derece türev absorbens ($^2D_{243,5}$), ortalama, SD, % RSD değerleri;

C(µg/ml)	2D_1	2D_2	2D_3	$\bar{D}$	SD	%RSD
3	0,00532	0,00537	0,00534	0,00534	3x10-5	0,5
6	0,0107	0,01074	0,01073	0,01072	2x10-5	0,2
9	0,01622	0,01619	0,01621	0,01621	2x10-5	0,1
12	0,02163	0,02159	0,02164	0,02162	3x10-5	0,1
15	0,02596	0,02609	0,02607	0,02604	7x10-5	0,3
$^2D_{243,5} = 0,00174C + 0,00030 \quad r = 0,9985$						

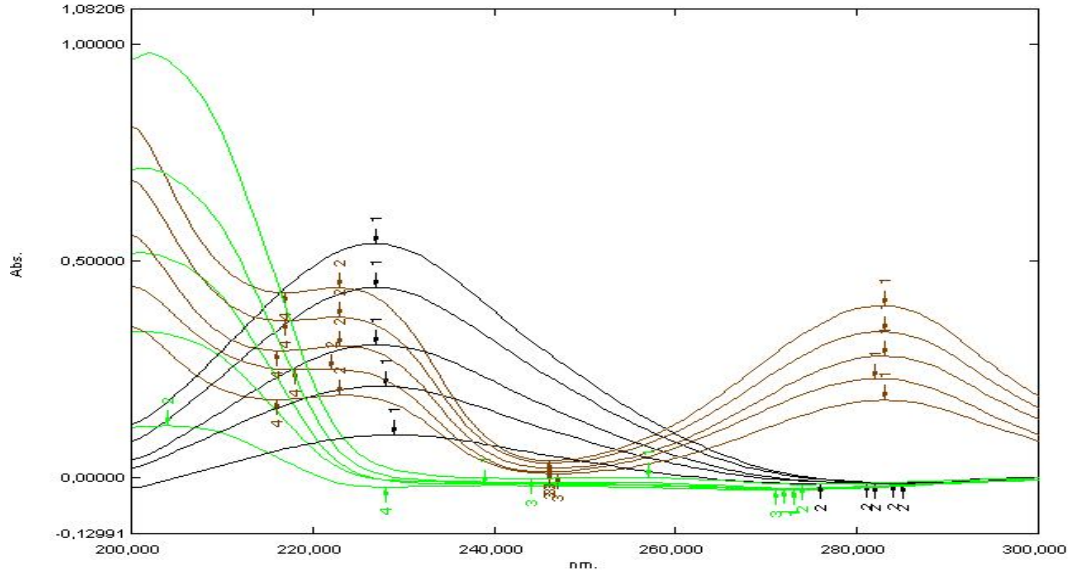
Çizelge 4.8 4.7’deki ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait parametreler

	1.ölçüm	2.ölçüm	3.ölçüm	ort.
a	0,00174	0,00171	0,00177	0,00174
b	0,00030	0,00030	0,00130	0,00030
r	0,99820	0,99880	0,99851	0,9985



Şekil 4.21 Kaf ‘e ait ölçü eğrisi (243,5 nm) (Yöntem 1)

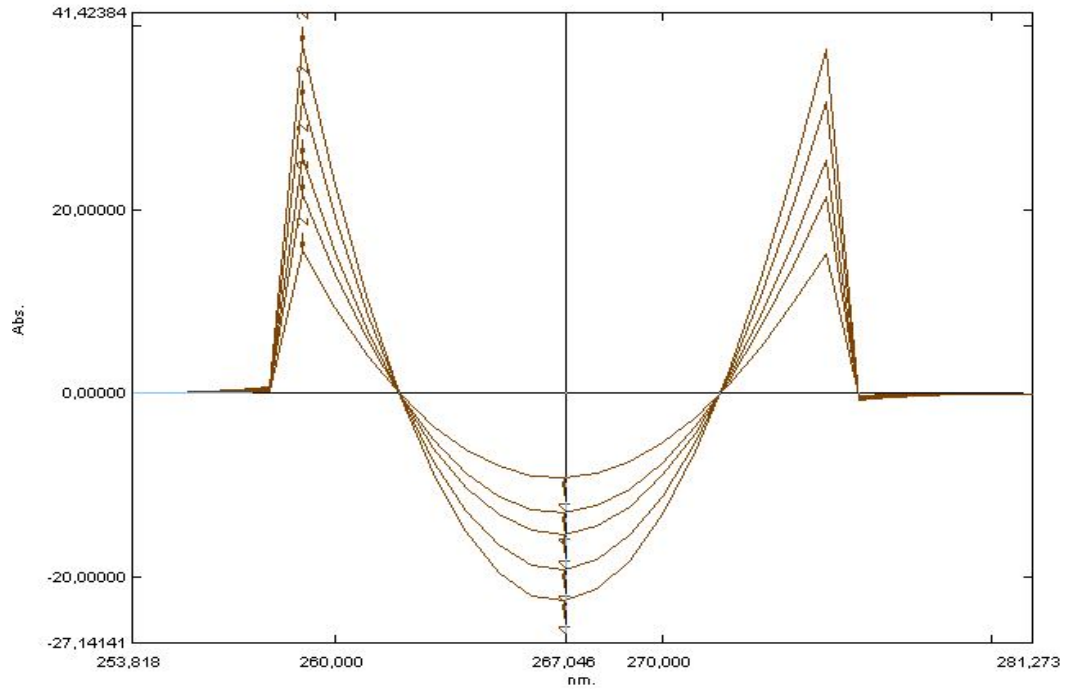
4.2 NHDC, Asp ve Ace-K Üçlü Bileşenleri İçeren Karışımların Oran Türev Spektroskopik Yöntem ile Analizi (Yöntem 1)



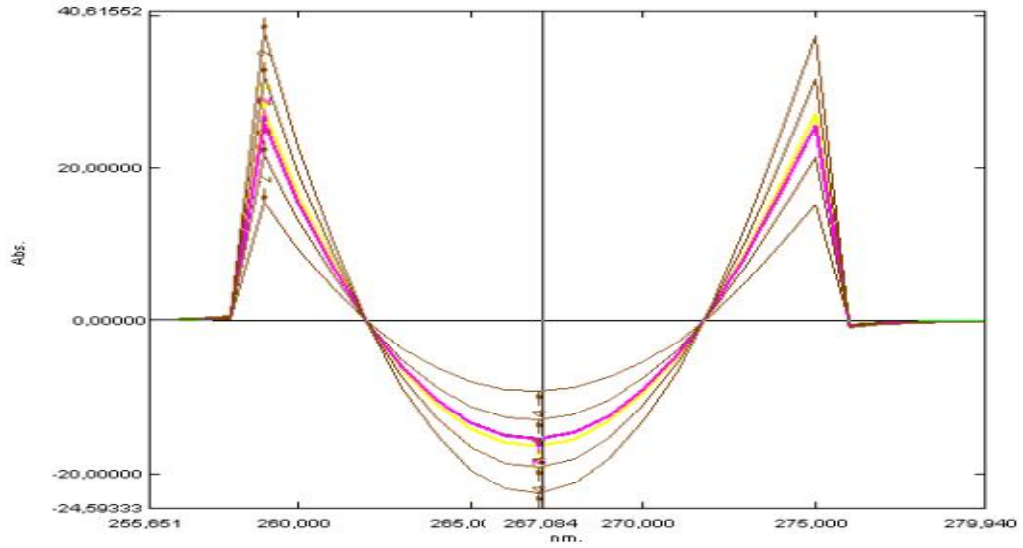
Şekil 4.22 Saf NHDC (kahverengi, 75-175 $\mu\text{g/ml}$), ace-K (siyah, 2-10 $\mu\text{g/ml}$) ve asp'a (yeşil, 5-25 $\mu\text{g/ml}$) ait absorpsiyon spektrumları (Yöntem 1)

4.2.1 Neohesperidin Dihidrokalton Tayini

İkili oran için; 10 $\mu\text{g/ml}$ + asp 4 $\mu\text{g/ml}$ ace-K



Şekil 4.23 NHDC ait oran spektrumunun 2.derece türev spektrumu (λ_{max} :267 nm) (Yöntem 1)



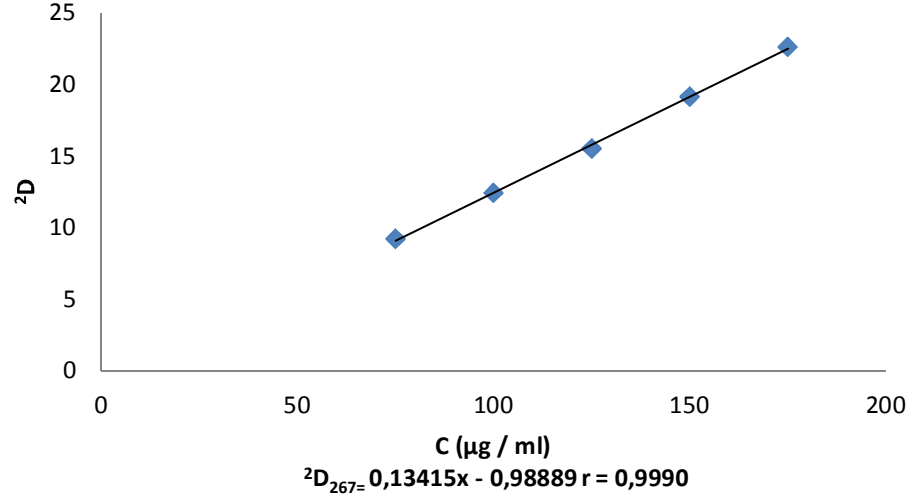
Şekil 4.24 Link (pembe) ve üçlü karışım içeren örneğin (sarı, 125 µg/ml NHDC, 15 µg/ml asp, 10 µg/ml ace-K) oran spektrumların 2.derece türev spektrumlar ($\lambda_{\max}$: 267 nm) (Yöntem 1)

Çizelge 4.9 267 nm dalga boyunda NHDC için elde edilen oran türev spektrofotometrik yöntemle ait ikinci derece türev absorpsiyon ($^2D_{267}$), ortalama, SD, % RSD değerleri;

C(µg/ml)	2D_1	2D_2	2D_3	$\bar{D}$	SD	%RSD
75	9,2123	9,2089	9,2119	9,2110	$1,8 \times 10^{-3}$	$2,0 \times 10^{-2}$
100	12,3724	12,4358	12,4274	12,4123	$3,5 \times 10^{-3}$	$2,7 \times 10^{-2}$
125	15,4902	15,5207	15,531	15,5140	4×10^{-4}	$1,3 \times 10^{-1}$
150	19,151	19,1517	19,1524	19,1517	7×10^{-4}	$3,6 \times 10^{-3}$
175	22,6068	22,6098	22,6135	22,6100	$3,3 \times 10^{-3}$	$1,4 \times 10^{-2}$
$^2D_{267} = 0,13415x - 0,9888$ $r = 0,9990$						

Çizelge 4.10 4.09'deki ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait parametreler

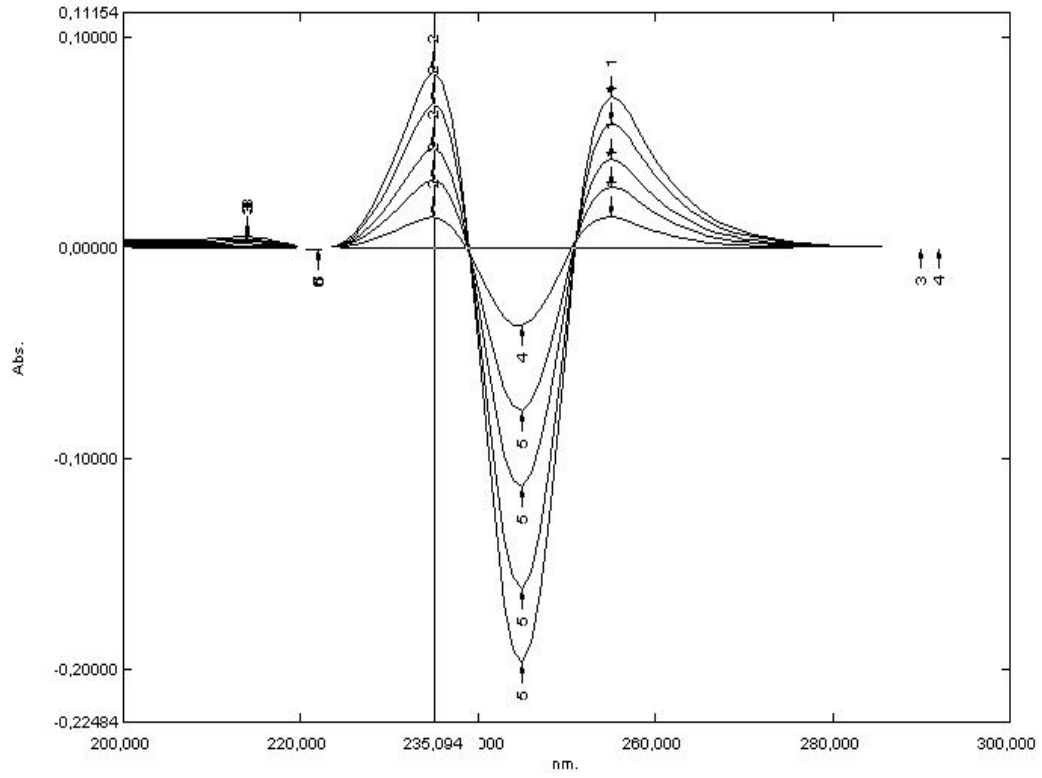
	1.ölçüm	2.ölçüm	3.ölçüm	ort.
a	0,13436	0,13414	0,13415	0,13415
b	-1,01734	-0,97351	-0,97591	-0,98889
r	0,99892	0,99904	0,99901	0,9990



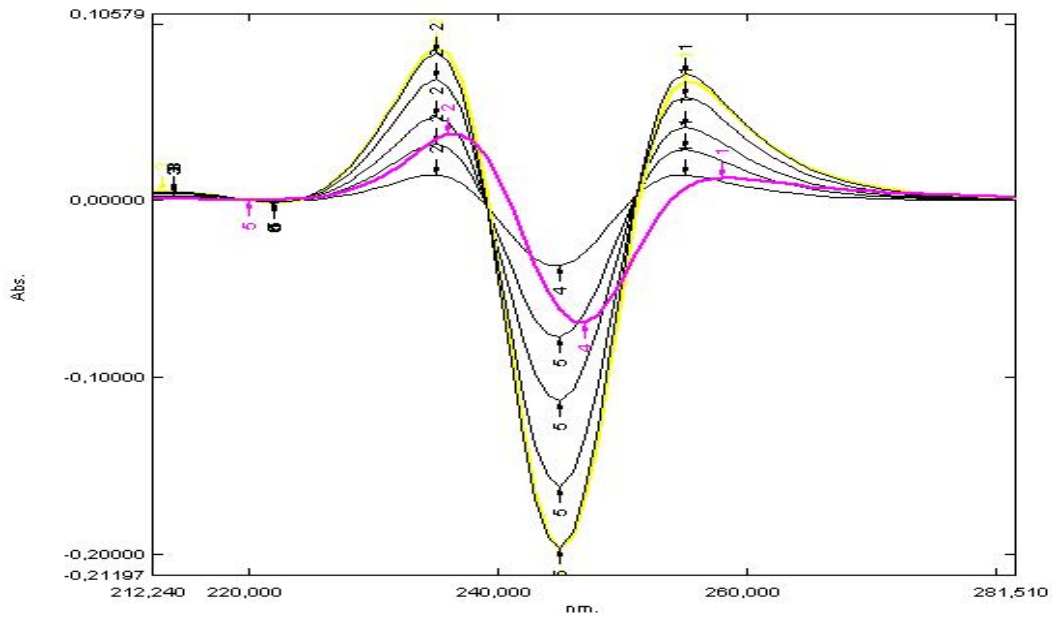
Şekil 4.25 NHDC'a ait ölçü eğrisi (267 nm) (Yöntem 1)

4.2.2 Asesülfam-K Tayini;

İkili oran için: 125 µg/ml NHDC + 15 µg/ml asp



Şekil 4.26 Ace-K 'ya ait oran spektrumunun 2.derece türev spektrumu ($\lambda_{\max}$: 235nm)
(Yöntem 1)



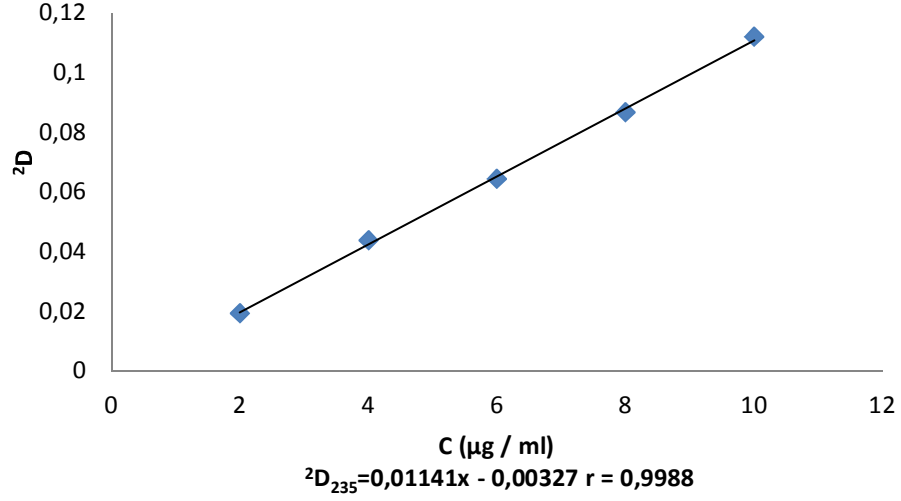
Şekil 4.27 Link (pembe) ve üçlü karışım içeren örneğin (sarı, 125 µg/ml NHDC 15 µg/ml, asp 10 µg/ml, ace-K) oran spektrumlarının 2. Derece türev spektrumları (λ_{max} : 235nm) (Yöntem 1)

Çizelge 4.11 235 nm dalga boyunda ace-K için elde edilen oran türev spektrofotometrik yöntemine ait ikinci derece türev absorbens ($^2D_{235}$), ortalama, SD, % RSD değerleri;

C(µg/ml)	2D_1	2D_2	2D_3	$\bar{D}$	SD	%RSD
2	0,0197	0,0183	0,0199	0,0193	$8,9 \times 10^{-4}$	$4,6 \times 10^{-2}$
4	0,0434	0,0432	0,0445	0,0437	7×10^{-4}	$1,6 \times 10^{-2}$
6	0,0635	0,0649	0,0645	0,0643	$7,4 \times 10^{-4}$	$1,1 \times 10^{-2}$
8	0,0865	0,0866	0,0865	0,0865	$4,5 \times 10^{-5}$	$5,2 \times 10^{-4}$
10	0,1135	0,1125	0,1098	0,1119	$1,9 \times 10^{-3}$	$1,7 \times 10^{-2}$
$^2D_{235}=0,0114C - 0,0033 \quad r = 0,9989$						

Çizelge 4.12 4.11'deki ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait parametreler

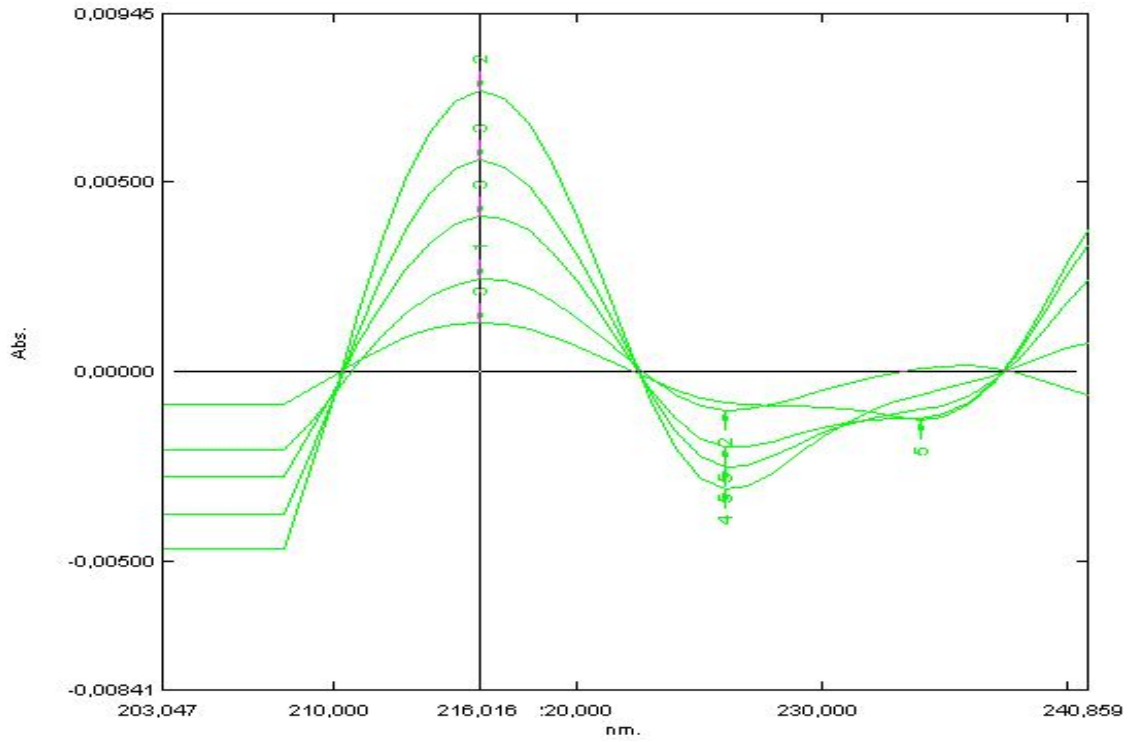
	1.ölçüm	2.ölçüm	3.ölçüm	ort.
a	0,01151	0,01162	0,01110	0,01140
b	-0,00381	-0,00450	-0,00152	-0,00330
r	0,99770	0,99891	0,99912	0,9989



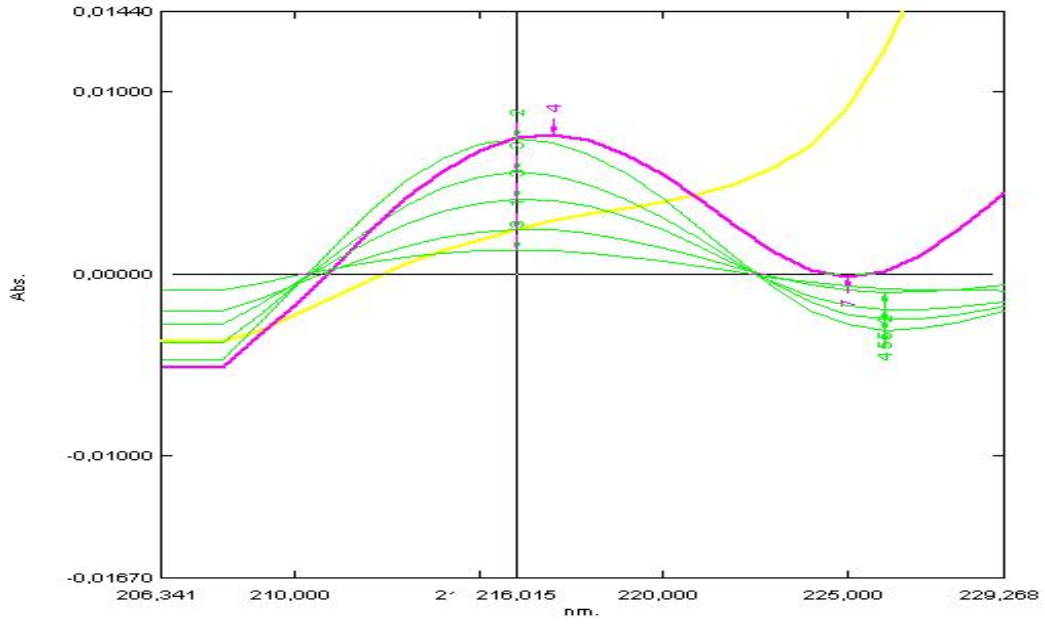
Şekil 4.28 Ace-K'ya ait ölçü eğrisi (235 nm) (Yöntem 1)

4.2.3 Aspartam Tayini;

ikili oran: 100 µg/ml + NHDC 4 µg/ml ace-K'dir.



Şekil 4.29 Asp 'a ait oran spektrumunun 3. derece türev spektrumu ($\lambda_{\max}$: 216 nm) (Yöntem 1)



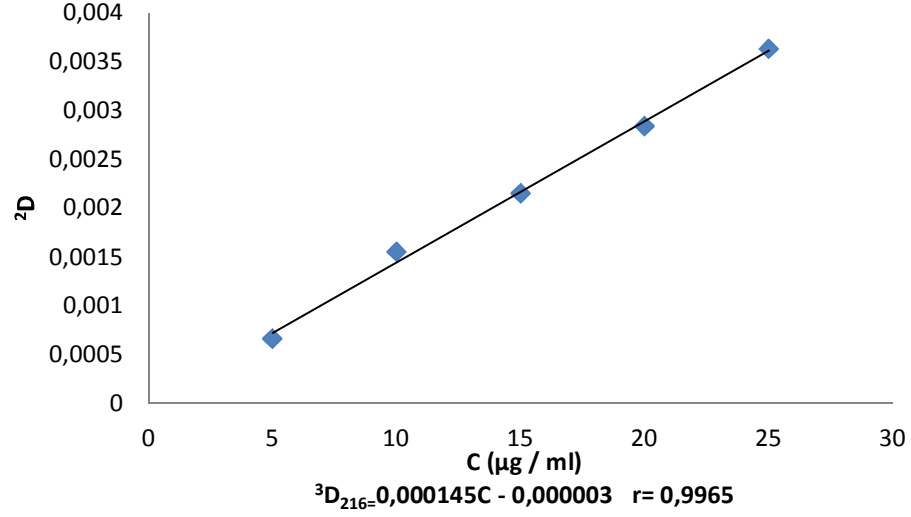
Şekil 4.30 Link (pembe) ve üçlü karışım içeren örneğin (sarı, 125 µg/ml NHDC, 25 µg/ml asp, 6 µg/ml ace-K) oran spektrumlarının 3. derece türev spektrumları ($\lambda_{\max}$ 216 nm) (Yöntem 1)

Çizelge 4.13 216 nm dalga boyunda asp için elde edilen oran türev spektrofotometrik yöntemine ait üçüncü derece türev absorbans ($^3D_{216}$), ortalama, SD, % RSD değerleri;

C(µg/ml)	3D_1	3D_1	3D_1	$\bar{D}$	SD	%RSD
5	0,00069	0,00068	0,00066	0,00066	2x10-5	2,3
10	0,00156	0,00158	0,00155	0,00155	2x10-5	0,9
15	0,00212	0,00216	0,00215	0,00215	2x10-5	0,9
20	0,00258	0,00283	0,00284	0,00284	1,5x10-4	5,1
25	0,00352	0,00361	0,00363	0,00363	6x10-5	1,6
$^3D_{216}=0,000145C - 0,000003 \quad r = 0,9965$						

Çizelge 4.14 4.13'deki ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait parametreler

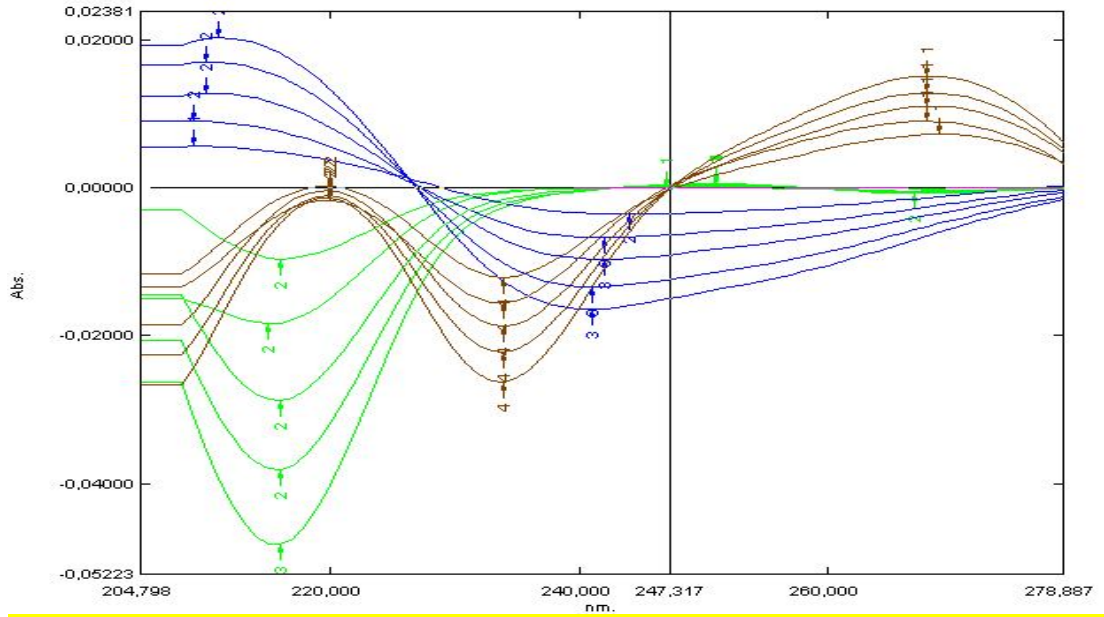
	1.ölçüm	2.ölçüm	3.ölçüm	ort.
a	0,00013	0,00014	0,00014	0,000145
b	0,000002	0,00004	0,0000003	0,000003
r	0,9857	0,9956	0,9965	0,9965



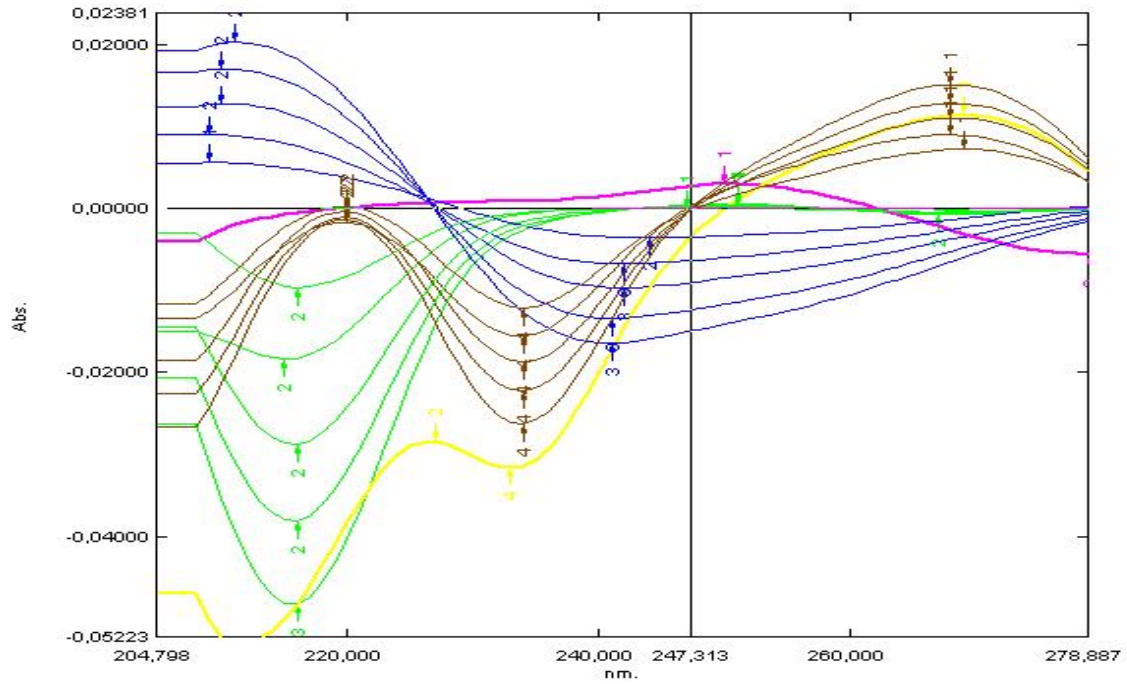
Şekil 4.31 Asp ‘a ait ölçü eğrisi (216 nm) (Yöntem 1)

4.3 NHDC, Asp ve Ace-K Üçlü Bileşenleri İçeren Karışımların Türev Spektroskopik Yöntemi ile Analizi (Yöntem 2)

4.3.1 Asesülfam –k Tayini



Şekil 4.32 NHDC (kahverengi, 75-175 µg/ml), ace-K (mavi, 2-10 µg/ml) ve asp ‘ın (yeşil, 5-25 µg/ml) 1. derece türev spektrumları ($\lambda_{\max}$: 247,3 nm) (Yöntem 2)



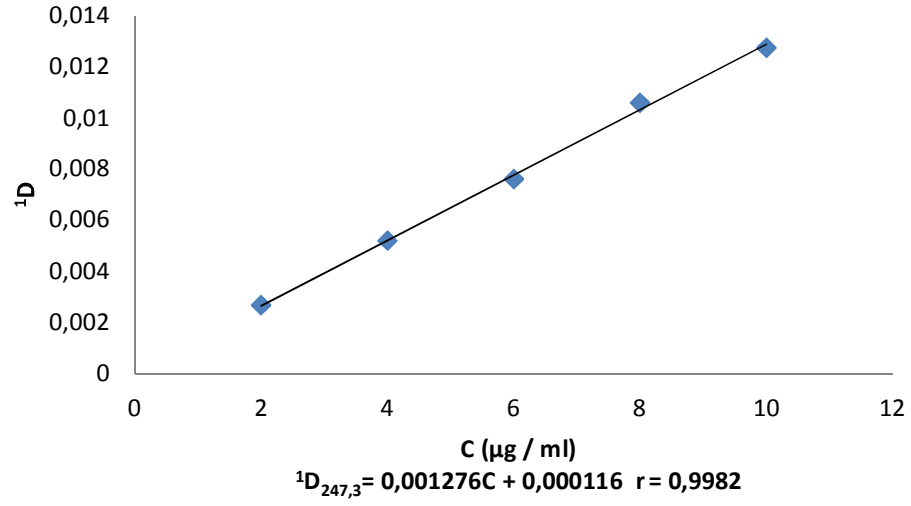
Şekil 4.33 Link (pembe) ve üçlü karışım içeren örneğin (sarı, 175 µg/ml NHDC, 25 µg/ml asp, 2 µg/ml ace-K) ait 1.derece türev spektrumları ($\lambda_{\max}$: 247,3 nm) (Yöntem 2) taayin edilemiyor

Çizelge 4.15 247,3 nm dalga boyunda ace-K için elde edilen türev spektrofotometrik yöntemle ait birinci derece türev absorbans ($^1D_{247,3}$), ortalama, SD, % RSD değerleri;

C(µg/ml)	1D_1	1D_2	1D_3	$\bar{D}$	SD	%RSD
2	0,00262	0,00267	0,00258	0,00269	1,6x10 ⁻⁴	5,8
4	0,0051	0,00527	0,00523	0,0052	9x10 ⁻⁵	1,7
6	0,00749	0,00772	0,00765	0,00762	1,2x10 ⁻⁴	1,5
8	0,01065	0,01042	0,01072	0,0106	1,6x10 ⁻⁴	1,5
10	0,0127	0,01267	0,01289	0,01275	1,2x10 ⁻⁴	0,9
$^1D_{247,3} = 0,001276C + 0,000116$ $r = 0,9982$						

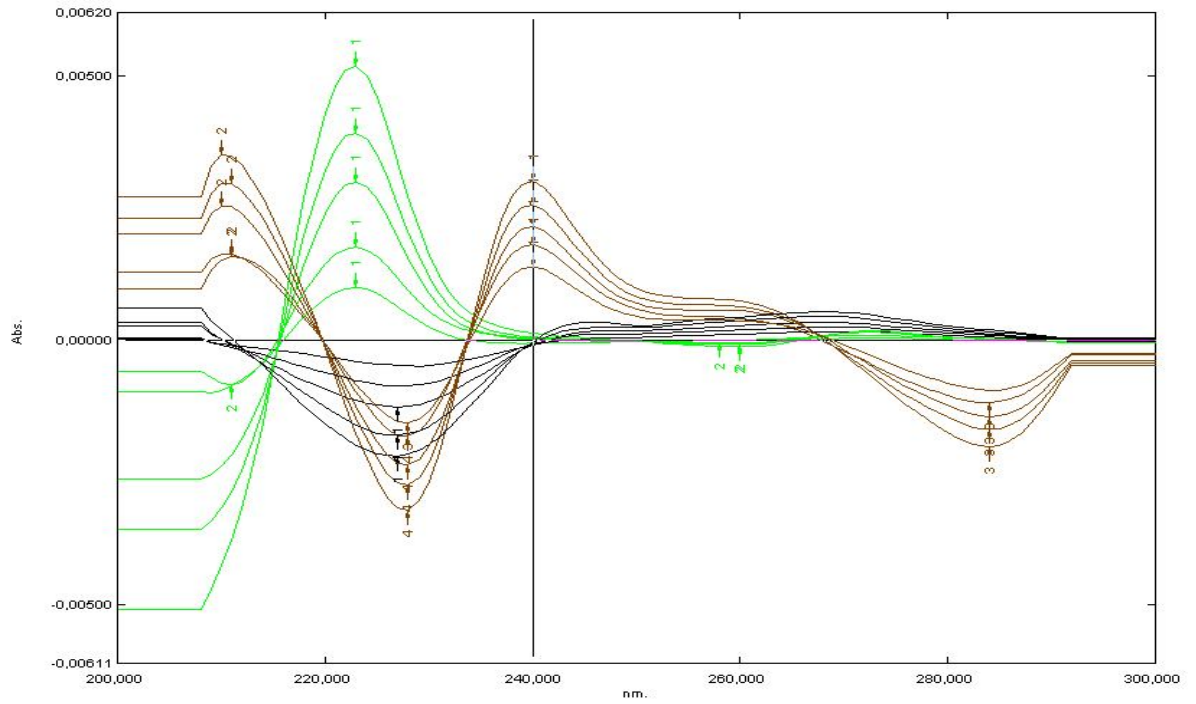
Çizelge 4.16 4.15'deki ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait parametreler

	1.ölçüm	2.ölçüm	3.ölçüm	ort.
a	0,00129	0,0013	0,00131	0,0013
b	-0,00009	0,0002	-0,00002	0,0001
r	0,9968	0,9994	0,99801	0,9982

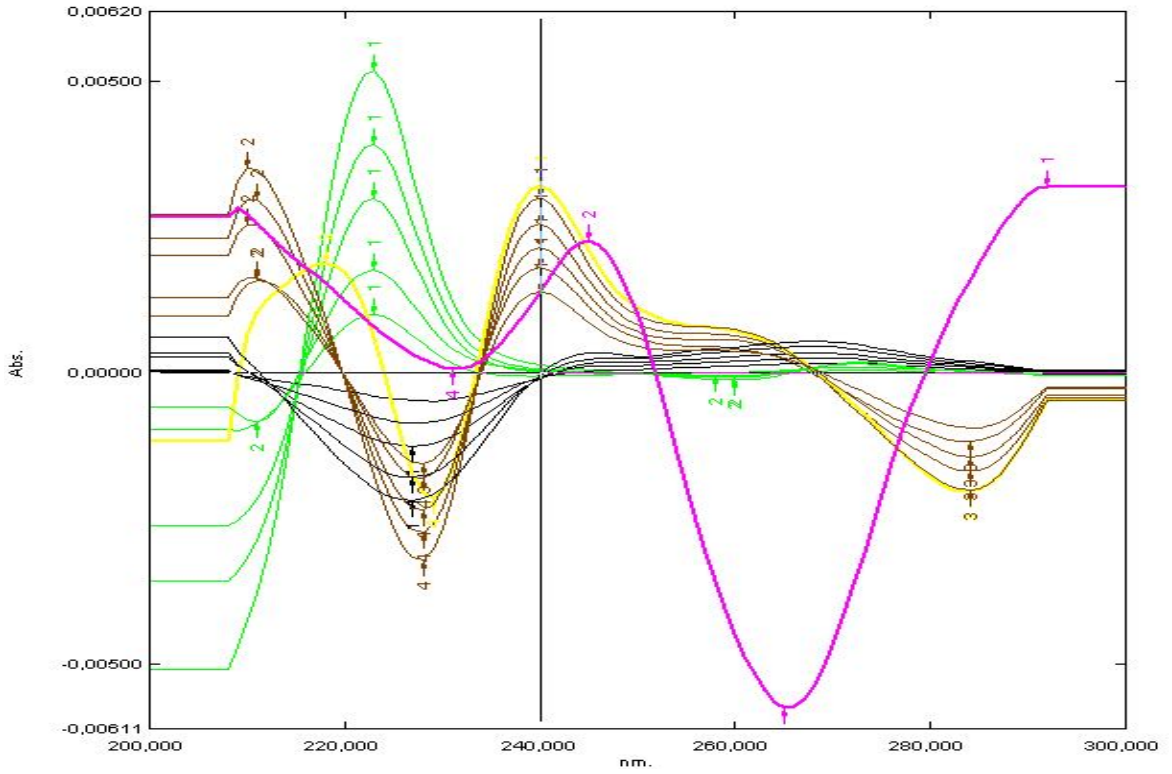


Şekil 4.34 Ace-K 'ya ait ölçü eğrisi (247,3 nm) (Yöntem 2)

4.3.2 Neohesperidin Dihidrokalgon Tayini



Şekil 4.35 NHDC (kahverengi, 75-175 µg/ml), ace-K (siyah, 2-10 µg/ml) ve asp 'ın (yeşil, 5-25 µg/ml) 2.türev spektrumları (240 nm) (Yöntem 2)



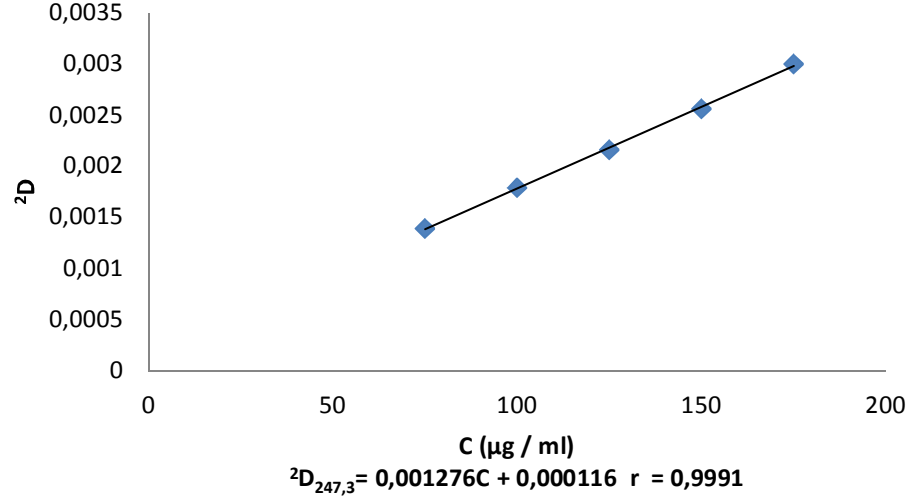
Şekil 4.36 Link (pembe) ve üçlü karışım içeren örneğin (sarı, 175 µg/ml NHDC, 15 µg/ml asp, 2 µg/ml ace-K) 2.derece türev spektrumları (Yöntem 2)

Çizelge 4.17 240 nm dalga boyunda NHDC için elde edilen türev spektrofotometrik yöntemle ait ikinci derece türev absorpsiyon ($^2D_{240}$), ortalama, SD, % RSD değerleri;

C(µg/ml)	2D_1	2D_2	2D_3	$\bar{D}$	SD	%RSD
75	0,00139	0,0014	0,00139	0,00139	1x10-5	0,41
100	0,0018	0,00179	0,00178	0,00179	1x10-5	0,55
125	0,00216	0,00215	0,00217	0,00216	1x10-5	0,46
150	0,00256	0,00257	0,00256	0,00256	1x10-5	0,22
175	0,00301	0,00299	0,003	0,003	1x10-5	0,33
$^2D_{240} = 0,000016C + 0,000185$ $r=0,9991$						

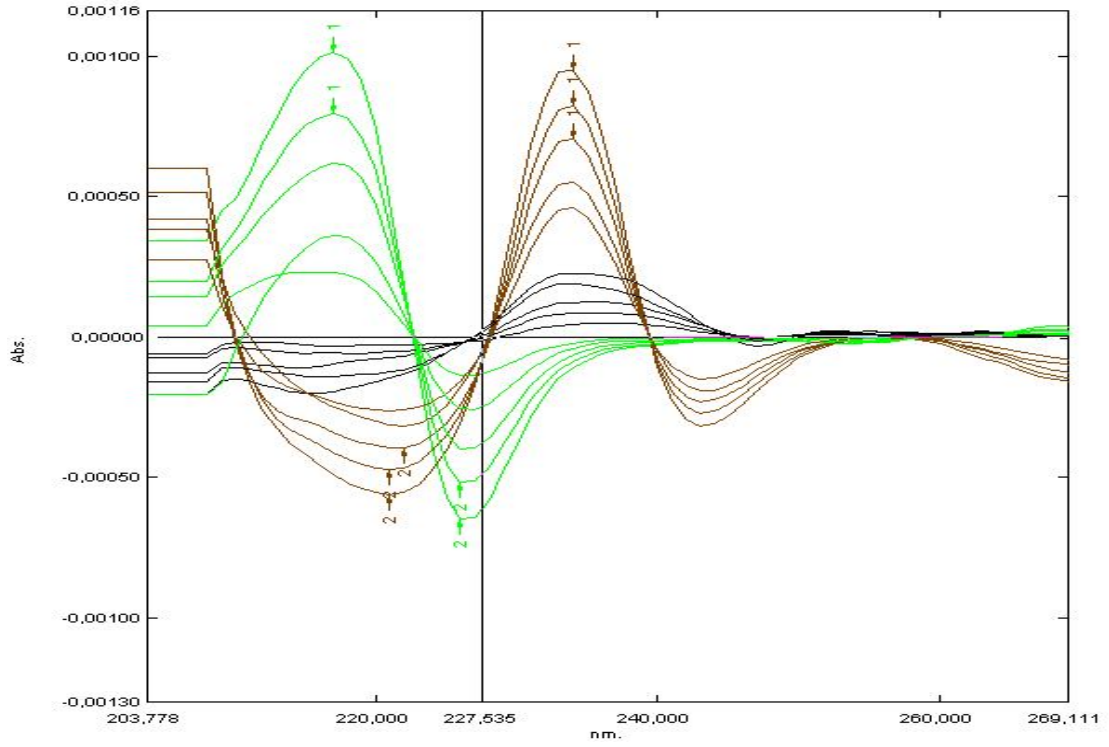
Çizelge 4.18 4.17'deki ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait parametreler

	1.ölçüm	2.ölçüm	3.ölçüm	ort.
a	0,00002	0,00002	0,00002	0,00002
b	0,00018	0,0002	0,00018	0,00019
r	0,9986	0,9991	0,9993	0,9991

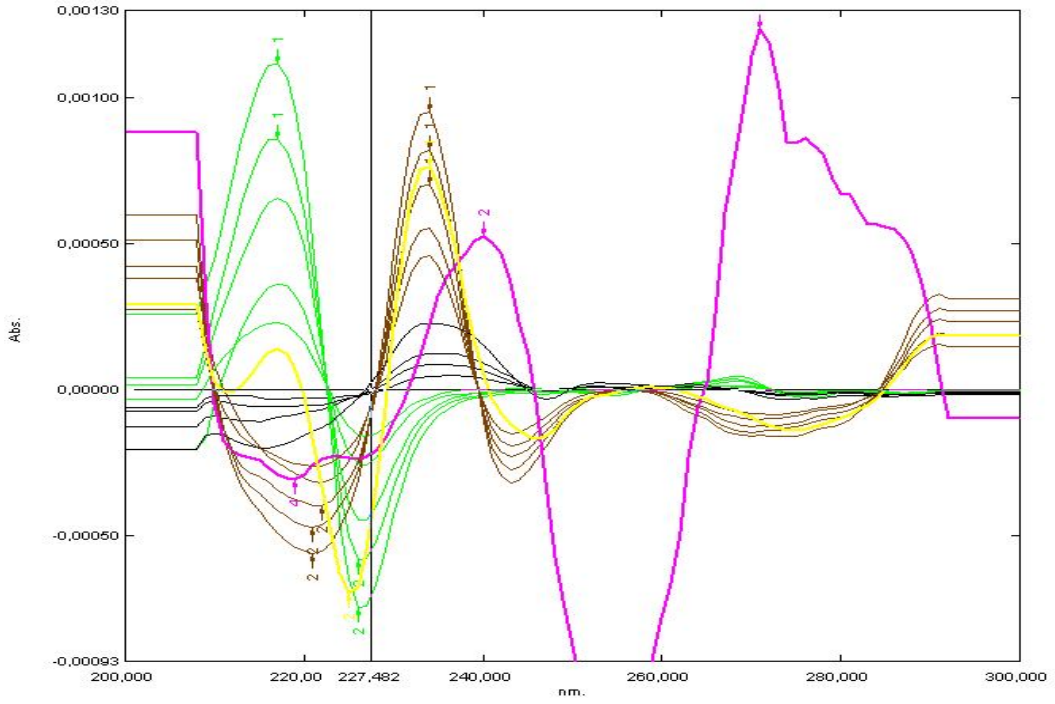


Şekil 4.37 NHDC 'a ait ölçü eğrisi (240 nm)(Yöntem 2)

4.3.3 Aspartam Tayini



Şekil 4.38 Asp 'ın (yeşil, 5-25 µg/ml), ace-K (siyah, 2-10 µg/ml) ve NHDC'in (kahverengi, 75-175 µg/ml) 3.derece türev spektrumları ($\lambda_{\max}$: 227,5 nm) (Yöntem 2)



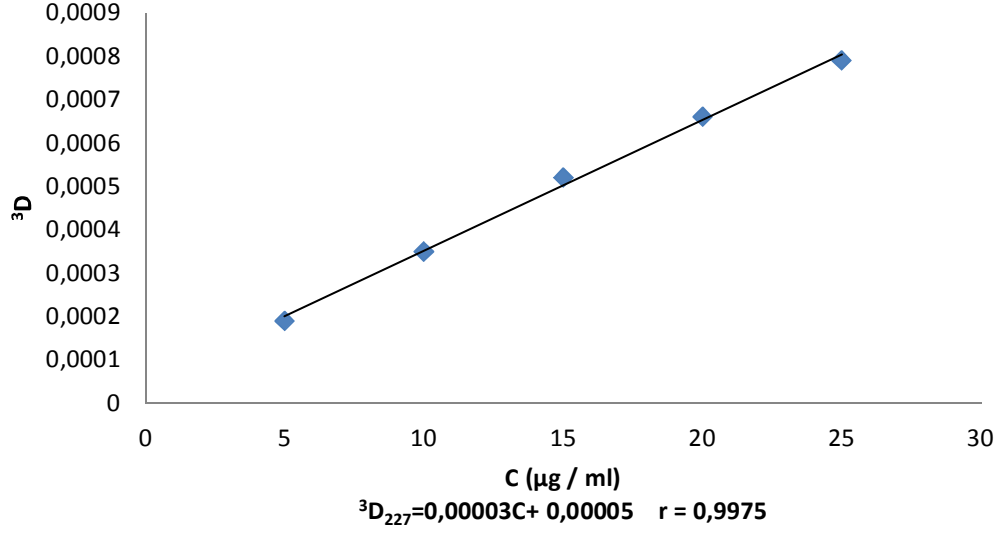
Şekil 4.39 Link (pembe) ve üçlü karışım içeren örneğin (sarı, 75 µg/ml NHDC, 15 µg/ml asp, 10 µg/ml ace-K) 3. derece türev spektrumları ($\lambda_{\max}$: 227,5 nm) (Yöntem 2)

Çizelge 4.19 227,5 nm dalga boyunda asp için elde edilen türev spektrofotometrik yöntemle ait 3. derece türev absorpsiyon ($^3D_{227,5}$), ortalama, SD, % RSD değerleri;

C(µg/ml)	3D_1	3D_2	3D_3	$\bar{D}$	SD	%RSD
5	0,00018	0,00019	0,0002	0,00019	1x10 ⁻⁵	5,3
10	0,00036	0,00037	0,00033	0,00035	2x10 ⁻⁵	5,9
15	0,0005	0,00053	0,00052	0,00052	2x10 ⁻⁵	2,9
20	0,00064	0,00066	0,00068	0,00066	2x10 ⁻⁵	3
25	0,00079	0,0008	0,00078	0,00079	1x10 ⁻⁵	1,2
$^3D_{227,5} = 0,00003C + 0,00005 \quad r = 0,9975$						

Çizelge 4.20 4.19'deki ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait parametreler

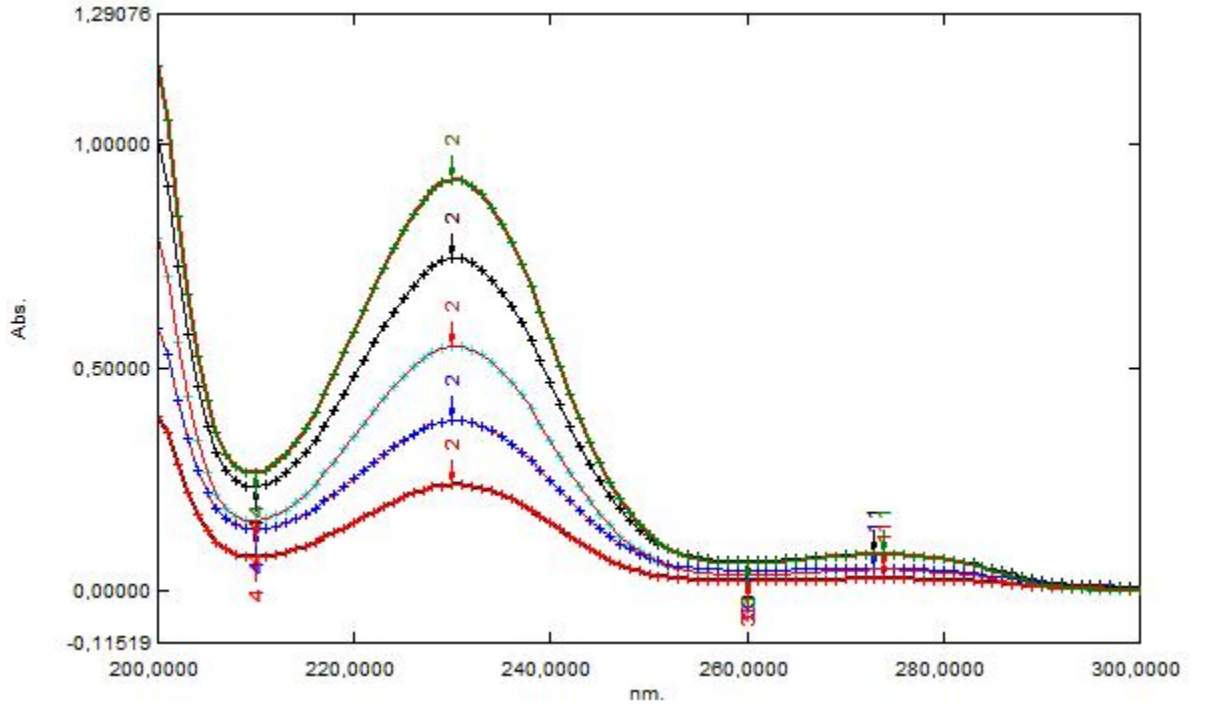
	1.ölçüm	2.ölçüm	3.ölçüm	ort.
a	0,00003	0,00003	0,00003	0,00003
b	0,00004	0,00006	0,00005	0,00005
r	0,99769	0,99568	0,9997	0,9975



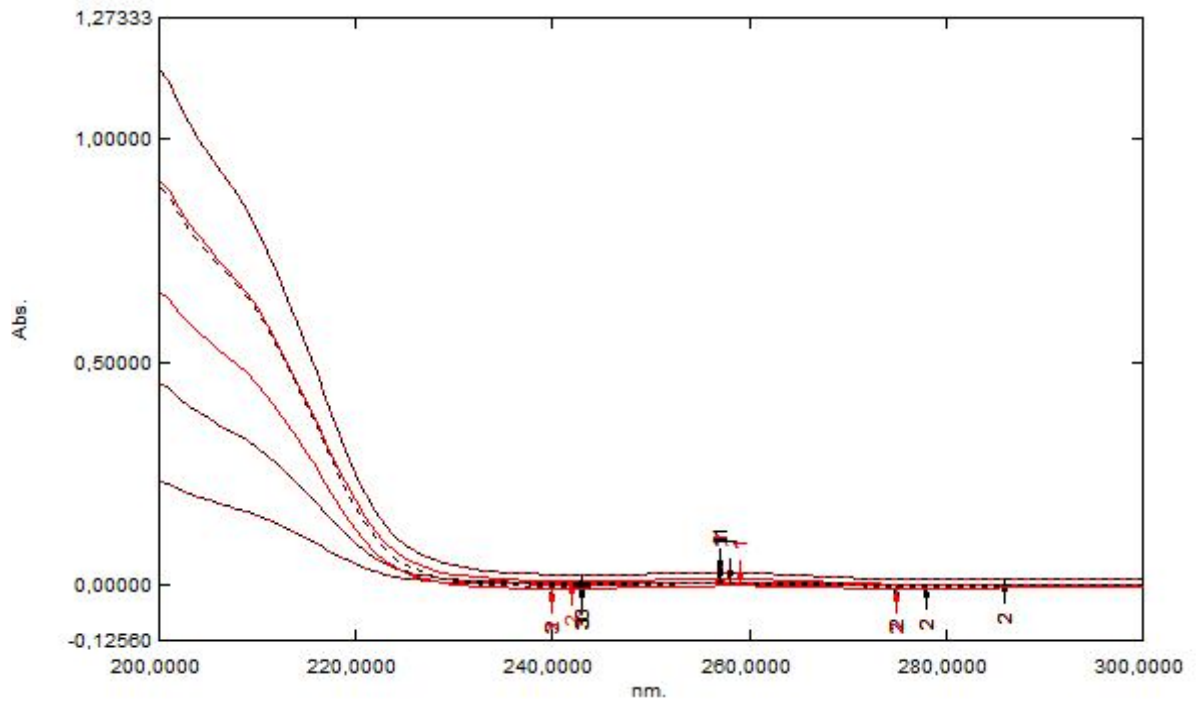
Şekil 4.40 Asp 'a' a ait ölçü eğrisi (227,5 nm)(Yöntem 2)

4.4 Validasyon Çalışmaları

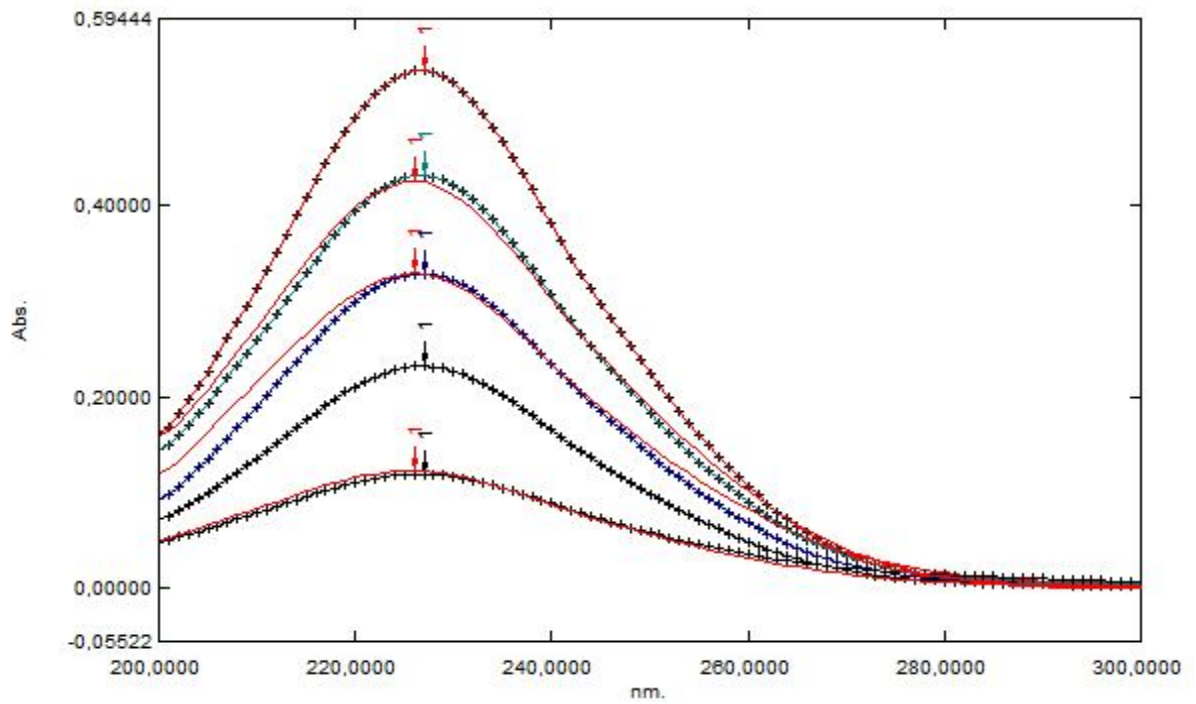
4.4.1 Özgünlük Grafikleri



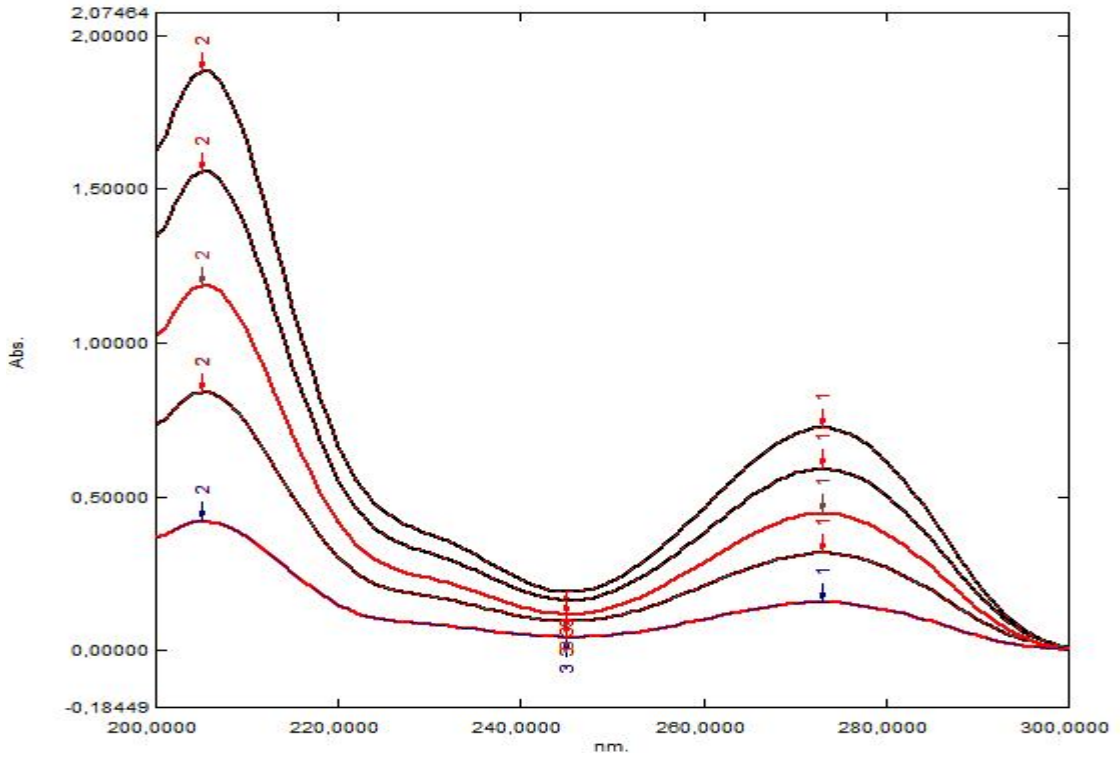
Şekil 4.41 Sodyum Benzoat çözeltilerinin 1., 5., 10., 15. ve 20. güne ait absorpsiyon spektrumları



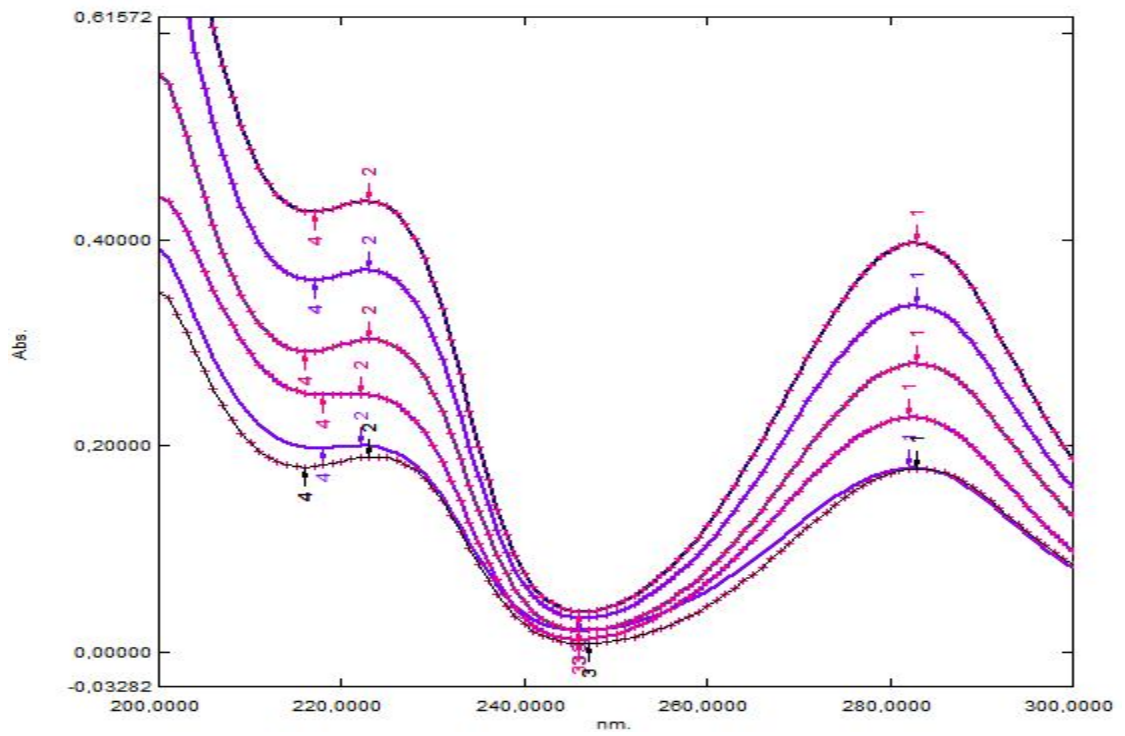
Şekil 4.42 Aspartam çözeltilerinin 1., 5., 10., 15. ve 20. güne ait absorpsiyon spektrumları



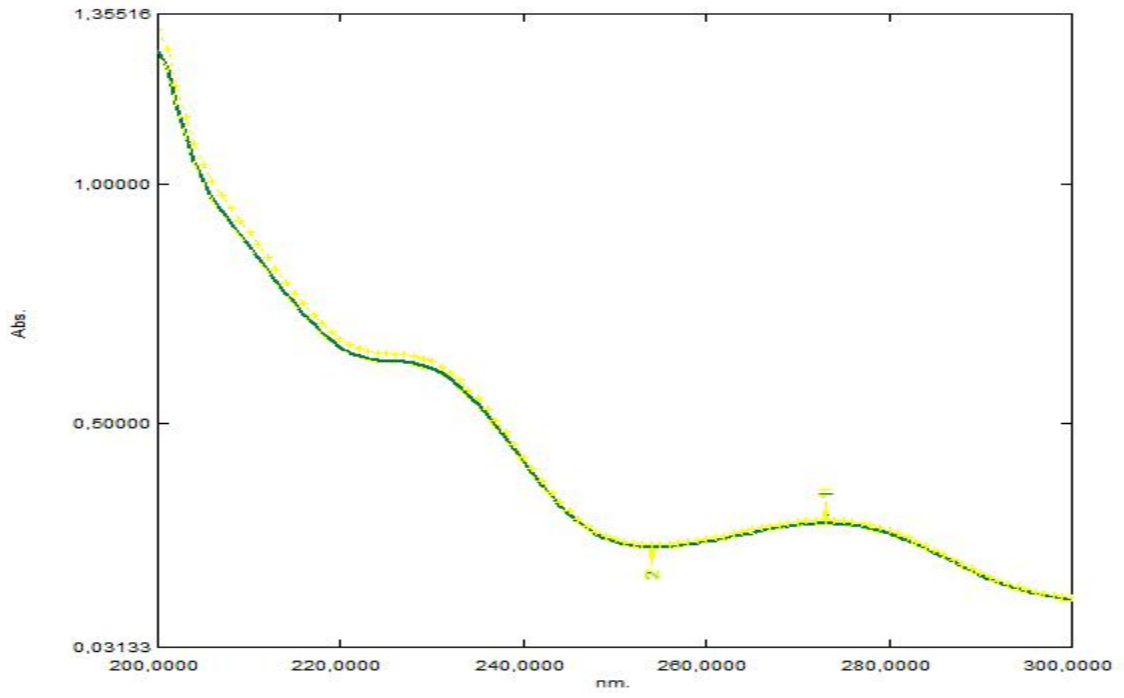
Şekil 4.43 Asesülfam-K çözeltilerinin 1., 5., 10., 15. ve 20. güne ait absorpsiyon spektrumları



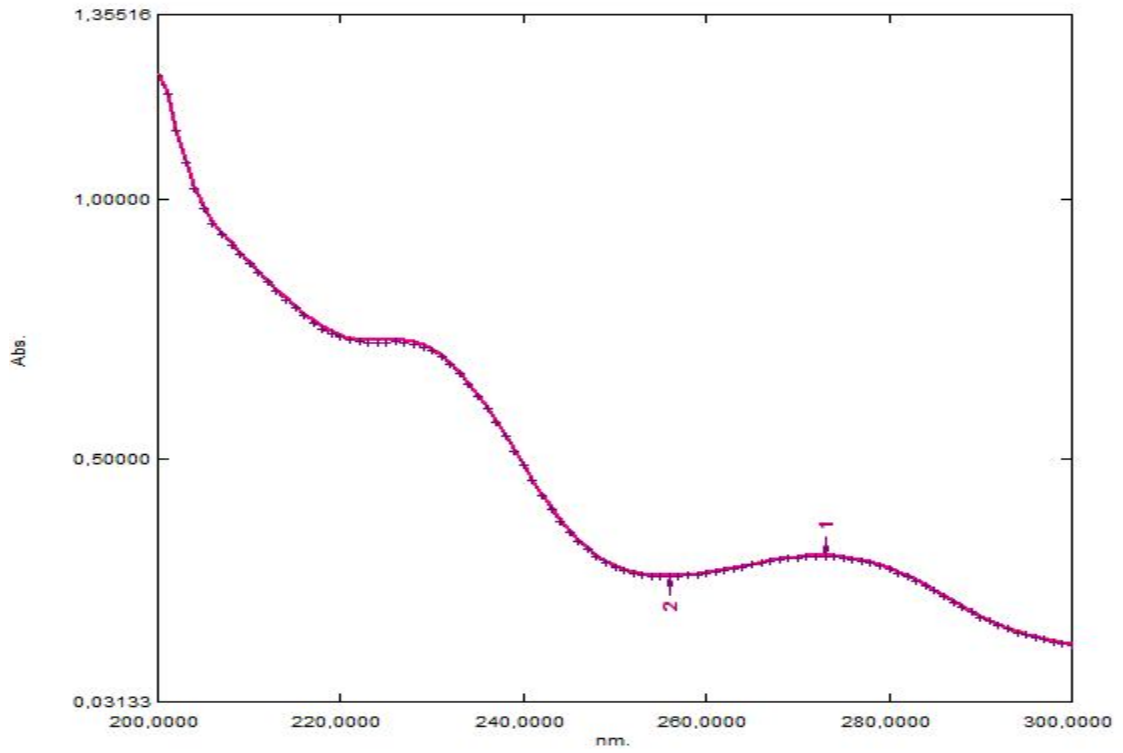
Şekil 4.44 Kafein çözeltilerinin 1., 5., 10., 15. ve 20. güne ait absorpsiyon spektrumları



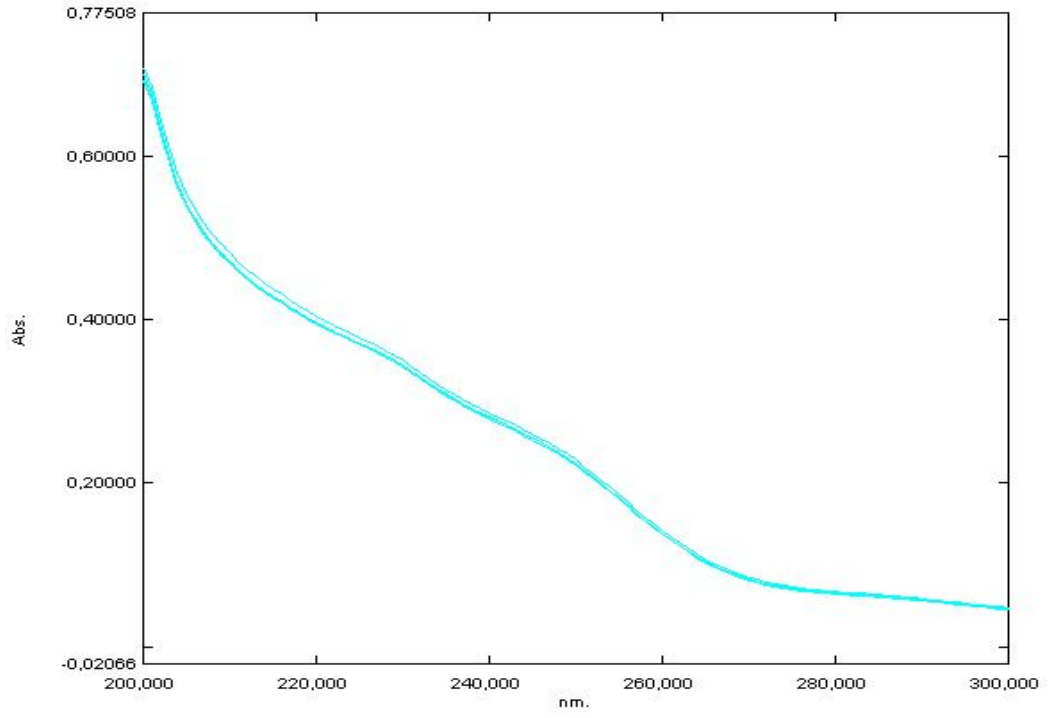
Şekil 4.45 Neohesperidin dihidrokalkon çözeltilerinin 1., 5., 10., 15. ve 20. güne ait absorpsiyon spektrumları



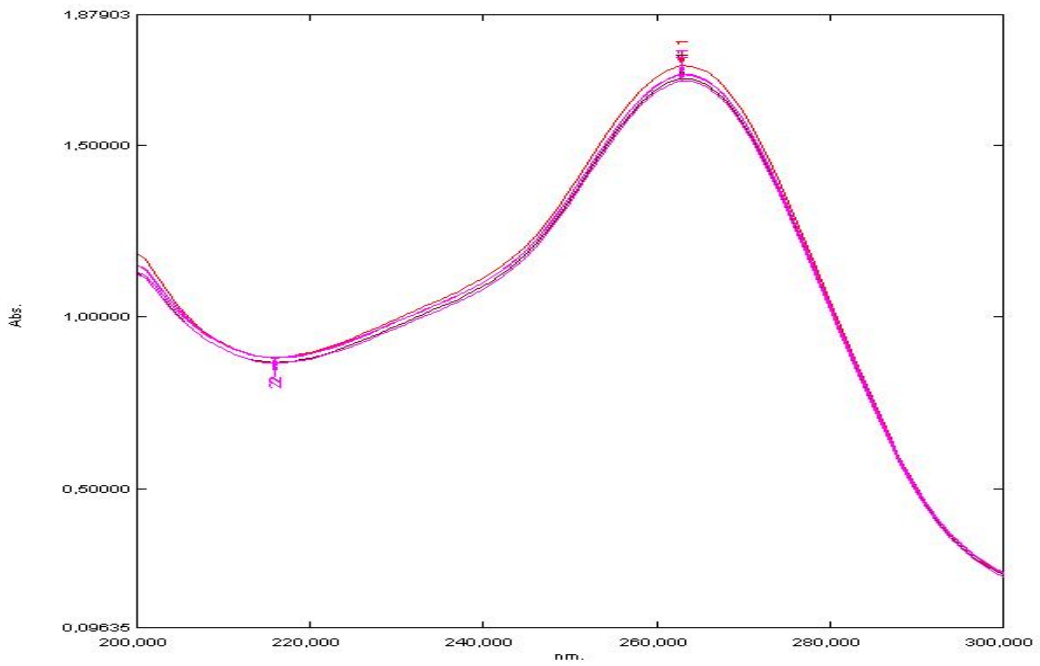
Şekil 4.46 Light Pepsi çözeltisinin 1',15',30',45',60' ve 7.gün alınan absorpsiyon spektrumları



Şekil 4.47 Light Cola çözeltisinin 1',15',30',45',60' ve 7.gün alınan absorpsiyon spektrumları



Şekil 4.48 Bütçem çözeltisinin 1',15',30',45',60' ve 7. gün de alınan absorpsiyon spektrumları



Şekil 4.49 Link çözeltisinin 1',15',30',45',60' ve 7.gün alınan absorpsiyon spektrumları

4.4.2 Tayin limiti (LOD) / Ölçüm limiti (LOQ) Değerleri

Çizelge 4.21 Dörtlü tatlandırıcı içeren karışımda bulunan her bir analite oran türev yöntemin uygulanması ile yapılan 10 paralel çalışmada bulunan konsantrasyon, ortalama konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$) , SD, % RSD , LOD ve LOQ değerleri

Deneme	ASP 8($\mu\text{g/ml}$)	ACE-K 4($\mu\text{g/ml}$)	SB 6($\mu\text{g/ml}$)	KAF 12($\mu\text{g/ml}$)
1.	7,97	4	6,14	12,27
2.	8,05	4,05	6,11	12,06
3.	8,04	3,99	5,98	12,34
4.	7,95	3,83	6,07	12,23
5.	8,03	4,03	5,99	12,21
6.	8,01	3,96	6,12	12,15
7.	7,93	4,03	6,16	12,15
8.	7,99	3,98	6,08	12,33
9.	8,09	4,06	6,21	11,99
10.	8,08	3,97	5,96	12,26
Ort.	8,01	3,99	6,08	12,2
SD	5,3x10-2	6,5x10-2	8,2x10-2	1,1x10-1
%RSD	0,67	1,65	1,36	0,93
LOD	0,16	0,20	0,25	0,34
LOQ	0,54	0,66	0,83	1,13

Çizelge 4.22 Üçlü tatlandırıcı karışımında bulunan her bir analite oran türev yöntemin uygulanması ile yapılan 10 paralel çalışmada bulunan konsantrasyon, ortalama konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$) , SD, % RSD , LOD ve LOQ değerleri

Deneme	ASP 15($\mu\text{g/ml}$)	ACE-K 10($\mu\text{g/ml}$)	NHDC 150($\mu\text{g/ml}$)
1.	15,03	10,47	150,12
2.	14,89	10,49	150,08
3.	14,92	10,39	150,03
4.	14,93	10,41	150,07
5.	14,96	10,38	149,98
6.	15,07	10,55	150,05
7.	14,93	10,42	149,95
8.	14,87	10,39	150,03
9.	15,04	10,48	150,09
10.	15,06	10,33	149,96
Ort.	14,97	10,43	150,04
SD	0,07	0,07	0,06
%RSD	0,49	0,63	0,04
LOD	0,22	0,20	0,17
LOQ	0,74	0,65	0,57

Çizelge 4.23 Üçlü tatlandırıcı karışımında bulunan her bir analite türev yöntemin uygulanması ile yapılan 10 paralel çalışmada bulunan konsantrasyon, ortalama konsantrasyon($\mu\text{g/ml}$) , SD, % RSD , LOD ve LOQ değerleri

Deneme	ASP 25($\mu\text{g/ml}$)	ACE 10($\mu\text{g/ml}$)	NHDC 150($\mu\text{g/ml}$)
1.	24,72	9,83	149,91
2.	25,33	10,15	149,65
3.	24,97	9,87	149,72
4.	25,33	9,81	149,94
5.	25,12	9,77	149,83
6.	25,41	9,87	150,53
7.	25,28	9,82	150,34
8.	25,19	10,01	150,12
9.	25,56	9,73	150,08
10.	25,17	9,91	149,96
Ort.	25,21	9,88	150,01
SD	0,24	0,12	0,27
%RSD	0,93	1,23	0,18
LOD	0,7	0,36	0,81
LOQ	2,4	1,23	2,71

4.4.3 Gün İçi ve Gün Aşırı Ölçüm Değerleri

Çizelge 4.24 Dörtlü tatlandırıcı karışımına oran türev spektrofotometrik yöntemin uygulanmasıyla gün içi alınan oran türev absorbands, ortalama, SD, % RSD değerleri

C(μ g/ml)Ace-K	2D_1	2D_2	2D_3	$^2\bar{D}_{223,5}$	SD	%RSD
2	0,00088	0,00091	0,00088	0,00089	2x10-5	1,94
4	0,00173	0,00174	0,00175	0,00174	1x10-5	0,57
6	0,00251	0,00253	0,00257	0,00254	3x10-5	1,20
8	0,0034	0,00341	0,00344	0,00342	2x10-5	0,61
10	0,00441	0,00439	0,00438	0,00439	2x10-5	0,34

C(μ g/ml)Asp	2D_1	2D_2	2D_3	$^2\bar{D}_{215,2}$	SD	%RSD
5	0,00371	0,00379	0,00372	0,00374	4x10-5	1,16
10	0,00754	0,00753	0,00755	0,00754	1x10-5	0,13
15	0,01135	0,01135	0,01133	0,01134	1x10-5	0,10
20	0,01485	0,0149	0,01489	0,01488	3x10-5	0,17
25	0,01828	0,01813	0,01816	0,01819	8x10-5	0,43

C(μ g/ml)Kaf	2D_1	2D_2	2D_3	$^2\bar{D}_{243,5}$	SD	%RSD
3	0,00536	0,00533	0,00539	0,00536	3x10-5	0,56
6	0,0108	0,01073	0,01077	0,01077	4x10-5	0,33
9	0,01629	0,01623	0,01622	0,01625	4x10-5	0,23
12	0,02159	0,02163	0,02161	0,02161	2x10-5	0,09
15	0,02587	0,02601	0,02604	0,02597	9x10-5	0,35

C(μ g/ml)SB	2D_1	2D_2	2D_3	$^2\bar{D}_{235}$	SD	%RSD
2	0,00361	0,00368	0,00377	0,00369	8x10-5	2,18
4	0,00759	0,00756	0,00761	0,00759	3x10-5	0,33
6	0,01208	0,01201	0,01192	0,012	8x10-5	0,66
8	0,01579	0,01588	0,01587	0,01585	5x10-5	0,32
10	0,02042	0,02033	0,02045	0,0204	6x10-5	0,31

Çizelge 4.25 Dörtlü tatlandırıcı karışımına oran türev spektrofotometrik yöntemin uygulanmasıyla gün aşırı alınan oran türev absorbans, ortalama, SD, % RSD değerleri

C(µg/ml) Ace-K	2D_1	2D_2	2D_3	$^2\bar{D}_{223,5}$	SD	%RSD
2	0,00087	0,0009	0,00091	0,00089	2x10-5	2,33
4	0,00175	0,00177	0,00174	0,00175	2x10-5	0,87
6	0,00253	0,00252	0,00256	0,00253	2x10-5	0,82
8	0,00342	0,00343	0,00343	0,00342	1x10-5	0,16
10	0,00444	0,00443	0,00439	0,00442	3x10-5	0,59

C(µg/ml) Asp	2D_1	2D_2	2D_3	$^2\bar{D}_{215,2}$	SD	%RSD
5	0,00373	0,00381	0,00376	0,00377	4x10-5	1,07
10	0,00761	0,00757	0,00755	0,00758	3x10-5	0,40
15	0,01141	0,01138	0,01131	0,01137	5x10-5	0,45
20	0,01475	0,01493	0,01486	0,01485	9x10-5	0,61
25	0,01819	0,01816	0,01827	0,01821	6x10-5	0,31

C(µg/ml) SB	2D_1	2D_2	2D_3	$^2\bar{D}_{243,5}$	SD	%RSD
2	0,00365	0,00369	0,00374	0,00369	5x10-5	1,22
4	0,00761	0,00758	0,00759	0,00759	2x10-5	0,20
6	0,01213	0,01201	0,01199	0,01204	8x10-5	0,62
8	0,01582	0,01585	0,01585	0,01584	2x10-5	0,11
10	0,02045	0,02046	0,02045	0,02045	1x10-5	0,03

C(µg/ml) Kaf	2D_1	2D_2	2D_3	$^2\bar{D}_{235}$	SD	%RSD
3	0,00538	0,00532	0,00541	0,00537	5x10-5	0,85
6	0,01078	0,01081	0,01076	0,01078	3x10-5	0,23
9	0,01633	0,01625	0,01621	0,01626	6x10-5	0,37
12	0,02148	0,02168	0,02153	0,02156	1,0x10-4	0,48
15	0,02607	0,02598	0,02593	0,02599	7x10-5	0,27

Çizelge 4.26 Üçlü tatlandırıcı karışımına oran türev spektrofotometrik yöntemin uygulanmasıyla gün içi alınan oran türev absorbands, ortalama, SD, % RSD değerleri,

C(µg/ml) Asp	³ D ₁	³ D ₂	³ D ₃	³ $\overline{D}_{216}$	SD	%RSD
5	0,00067	0,0007	0,00068	0,00068	2x10-5	2,23
10	0,00155	0,00159	0,00157	0,00157	2x10-5	1,27
15	0,00218	0,00216	0,00219	0,00218	2x10-5	0,70
20	0,00267	0,00273	0,00276	0,00272	5x10-5	1,68
25	0,00359	0,00367	0,00361	0,00362	4x10-5	1,14

C(µg/ml)Ace-K	² D ₁	² D ₂	² D ₃	² $\overline{D}_{235}$	SD	%RSD
2	0,01998	0,01989	0,01987	0,0199	6,0x10-5	0,29
4	0,04417	0,04334	0,04482	0,0441	7,4x10-4	1,68
6	0,06381	0,06466	0,06587	0,0648	1,0x10-3	1,59
8	0,08663	0,08573	0,08698	0,0864	6,4x10-4	0,74
10	0,11348	0,11293	0,1108	0,1124	1,4x10-3	1,26

C(µg/ml)NHDC	² D ₁	² D ₂	² D ₃	² $\overline{D}_{267}$	SD	%RSD
75	9,2045	9,2167	9,2127	9,2113	6,2x10-3	0,06
100	12,3828	12,4258	12,4167	12,4084	2,2x10-2	0,18
125	15,5072	15,5164	15,5239	15,5158	8,3x10-3	0,05
150	19,1614	19,1591	19,1776	19,1660	1x10-2	0,05
175	22,6103	22,6059	22,6218	22,6126	8x10-3	0,04

Çizelge 4.27 Üçlü tatlandırıcı karışımına oran türev spektrofotometrik yöntemin uygulanmasıyla gün aşırı alınan oran türev absorbans , ortalama, SD, % RSD değerleri,

C(µg/ml) Asp	³ D ₁	³ D ₂	³ D ₃	³ $\bar{D}_{216}$	SD	%RSD
5	0,00071	0,0007	0,00068	0,00070	2x10-5	2,19
10	0,00158	0,00156	0,00155	0,00156	2x10-5	0,97
15	0,00217	0,00216	0,00218	0,00217	1x10-5	0,46
20	0,00271	0,00273	0,00275	0,00273	2x10-5	0,73
25	0,00359	0,00369	0,00367	0,00365	5x10-5	1,44

C(µg/ml)Ace-	² D ₁	² D ₂	² D ₃	$\bar{D}_{235}$	SD	%RSD
2	0,01987	0,01997	0,01995	0,01993	5,0x10-5	0,26
4	0,04423	0,04336	0,04462	0,04407	6,5x10-4	1,46
6	0,06371	0,06399	0,06491	0,06420	6,3x10-4	0,97
8	0,08597	0,08654	0,08688	0,08646	4,6x10-4	0,53
10	0,11238	0,11273	0,1138	0,11297	7,4x10-3	0,65

C(µg/ml)NHDC	² D ₁	² D ₂	² D ₃	² $\bar{D}_{267}$	SD	%RSD
75	9,2063	9,2186	9,2112	9,21203	6,2x10-3	0,06
100	12,4145	12,4058	12,4134	12,4112	4,7x10-2	0,04
125	15,5088	15,5244	15,5227	15,5186	8,5x10-3	0,05
150	19,1576	19,1708	19,1682	19,1655	6,9x10-2	0,04
175	22,6013	22,6199	22,6308	22,6173	1,4x10-2	0,06

Çizelge 4.28 Üçlü tatlandırıcı karışımına türev spektrofotometrik yöntemin uygulanmasıyla gün içi alınan oran türev absorbans, ortalama, SD, % RSD değerleri,

C(µg/ml) Asp	³ D ₁	³ D ₂	³ D ₃	³ $\bar{D}_{227,5}$	SD	%RSD
5	0,00018	0,00019	0,00019	0,00019	1x10 ⁻⁵	3,09
10	0,00035	0,00037	0,00036	0,00036	1x10 ⁻⁵	2,77
15	0,00051	0,00053	0,00052	0,00052	1x10 ⁻⁵	1,92
20	0,00064	0,00066	0,00067	0,00066	2x10 ⁻⁵	2,32
25	0,00079	0,00081	0,00078	0,00079	2x10 ⁻⁵	1,92

C(µg/ml) Ace-	¹ D ₁	¹ D ₂	¹ D ₃	³ $\bar{D}_{227,5}$	SD	%RSD
2	0,00265	0,00272	0,00265	0,00267	4x10 ⁻⁵	1,51
4	0,00534	0,00539	0,00529	0,00534	5x10 ⁻⁵	0,93
6	0,00752	0,00763	0,00765	0,00760	7x10 ⁻⁵	0,92
8	0,01071	0,01056	0,01068	0,01065	8x10 ⁻⁵	0,74
10	0,01277	0,01272	0,01281	0,01277	5x10 ⁻⁵	0,35

C(µg/ml) NHDC	² D ₁	² D ₂	² D ₃	² $\bar{D}_{240}$	SD	%RSD
75	0,00141	0,0014	0,00138	0,00139	2x10 ⁻⁵	1,02
100	0,00176	0,00179	0,00178	0,00179	2x10 ⁻⁵	0,82
125	0,00214	0,00216	0,00217	0,00216	2x10 ⁻⁵	0,75
150	0,00256	0,00257	0,00256	0,00256	1x10 ⁻⁵	0,23
175	0,00301	0,00299	0,00300	0,00300	1x10 ⁻⁵	0,37

Çizelge 4.29 Üçlü tatlandırıcı karışımına türev spektrofotometrik yöntemin uygulanmasıyla gün aşırı alınan oran türev absorbans , ortalama, SD, % RSD değerleri,

C(µg/ml) Asp	3D_1	3D_2	3D_3	$^3\bar{D}_{227,5}$	SD	%RSD
5	0,00017	0,00018	0,00019	0,00022	1x10-5	5,55
10	0,00041	0,00039	0,00035	0,00041	3x10-5	7,96
15	0,00056	0,00049	0,00053	0,00053	4x10-5	6,66
20	0,00065	0,00069	0,00071	0,00072	3x10-5	4,47
25	0,00078	0,00081	0,00078	0,00080	2x10-5	2,19

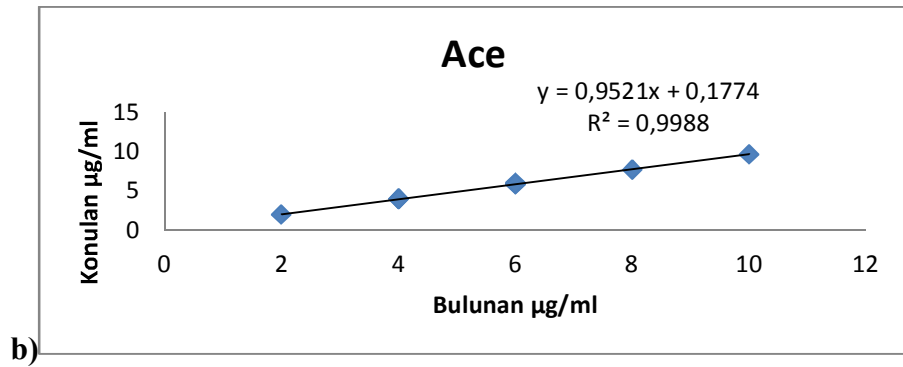
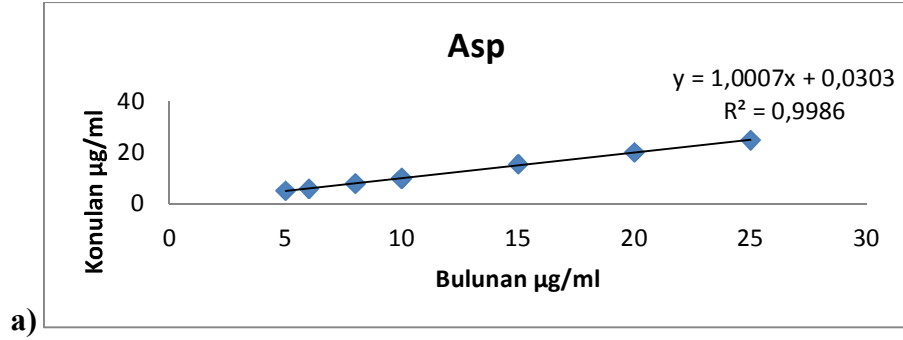
C(µg/ml)Ace-	1D_1	1D_2	1D_3	$^3\bar{D}_{247,3}$	SD	%RSD
2	0,00271	0,00263	0,00265	0,00266	4x10-5	1,56
4	0,00528	0,00538	0,00533	0,00533	5x10-5	0,93
6	0,00751	0,00774	0,00766	0,00763	1,2x10-4	1,52
8	0,01071	0,01068	0,01061	0,01066	5x10-5	0,48
10	0,01265	0,01273	0,01286	0,01274	1,1x10-4	0,83

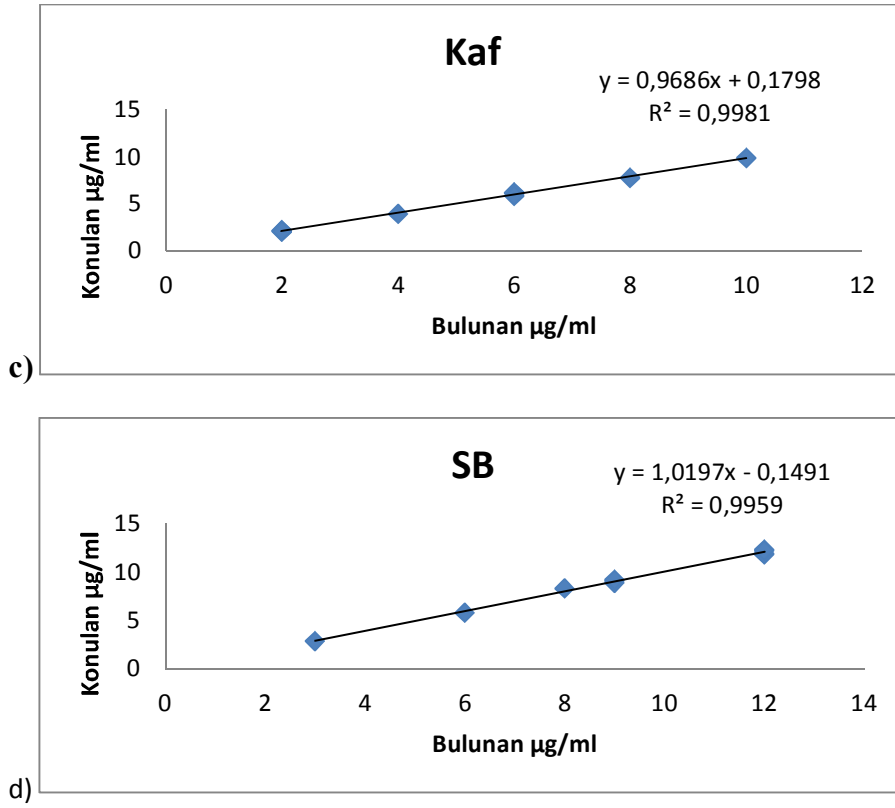
C(µg/ml)NHDC	2D_1	2D_2	2D_3	$^2\bar{D}_{240}$	SD	%RSD
75	0,00143	0,00137	0,00136	0,00138	4x10-5	2,73
100	0,00174	0,00183	0,00185	0,00180	6x10-5	3,24
125	0,00209	0,00226	0,00219	0,00218	9x10-5	3,91
150	0,00248	0,00251	0,00257	0,00252	5x10-5	1,82
175	0,00308	0,00295	0,00301	0,00301	7x10-5	2,16

4.4.4 Yüzde Verim Çalışmaları

Çizelge 4.30 Dörtlü standart karışım çözeltilere oran türev spektrofotometrik yöntemin uygulanmasıyla elde edilen yüzde verim değerleri (Yöntem 1)

ORAN TÜREV SPEKTROSKOPİK YÖNTEM											
Yöntem 1											
KONULAN (µg/ml)				BULUNAN (µg/ml)				% VERİM			
ASP	ACE	KAF	SB	ASP	ACE	KAF	SB	ASP	ACE	KAF	SB
5	2	3	2	5,15	1,99	2,87	2,05	103	99,5	95,7	103
10	6	6	8	10,2	5,91	5,8	7,79	102	98,5	96,7	97,4
6	4	9	4	5,85	4,01	9,08	3,92	97,5	100	101	98
8	4	12	6	7,87	4,04	12,3	6,14	98,4	101	103	102
8	6	12	6	8,06	6,05	11,9	6,22	101	101	99,1	104
10	4	12	2	9,91	3,96	11,8	2,18	99,1	99	97,9	109
10	6	12	2	9,86	5,82	12,2	2,15	98,6	97	102	108
15	6	9	6	15,57	5,92	8,87	5,88	104	98,7	98,6	98
25	10	8	10	24,79	9,67	8,31	9,87	99,2	96,7	104	98,7
20	8	9	2	20,12	7,72	9,19	2,09	101	96,5	102	105
(%verim)								100,4	98,8	99,4	102

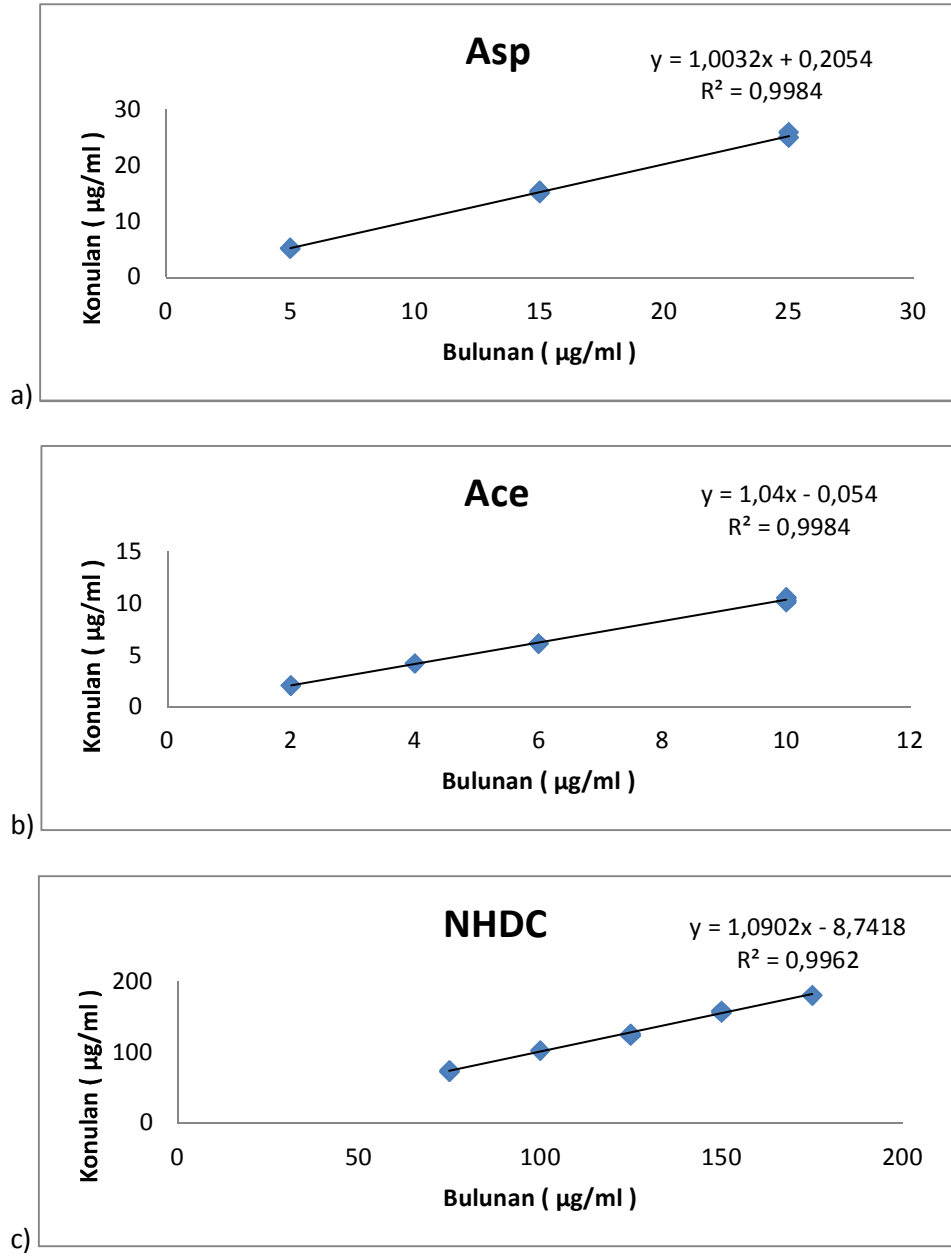




Şekil 4.50 (a),(b),(c),(d) Dörtlü tatlandırıcı içeren karışımlarda analitlerin konsantrasyon değerlerinin konulan bulunan grafikleri (Yöntem 1)

Çizelge 4.31 Üçlü standart karışım çözeltilere oran türev spektrofotometrik yöntemin uygulanmasıyla elde edilen yüzde verim değerleri (Yöntem 1)

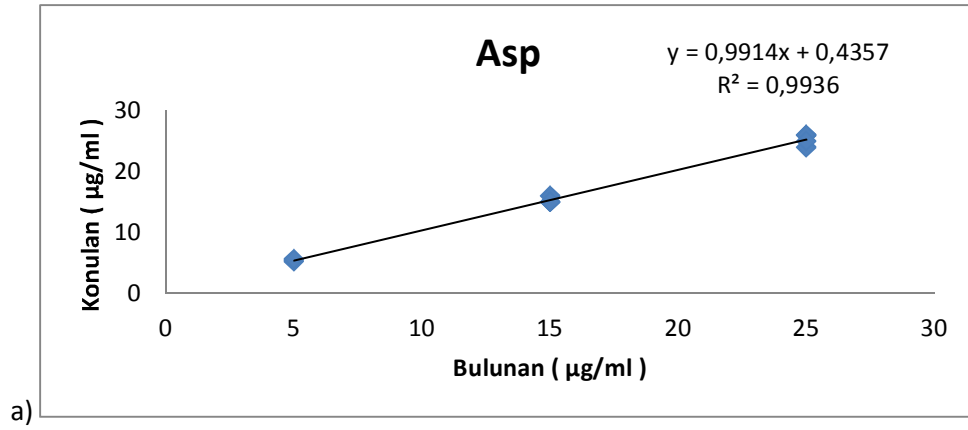
ORAN TÜREV SPEKTROSKOPİK YÖNTEM									
Yöntem 1									
KONULAN (µg/ml)			BULUNAN (µg/ml)			% VERİM			
ASP	ACE	NHDC	ASP	ACE	NHDC	ASP	ACE	NHDC	
5	2	75	5,3	2,01	71,9	100	101	95,81	
15	10	75	14,4	10,5	74	96	105	98,6	
25	10	100	25,1	10,6	102	98,3	106	102,25	
15	10	125	15	10,3	123	99,1	103	98,74	
25	6	125	25	6,1	126	99,8	102	100,6	
5	4	150	5,1	4,19	158	103	105	105,15	
15	6	150	15,5	6,09	156	99,1	102	103,99	
25	10	150	26	10,1	158	102	101	105,59	
25	10	175	25	10,3	181	98,3	103	103,69	
15	2	175	15,4	2,07	180	100	104	102,65	
			%verim			98,7	103	101,7	

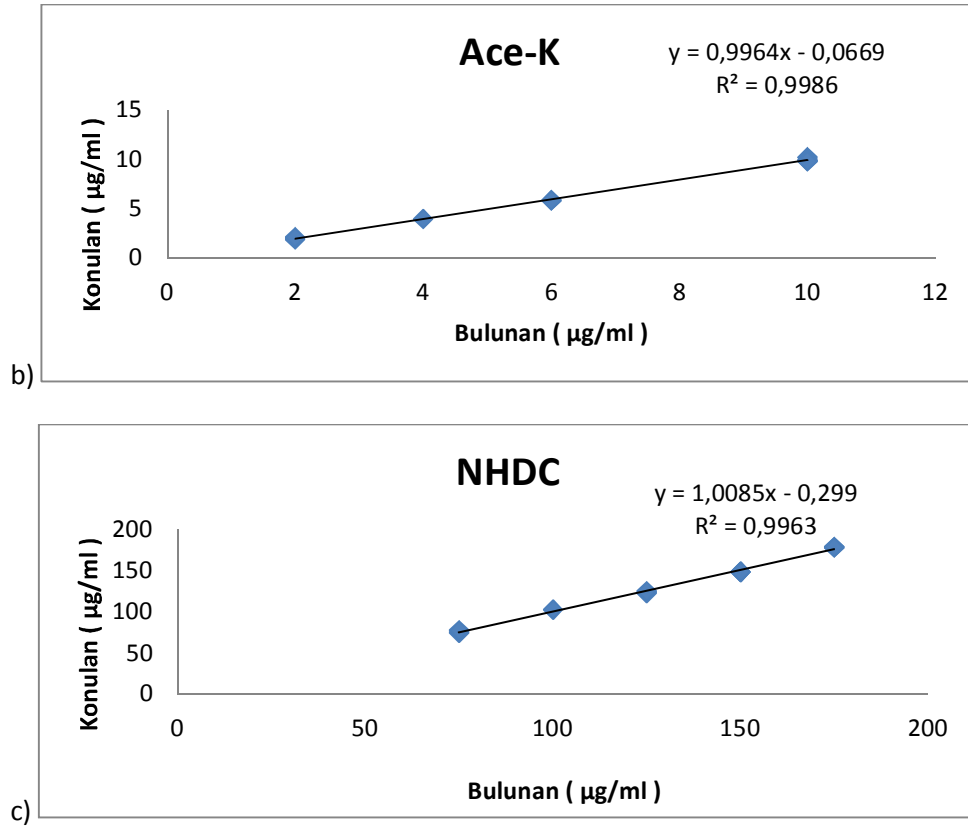


Şekil 4.51 (a),(b),(c),(d) Üçlü tatlandırıcı içeren karışımlarda analitlerin konsantrasyon değerlerinin konulan bulunan grafikleri (Yöntem 1)

Çizelge 4.32 Üçlü standart karışım çözeltilere türev spektrofotometrik yöntemin uygulanmasıyla elde edilen yüzde verim değerleri (Yöntem 2)

TÜREV SPEKTROSKOPİK YÖNTEM											
Yöntem 1											
KONULAN (µg/ml)				BULUNAN (µg/ml)				% VERİM			
ASP	ACE	KAF	SB	ASP	ACE	KAF	SB	ASP	ACE	KAF	SB
5	2	3	2	5,15	1,99	2,87	2,05	103	99,5	95,7	103
10	6	6	8	10,2	5,91	5,8	7,79	102	98,5	96,7	97,4
6	4	9	4	5,85	4,01	9,08	3,92	97,5	100	101	98
8	4	12	6	7,87	4,04	12,3	6,14	98,4	101	103	102
8	6	12	6	8,06	6,05	11,9	6,22	101	101	99,1	104
10	4	12	2	9,91	3,96	11,8	2,18	99,1	99	97,9	109
10	6	12	2	9,86	5,82	12,2	2,15	98,6	97	102	108
15	6	9	6	15,57	5,92	8,87	5,88	104	98,7	98,6	98
25	10	8	10	24,79	9,67	8,31	9,87	99,2	96,7	104	98,7
20	8	9	2	20,12	7,72	9,19	2,09	101	96,5	102	105
(%verim)								100,4	98,8	99,4	102

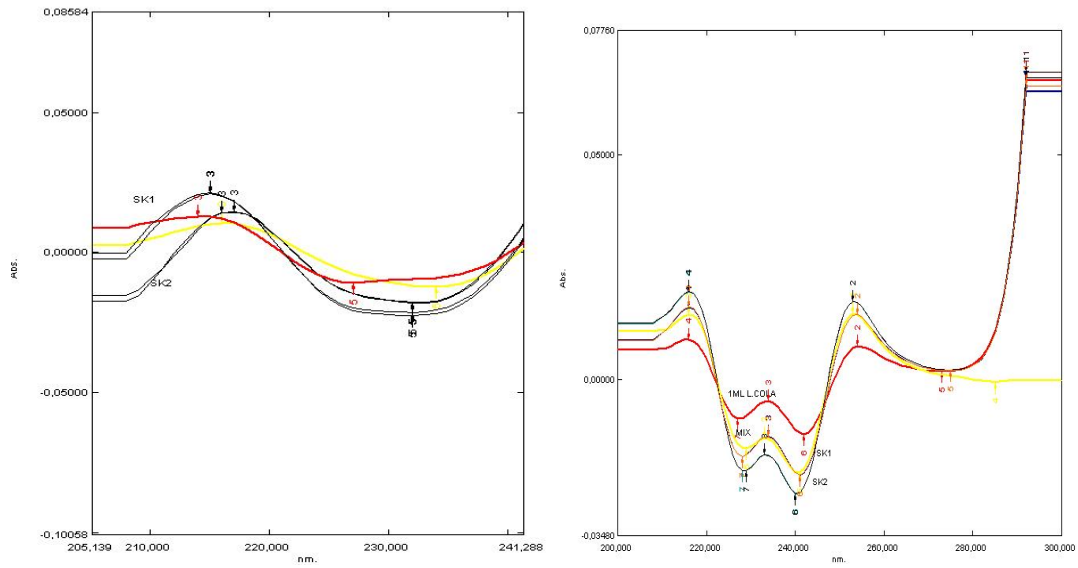




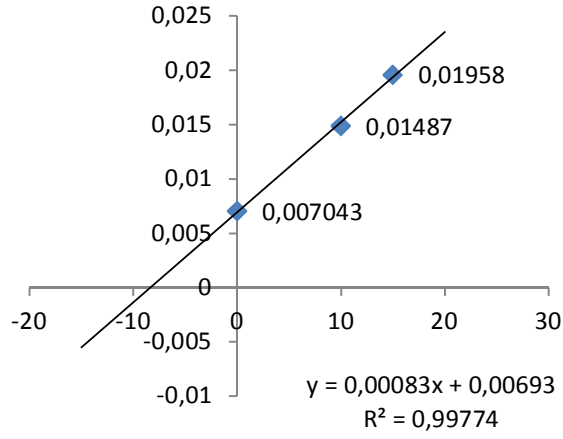
Şekil 4.52 (a),(b),(c) Üçlü tatlandırıcı içeren karışımlarda analitlerin konsantrasyon değerlerinin konulan bulunan grafikleri (Yöntem 2)

4.4.5 Standart Katma Yöntemi

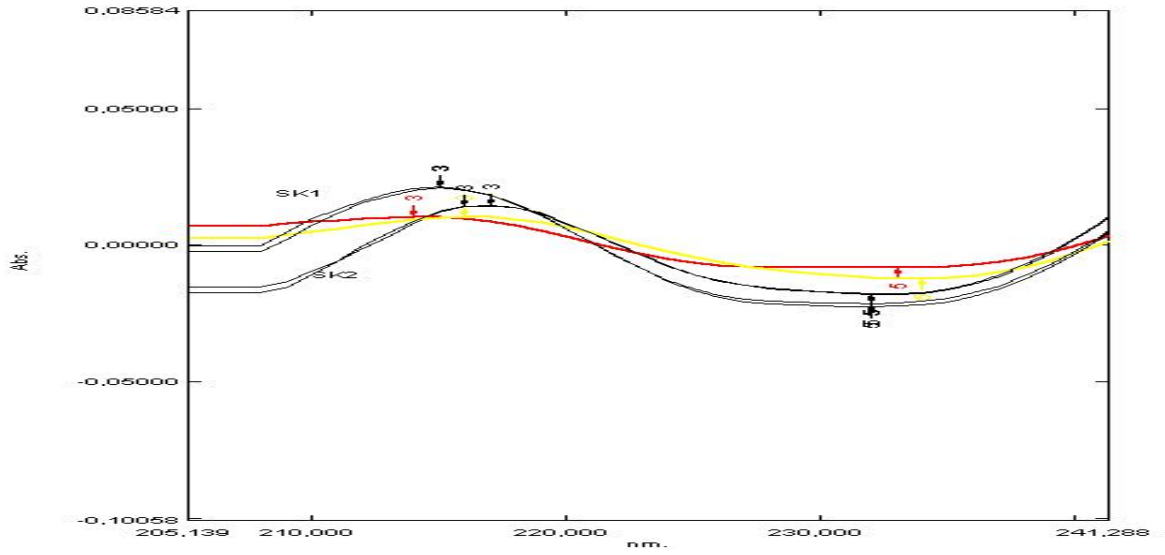
4.4.5.1 Oran Türev Spektrofotometrik Yöntemin Standart Katma ile Dört Bileşenli Karışıma Uygulanması (Yöntem 1)



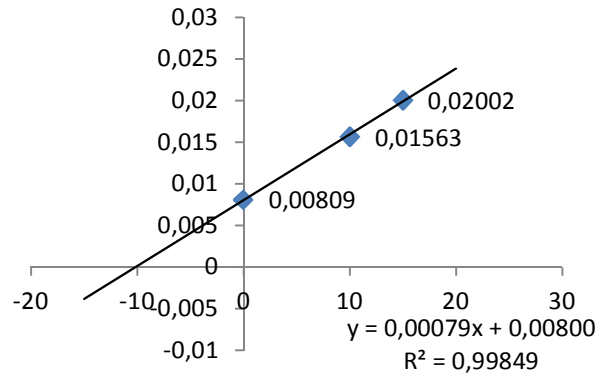
Şekil 4.53 Light Cola (kırmızı) karışım (sarı) SK1 ve SK2 'nin oran spektrumlarının 2. derece türev spektrumları (Yöntem 1)



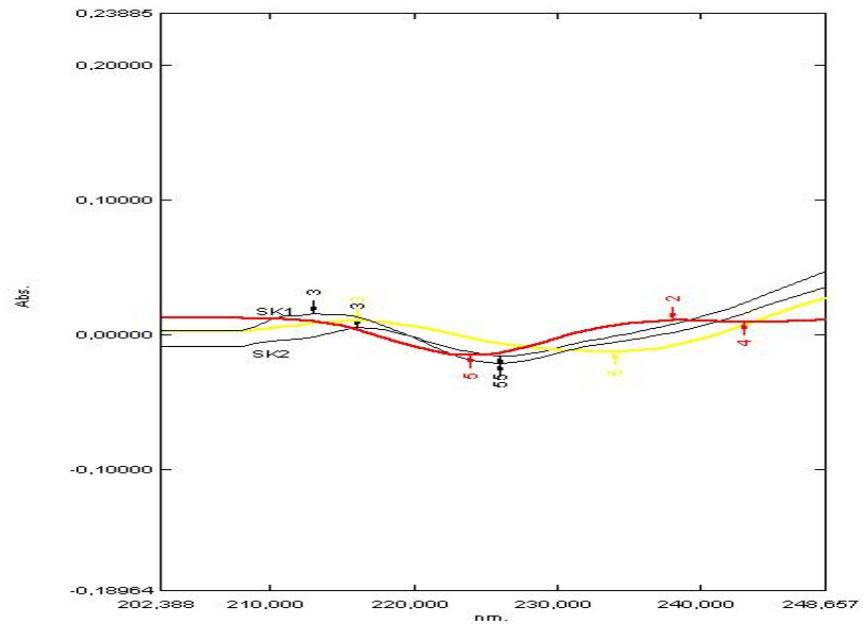
Şekil 4.54 Asp için standart katma yönteminin kalibrasyon eğrisi (Yöntem 1)



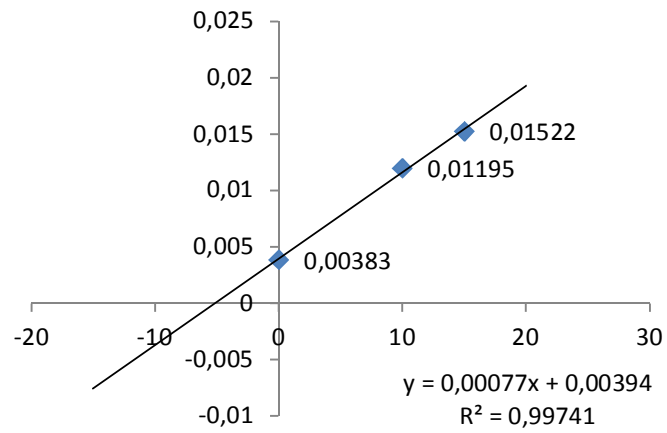
Şekil 4.55 Light Pepsi (kırmızı) karışım (sarı) SK 1 ve SK2'nin oran spektrumlarının 2. Derece türev spektrumları (Yöntem 1)



Şekil 4.56 Asp için standart katma yönteminin kalibrasyon eğrisi (Yöntem 1)

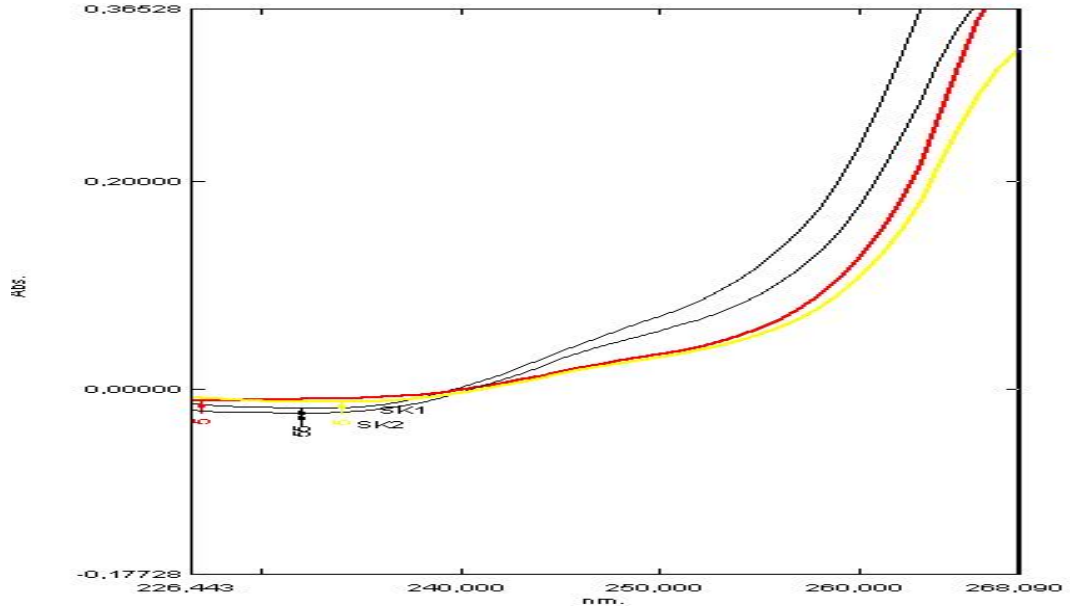


Şekil 4.57 Bütçem (kırmızı) karışım (sarı) ,SK1 ve SK2 ‘nin oran türev spektrumlarının 2. derece türev spektrumları (Yöntem 1)

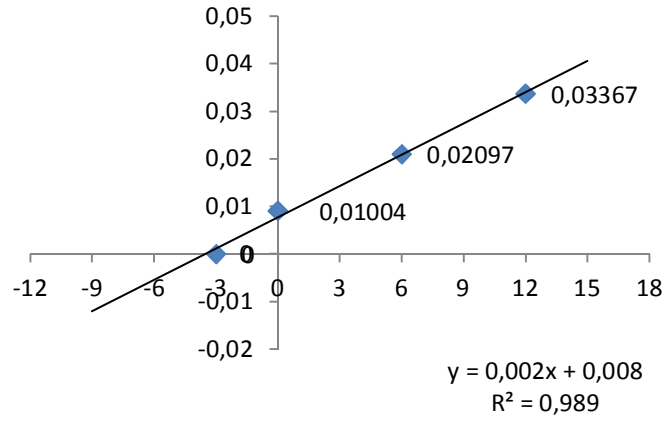


Şekil 4.58 Asp için standart katma yönteminin kalibrasyon eğrisi (Yöntem 1)

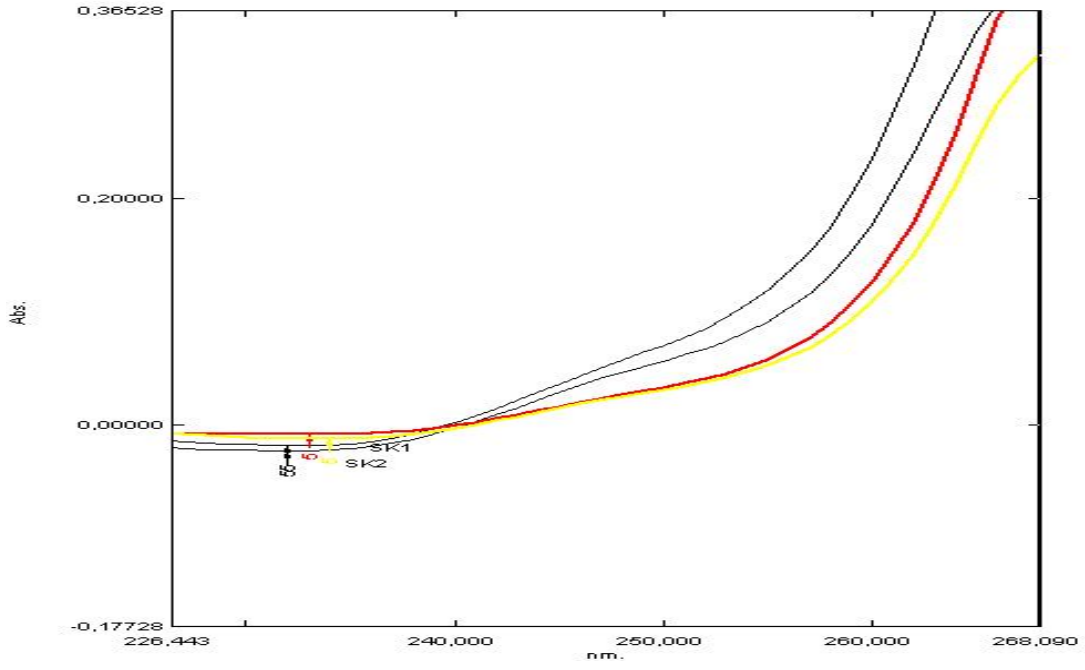
➤ **Light Cola, Light Pepsi ve Bütçem Numunelerine de Standart Katma Yöntemi ile Kaf Tayini**



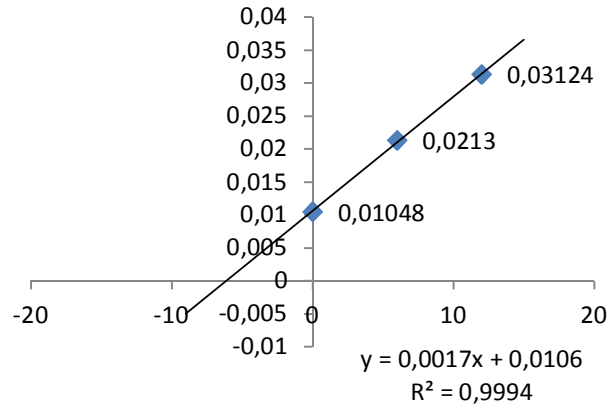
Şekil 4.59 Light Cola (kırmızı) karışım (sarı) SK1 ve SK2 'nin oran spektrumlarının 1. derece türev spektrumları (Yöntem 1)



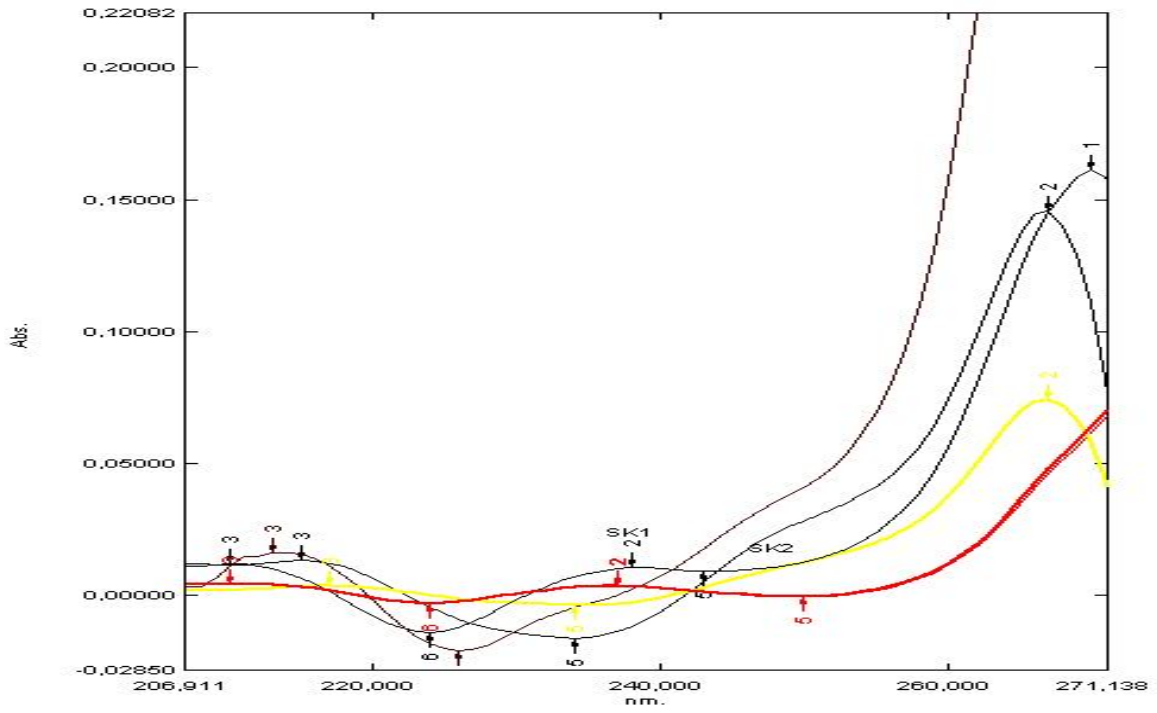
Şekil 4.60 Kaf için standart katma yönteminin kalibrasyon eğrisi (Yöntem 1)



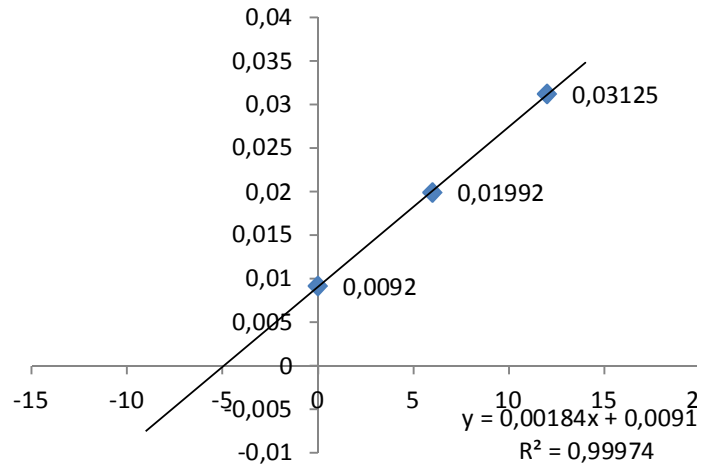
Şekil 4.61 Light Pepsi (kırmızı) karışım (sarı) SK 1 ve SK2 'nin oran spektrumlarının 2. derece türev spektrumları (Yöntem 1)



Şekil 4.62 Kaf için standart katma yönteminin kalibrasyon eğrisi (Yöntem 1)

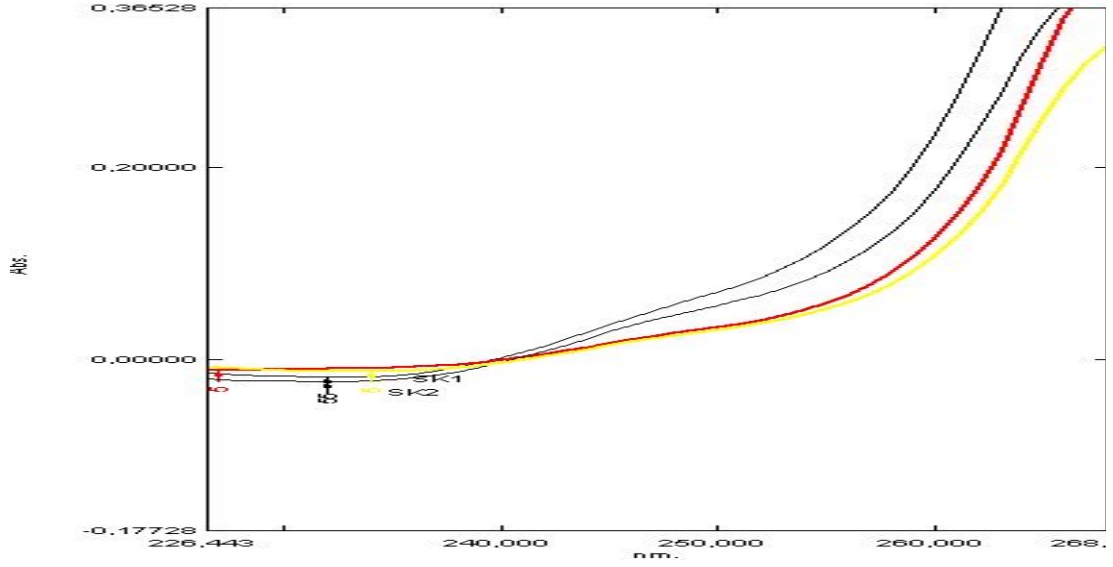


Şekil 4.63 Bütçem (kırmızı) karışım (sarı), SK 1 ve SK2'nin oran spektrumlarının 2. derece türev spektrumları (Yöntem 1)

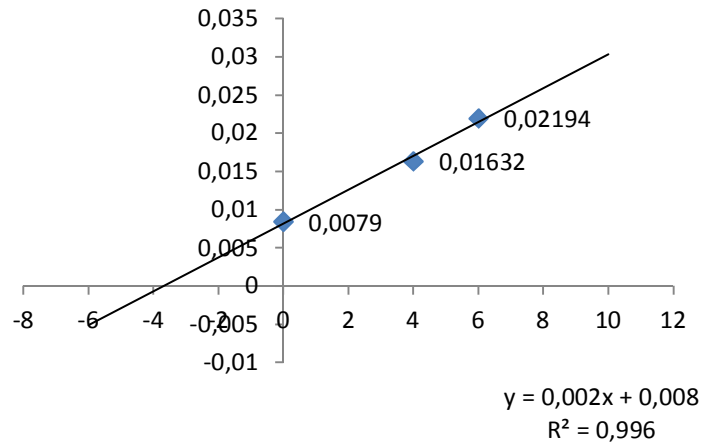


Şekil 4.64 Kaf için standart katma yönteminin kalibrasyon eğrisi (Yöntem 1)

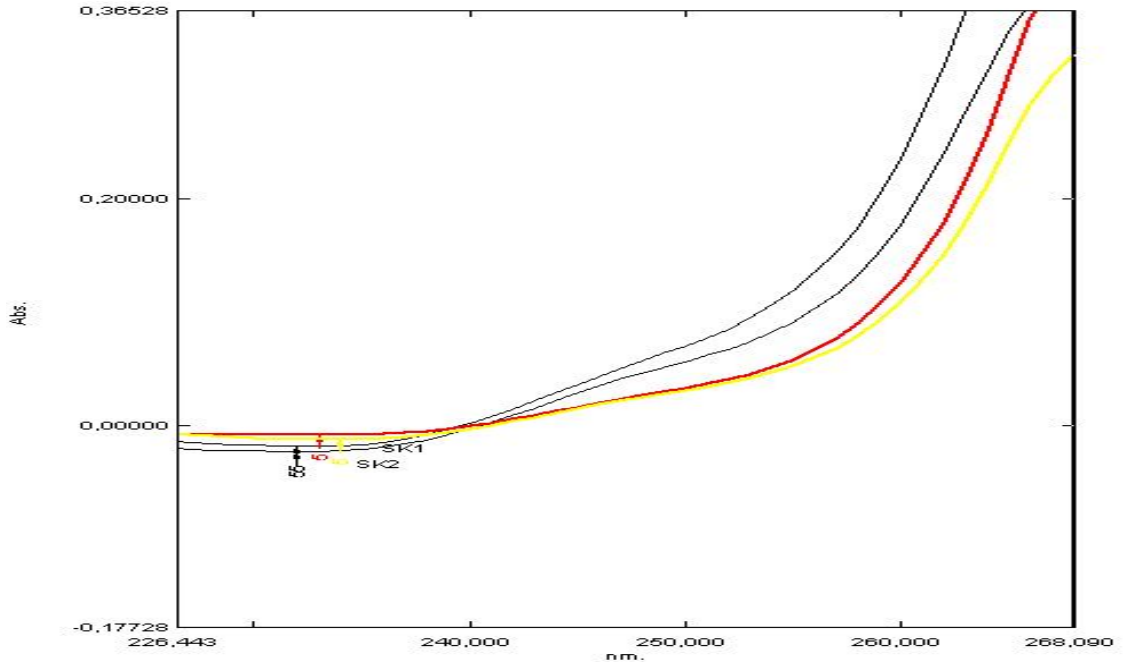
➤ **Light Cola, Light Pepsi ve Bütçem Numunelerine de Standart Katma Yöntemi ile SB Tayini**



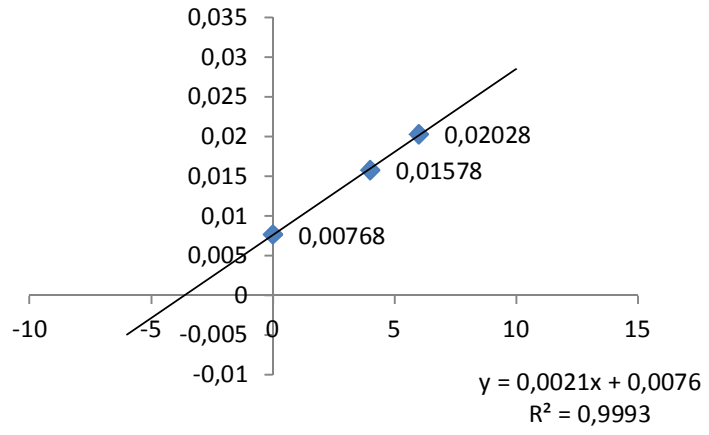
Şekil 4.65 Light Cola (kırmızı), karışım (sarı) SK ve SK2'nin oran spektrumlarının 2. derece türev spektrumları (Yöntem 1)



Şekil 4.66 SB için standart katma yönteminin kalibrasyon eğrisi (Yöntem 1)

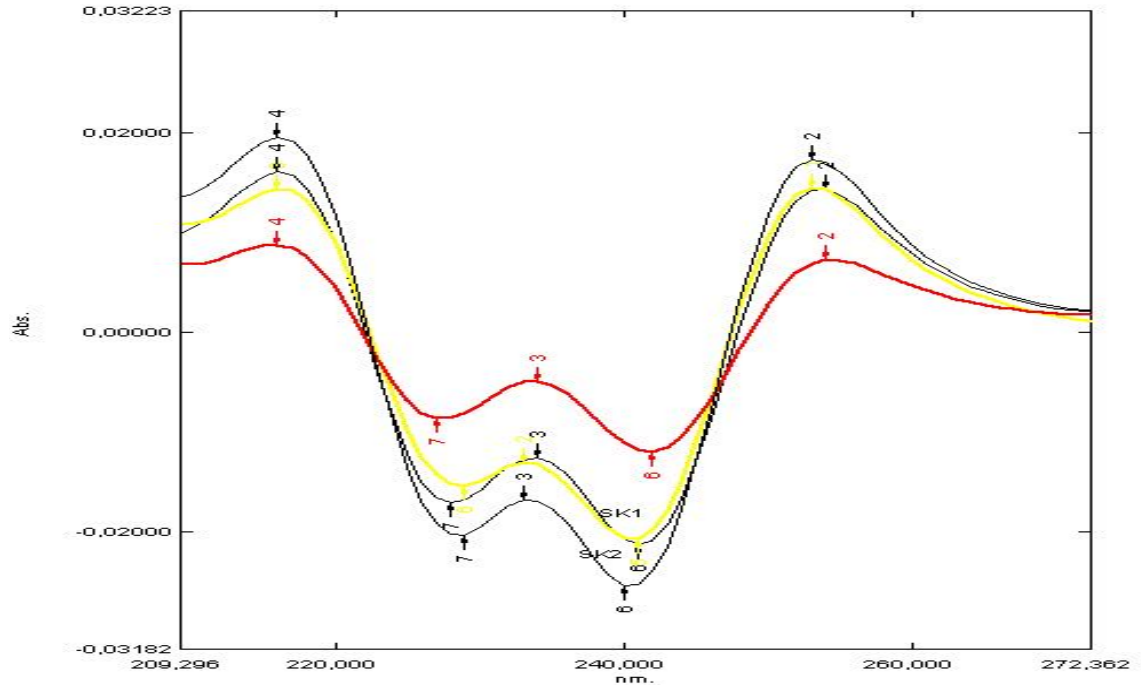


Şekil 4.67 Light Pepsi (kırmızı), karışım (sarı) SK1 ve SK2 'nin oran spektrumlarının 2. derece türev spektrumları (Yöntem 1)

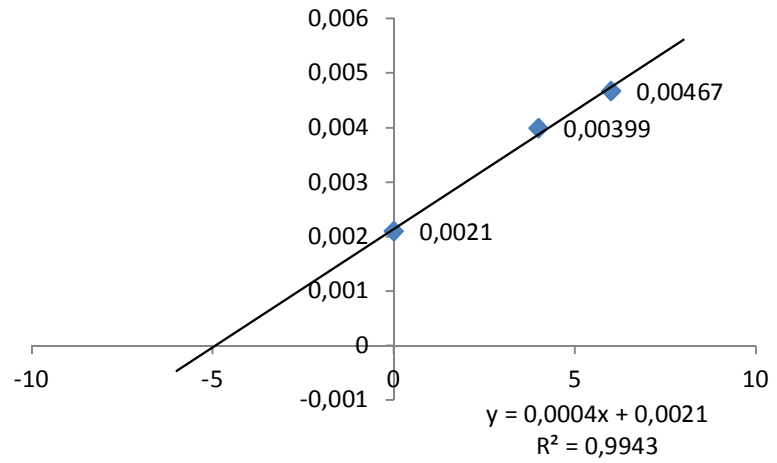


Şekil 4.68 SB için standart katma yönteminin kalibrasyon eğrisi (Yöntem 1)

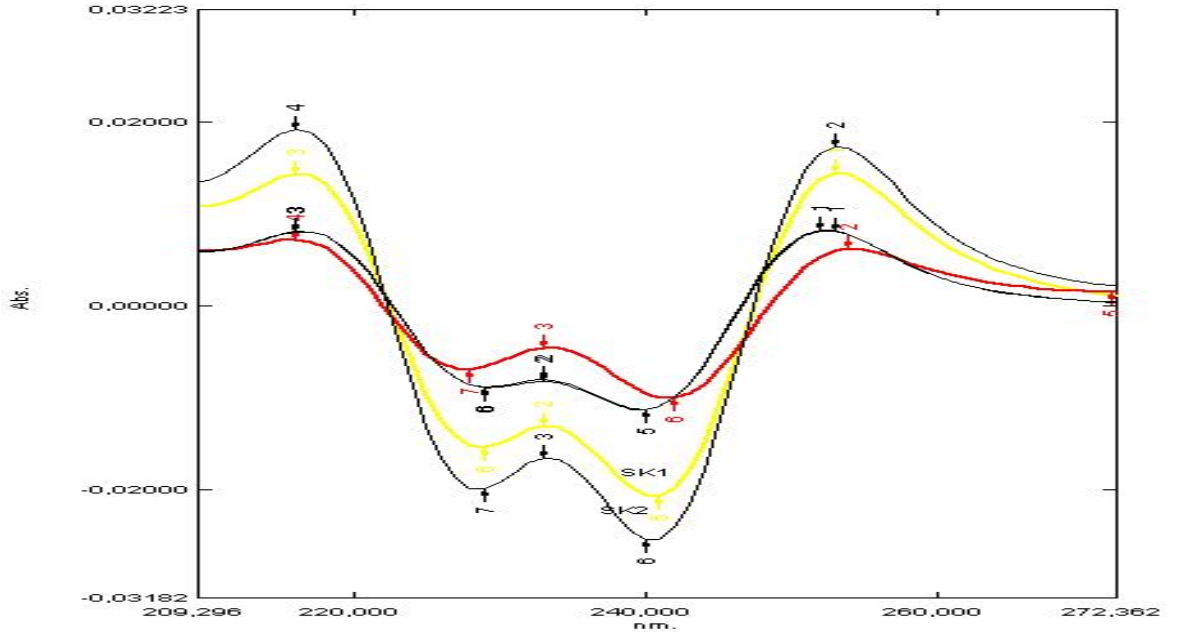
➤ **Light Cola, Light Pepsi ve Bütçem Numunelerine de Standart Katma Yöntemi ile Ace-K Tayini**



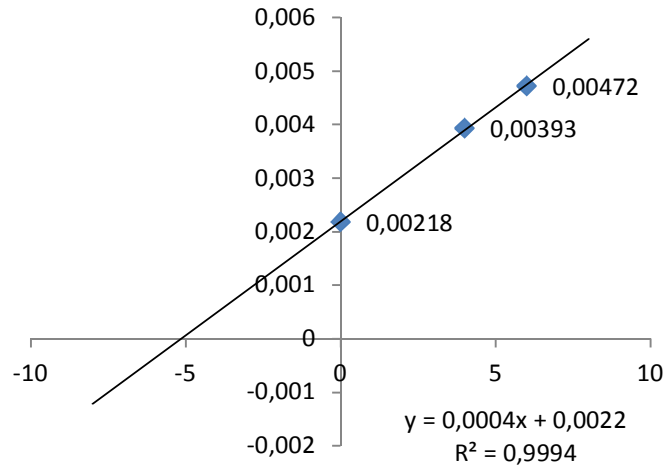
Şekil 4.69 Light Cola (kırmızı), karışım (sarı) SK 1 ve SK2 'nin oran spektrumlarının 2. derece türev spektrumları (Yöntem 1)



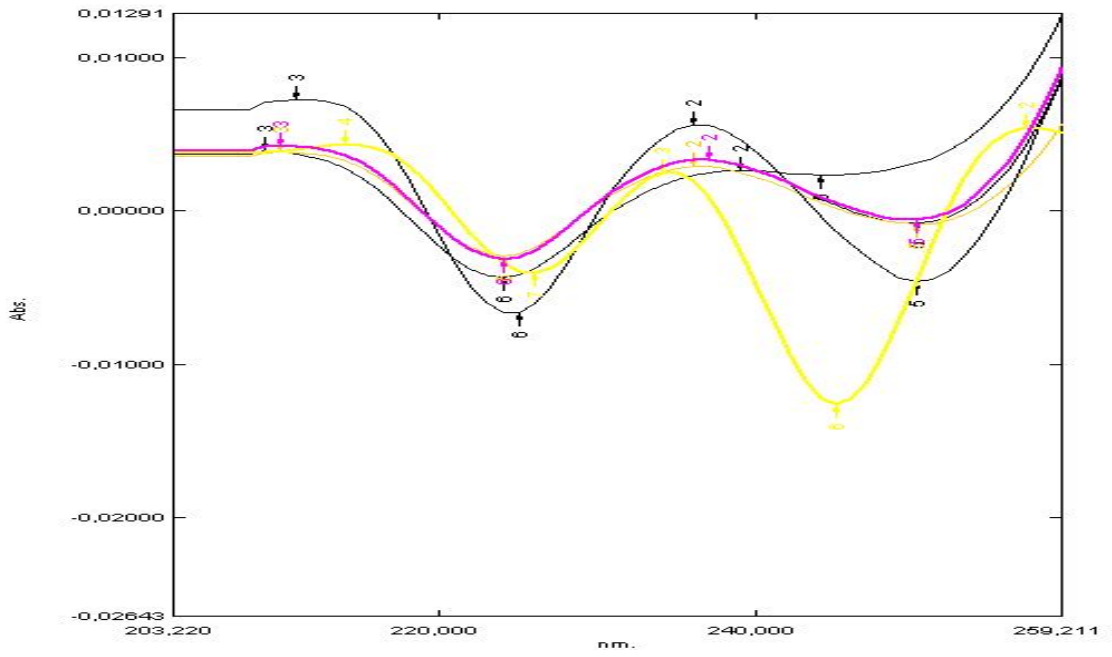
Şekil 4.70 Ace-K için standart katma yönteminin kalibrasyon eğrisi (Yöntem 1)



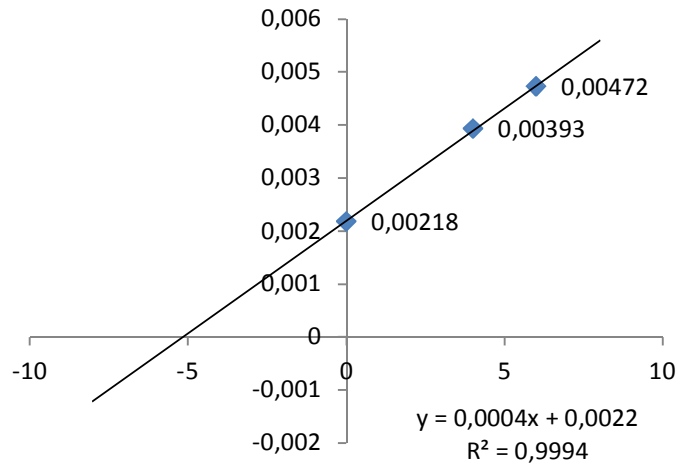
Şekil 4.71 Light Pepsi (kırmızı), karışım (sarı) SK ve SK2 ‘nin oran spektrumlarının 2. derece türev spektrumları (Yöntem 1)



Şekil 4.72 Ace-K için standart katma yönteminin kalibrasyon eğrisi (Yöntem 1)



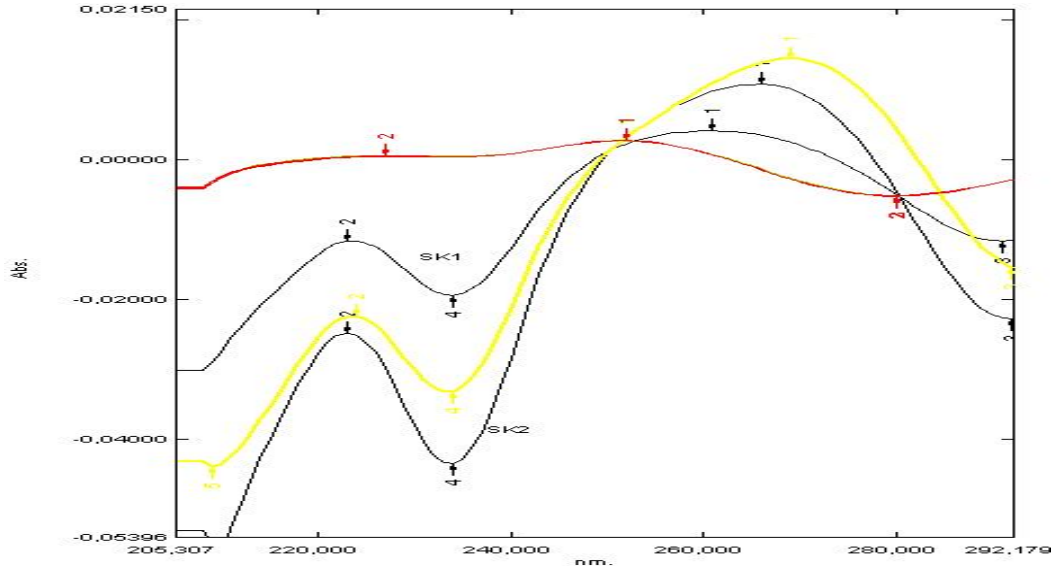
Şekil 4.73 Bütçem (kırmızı), karışım (sarı) , SK1 ve SK2 'nin oran spektrumlarının 2.derece türev spektrumları (Yöntem 1)



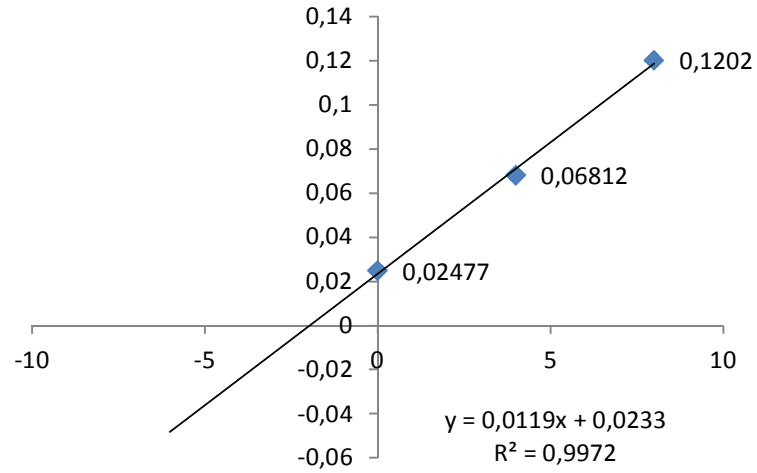
Şekil 4.74 Ace-K için standart katma yönteminin kalibrasyon eğrisi (Yöntem 1)

4.4.5.2 Oran Türev Spektrofotometrik Yöntemin Standart Katma ile Üçlü Bileşenli Karışıma Uygulanması (Yöntem 1)

➤ Link Numunesinde Standart Katma Yöntemi İle Ace-K Tayni

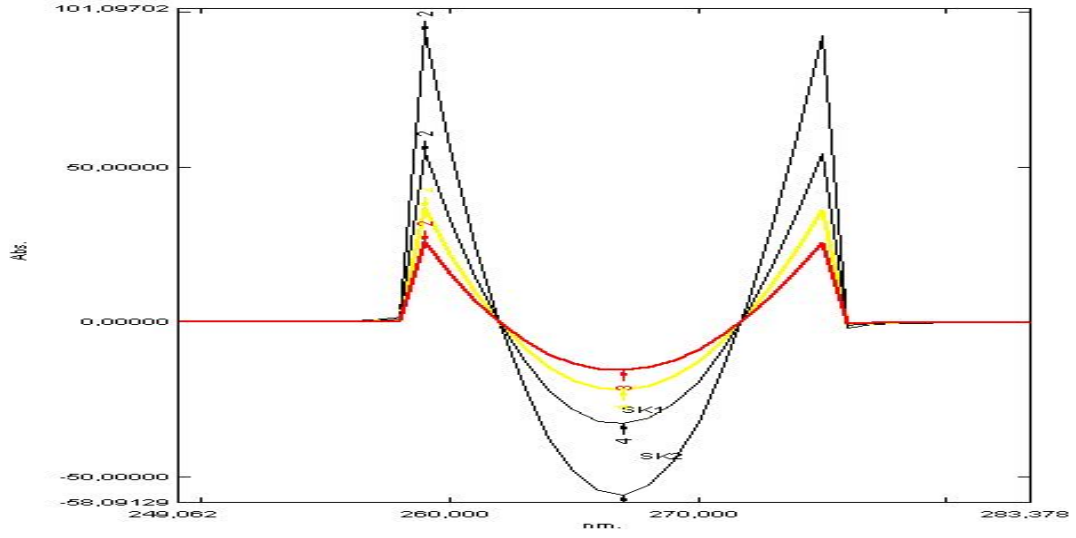


Şekil 4.75 Link (kırmızı) karışım (sarı), SK1 ve SK2 'nin oran spektrumlarının 2. derece türev spektrumları (Yöntem 1)

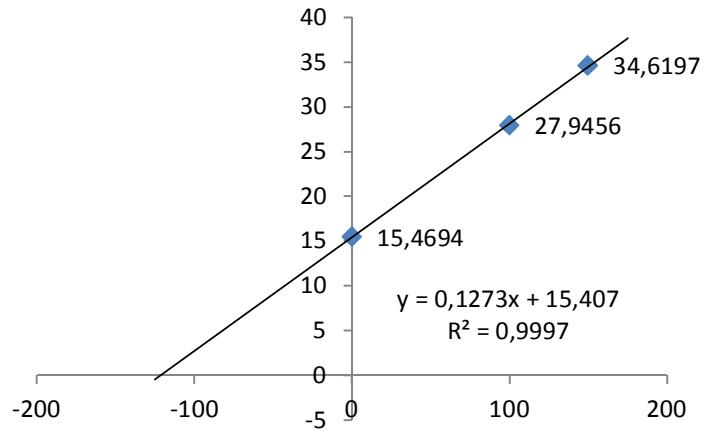


Şekil 4.76 Ace-K için standart katma yönteminin kalibrasyon eğrisi (Yöntem 1)

➤ **Link Numunesinde Standart Katma Yöntemi İle NHDC Tayni**

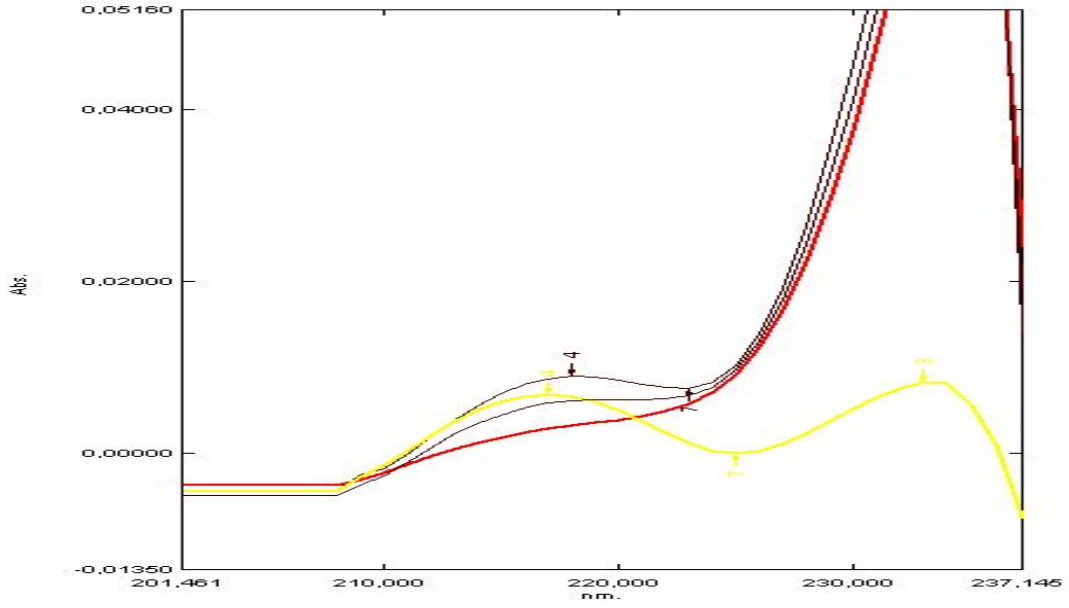


Şekil 4.77 Link (kırmızı) karışım (sarı) , SK1 ve SK2 'nin oran spektrumlarının 2. derece türev spektrumları (Yöntem 1)

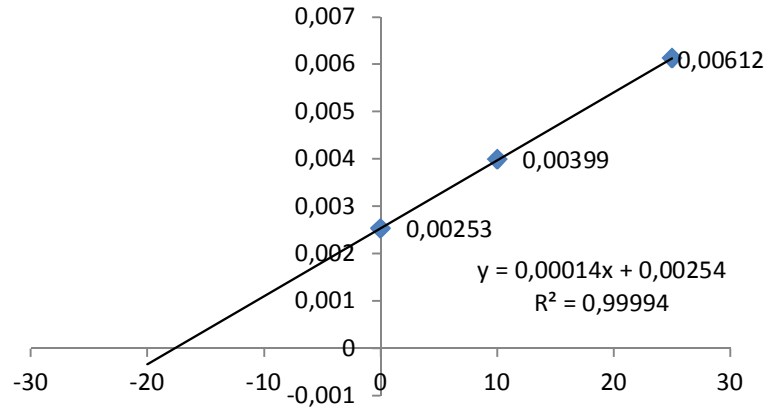


Şekil 4.78 NHDC için standart katma yönteminin kalibrasyon eğrisi (Yöntem 1)

➤ **Link Numunesinde Standart Katma Yöntemi İle Asp Tayni**



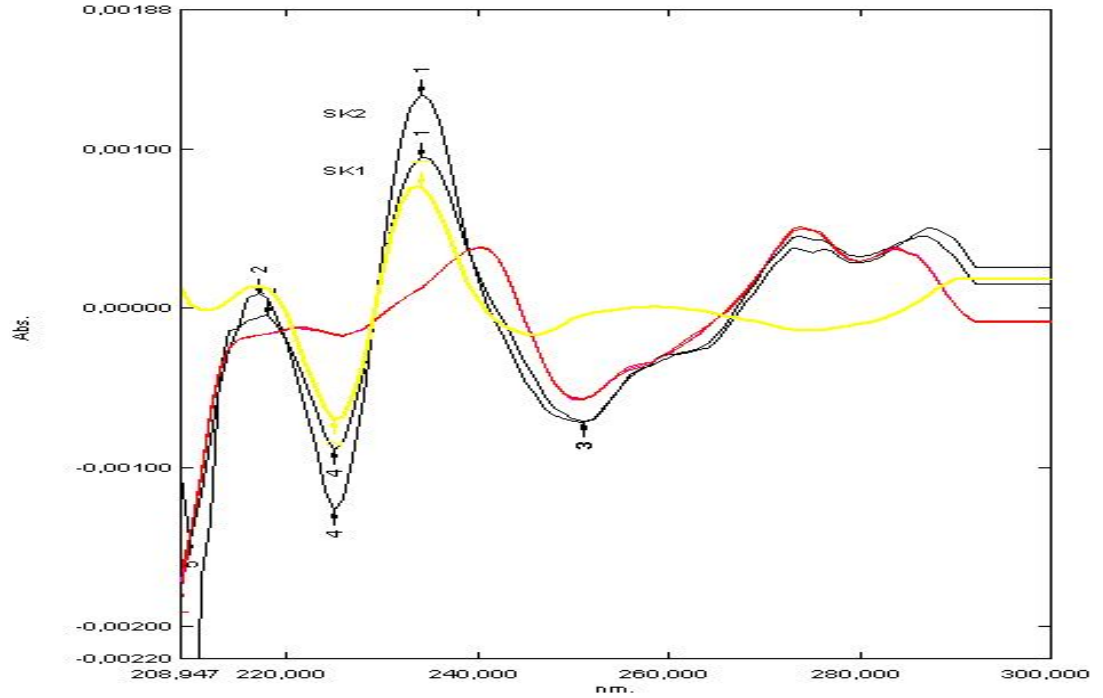
Şekil 4.79 Link (Kırmızı) karışım (sarı) , SK1 ve SK2 'nin oran spektrumlarının 2. derece türev spektrumları (Yöntem 1)



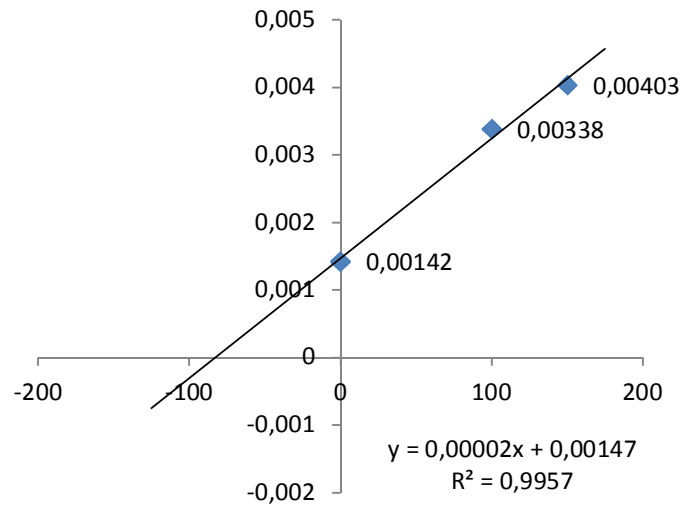
Şekil 4.80 Asp için standart katma yönteminin kalibrasyon eğrisi (Yöntem 1)

4.4.5.3 Türev Spektrofotometrik Yöntemin Standart Katma (Yöntem 2) ile Üç Bileşenli Karışıma Uygulanması

➤ Link Numunesinde Standart Katma Yöntemi İle NHDC Tayni

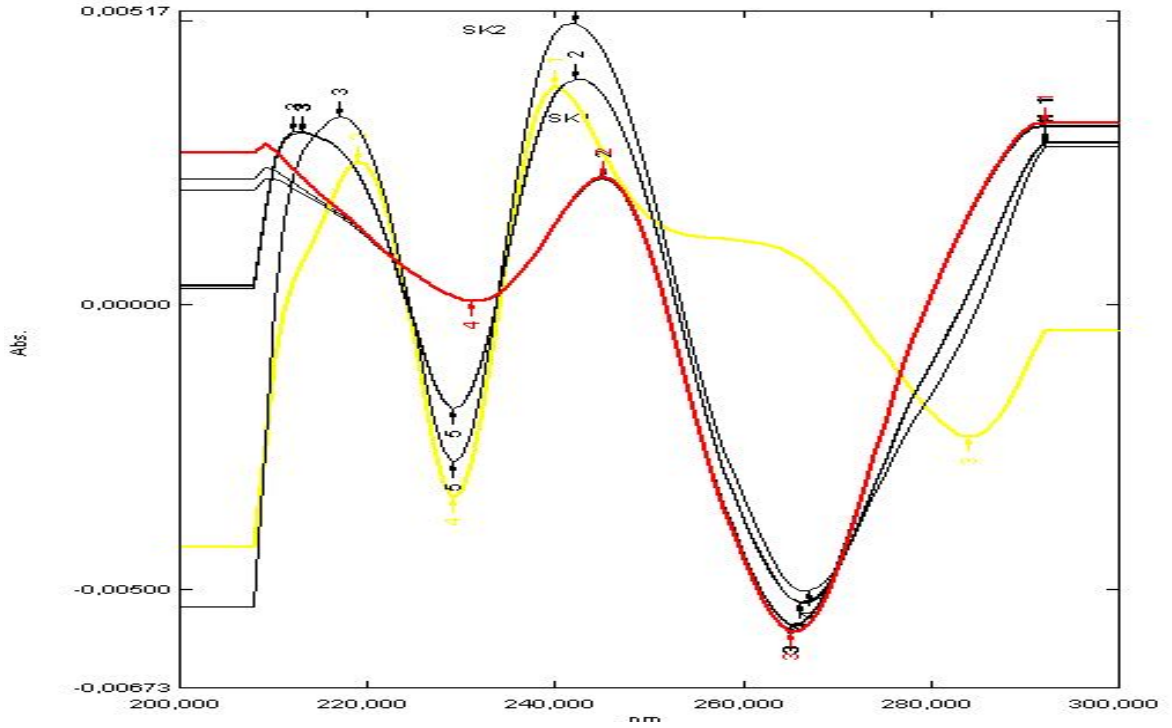


Şekil 4.81 Link (kırmızı), karışım (sarı, 175 µg/ml NHDC 25 µg/ml Asp 10 µg/ml Ace-K), SK1 ve SK2'nin 2. derece türev spektrumları (Yöntem 2)

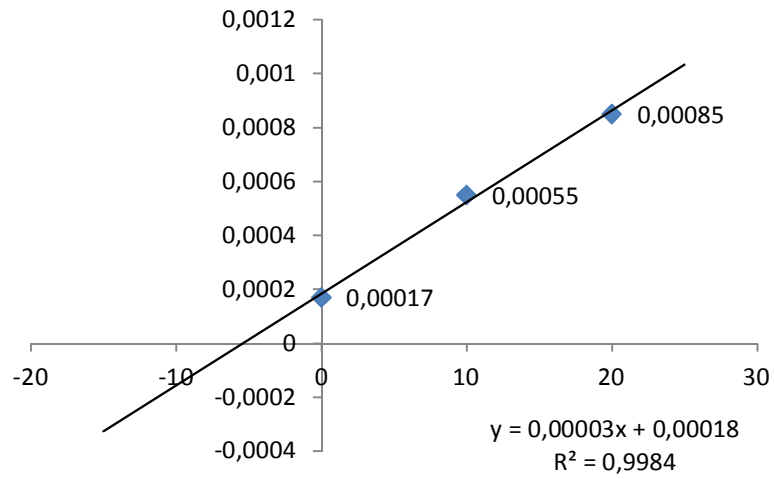


Şekil 4.82 NHDC için standart katma yönteminin kalibrasyon eğrisi (Yöntem 2)

➤ **Link Numunesinde Standart Katma Yöntemi İle Asp Tayni**



Şekil 4.83 Link (kırmızı) karışım (sarı, 175 µg/ml NHDC, 25 µg/ml asp, 10 µg/ml ace-K) , SK1 ve SK2'nin 2. derece türev spektrumları (Yöntem 2)



Şekil 4.84 Asp için standart katma yönteminin kalibrasyon eğrisi (Yöntem 2)

4.4.5.4 Örneklerin Analizi ve Standart Katma Yöntemi Sonuçları ile Karşılaştırılması

Çizelge 4.33 Light coca cola örneğinin analizi (Yöntem 1)

	Oran Türev Spektrofotometrik Yöntem (Yöntem1)				Yöntem 1'e Standart Katma Yöntemi			
İstatiksel Parametreler								
	g/L							
n	Asp	Ace-K	SB	Kaf	Asp	Ace-K	SB	Kaf
1	0,232	0,225	0,117	0,132	0,222	0,224	0,106	0,133
2	0,227	0,231	0,112	0,131	0,223	0,219	0,106	0,127
3	0,229	0,227	0,104	0,127	0,218	0,223	0,114	0,126
X _{ort}	0,229	0,228	0,111	0,13	0,221	0,222	0,109	0,129
S	0,003	0,003	0,007	0,003	0,003	0,003	0,004	0,004
%RSD	1,31	1,316	6,306	2,308	1,161	1,192	4,13	3,088
X _{ort} ±t.S/n ^{1/2}	0,229 ±0,003	0,228 ±0,003	0,111±0,007	0,13 ±0,003	0,221 ±0,004	0,222 ±0,005	0,109 ±0,006	0,129 ±0,005
t testi					0,001	0,002	0,021	0,01
F testi					1,074	1,054	1,018	1,035
n ₁ =n ₂ =n ₃ P= 0,05 t _{tablo} = 2,92 F _{tablo} = 19								

Çizelge 4.34 Light pepsi örneğinin analizi (Yöntem 1)

	Oran Türev Spektrofotometrik				Yöntem 1'e Standart Katma			
istatiksel	Yöntem (Yöntem1)				Yöntemi			
Parametreler	g/L							
n	Asp	Ace-K	SB	Kaf	Asp	Ace-K	SB	Kaf
1	0,237	0,224	0,104	0,133	0,223	0,221	0,108	0,134
2	0,233	0,221	0,111	0,129	0,228	0,219	0,1	0,129
3	0,227	0,217	0,104	0,134	0,228	0,219	0,111	0,129
X _{ort}	0,232	0,221	0,106	0,132	0,226	0,22	0,106	0,131
S	0,005	0,004	0,004	0,003	0,003	0,001	0,006	0,003
%S	2,166	1,591	3,801	2,004	1,408	0,603	5,364	2,212
X _{ort} ±t.S/n ^{1/2}	0,232±0,005	0,221±0,004	0,106±0,004	0,132 ±0,003	0,226 ±0,003	0,22 ±0,003	0,106 ±0,003	0,131 ±0,008
t testi					0,012	0,013	0,018	0,021
F testi					1,102	1,009	1,02	1,015
n ₁ =n ₂ =n ₃ P= 0,05 t _{tablo} = 2,92 F _{tablo} = 19								

Çizelge 4.35 Bütçem meyve suyu örneğinin analizi (Yöntem 1)

	Oran Türev Spektrofotometrik				Yöntem 1'e Standart Katma			
İstatiksel Parametreler	Yöntem (Yöntem1)				Yöntem			
	g/L							
n	Asp	Ace-K	SB	Kaf	Asp	Ace-K	SB	Kaf
1	0,234	0,271	-	0,133	0,232	0,272	-	0,135
2	0,229	0,264	-	0,128	0,232	0,276	-	0,131
3	0,238	0,26	-	0,135	0,23	0,277	-	0,132
X _{ort}	0,234	0,265	-	0,132	0,232	0,275	-	0,132
S	0,005	0,006	-	0,004	0,001	0,003	-	0,002
%S	1,93	2,101	-	2,731	0,623	0,962	-	1,531
X _{ort} ±t.S/n ^{1/2}	0,234±0,005	0,265±0,006	-	0,132±0,004	0,232±0,004	0,275±0,003	-	0,132±0,002
t testi			-		0,018	0,013	-	0,007
F testi			-		1,017	1,076	-	1,004
n ₁ =n ₂ =n ₃ P= 0,05 t _{tablo} = 2,92 F _{tablo} = 19								

Çizelge 4.36 Link meyve suyu örneğinin analizi (Yöntem 1)

İstatistiksel Parametreler	Oran Türev Spektrofotometrik Yöntem (Yöntem1)			Yöntem 1'e Standart Katma Yöntemi		
				g/L		
n	Asp	Ace-K	NHDC	Asp	Ace-K	NHDC
1	0,213	0,223	0,375	0,223	0,221	0,373
2	0,222	0,219	0,371	0,22	0,220	0,371
3	0,216	0,215	0,373	0,216	0,216	0,372
X_{ort}	0,217	0,219	0,373	0,2195	0,219	0,372
S	0,005	0,004	0,002	0,004	0,002	0,001
%S	0,007	0,006	0,002	1,600	1,0790	0,269
$X_{ort} \pm t \cdot S/n^{1/2}$	0,216 $\pm$ 0,005	0,219 $\pm$ 0,004	0,373 $\pm$ 0,002	0,219 $\pm$ 0,003	0,219 $\pm$ 0,002	0,372 $\pm$ 0,001
t testi				0,005	0,009	0,003
F testi				1,023	1,005	1,005
$n_1=n_2=n_3$ $P= 0,05$ $t_{tablo}= 2,92$ $F_{tablo}= 19$						

Çizelge 4.37 Link meyve suyu örneğinin analizi (Yöntem 2)

	Türev Spektrofotometrik Yöntem (Yöntem2)			Yöntem 2'e Standart Katma Yöntemi		
İstatiksel Parametreler	g/L					
	Asp	Ace-K	NHDC	Asp	Ace-K	NHDC
n	Asp	Ace-K	NHDC	Asp	Ace-K	NHDC
1	0,215	-	0,369	0,220	-	0,369
2	0,227	-	0,373	0,223	-	0,370
3	0,218	-	0,374	0,219	-	0,373
X _{ort}	0,220	-	0,372	0,221	-	0,371
S	0,006	-	0,003	0,002	-	0,002
%S	2,839	-	0,711	0,916	-	0,588
X _{ort} ±t.S/n ^{1/2}	0,220±0,006	-	0,372±0,003	0,221±0,002	-	0,370±0,003
t testi		-		0,014	-	0,002
F testi		-		1,041	-	1,011
n ₁ =n ₂ =n ₃ P= 0,05 t _{tablo} = 2,92 F _{tablo} = 19						

BÖLÜM 5

SONUÇ VE TARTIŞMA

Gıda endüstrisi, üretiminde yasal düzenlemelere uygun olarak gıda katkı maddeleri kullanırsa sağlık açısından risk minimize edilir. Başka bir deyişle gıda sanayi ürettiği gıdada gıda katkı maddeleri kullanırken teknik gerekliliğin yanı sıra, yasal düzenlemelerde o besin için izin verilen gıda katkı maddelerini, izin verilen miktarda kullanmak zorundadır. Gıda katkı maddeleri ile ilgili temel sorun bu noktadan kaynaklanmaktadır. Dolayısıyla üreticilere büyük sorumluluk düşmektedir. Gıda sanayi yasal düzenlemelere uygun gıda katkı maddeleri kullanımını sosyal bir sorumluluk olarak görmeli, üretiminde oto kontrolünü yapmalı ve sağlık riski taşımayan gıdaları tüketime sunmalıdır. Sanayinin doğru gıda katkı maddeleri kullanımı devlet tarafından da sıkı bir şekilde denetlenmeli, üretici ve tüketiciler bu konularda eğitilmelidir. Gıda katkı maddelerinin gıdalarda kullanımı ve kullanım dozları Türk Gıda Kodeksi'nin ilgili tebliğlerinde belirlenmiştir. Örneğin; gıda maddelerinde kullanılan tatlandırıcılar ile ilgili hükümler, “Gıda Maddelerinde Kullanılan Tatlandırıcılar Tebliği”nde (Tebliğ No:2010-58), renklendiricilerin kullanımı ve etiketlenmeleri ile ilgili hükümler “Gıdalarda Kullanılan Renklendiriciler Tebliği” nde (Tebliğ No:2007-49) ve bunların dışında kalan katkı maddeleri ise “Renklendiriciler ve Tadlandırıcılar Dışındaki Gıda Maddeleri Tebliği” (Tebliğ No:2008-69) nde ifade edilmiştir.

Biz bu çalışmada piyasada gıda ve farmasötik ürünlerde özellikle diabetik hastalar için geliştirilen ürünlerde oldukça bol miktarda kullanılan asp, ace-K, kaf, SB, NHDC maddelerini içeren gıda numunelerinde herhangi bir ayırma işlemi yapmadan bir arada kantitatif tayinleri için spektrofotometrik yöntemler geliştirmeyi amaçladık. Türev spektrofotometrik ve oran türev spektrofotometrik yöntemleri çok bileşenli karışımların analizi için büyük bir role sahiptir ve bu yöntemler ile herhangi bir ayırma işlemine gerek kalmadan üçlü ve dörtlü tatlandırıcı karışımlarının analizi yapılabilir. Geliştirilen yöntemlerde gıda numunelerinde bulunan bu üçlü ve dörtlü tatlandırıcı karışımlarının

analizlerini bir arada mümkün kılmıştır. Yüzde verim miktarlarının yüksek ve standart sapma değerlerinin düşük oluşu bu yöntemin uygulanabilirliğini arttırmaktadır. Geliştirilen yöntemler basit, hızlı, hassas ve ekonomik bir yöntem olarak analiz laboratuvarlarında üçlü ve dörtlü bileşenleri bir arada içeren ürünlerin analizinde kullanılabilir.

Gün içi ve gün aşırı alınan ölçüm sonuçlarının yakınlığı çalışılan yöntemlere kesinlik sağlamıştır.

5.1. Validasyon Çalışmaları

5.1.1 Uygun Koşulların Saptanması

Bölüm 3.4.2.1.1’ de anlatıldığı gibi hazırlanan, dörtlü tatlandıcı karışımı içeren çalışma için asp, ace-K, SB, kaf karışımının asidik çözeltilerinden alınan absorpsiyon spektrumlarında (Şekil 4.1) bu dört maddenin bir arada tayini absorpsiyon spektrofotometrisi ile mümkün değildir . Ancak üst üste çizilmiş olan 2. derece oran türev spektrumlarında iki bileşenin sıfır üçüncü bileşenin yüksek absorpsiyon değerleri verdiği dalga boylarında (asp 215,2 nm, ace-K 223,5 nm, SB 235 nm ve kaf 243,5 nm ‘de) ölçülen oran türev absorbans değerlerinden yararlanarak tatlandırıcıların normal şartlar altında birbirine etkisi olmadan kantitatif tayinleri mümkündür.

Bölüm 3.4.2.2.1’ de anlatıldığı gibi hazırlanan, üçlü tatlandıcı karışımı içeren çalışma için asp, ace-K ve NHDC ‘nin oran türev spektroskopik yöntemine göre alınan absorpsiyon eğrilerinde iki bileşenin sıfır üçüncü bileşenin yüksek absorpsiyon değerleri verdiği dalga boylarında (asp 216 nm, ace-K 235 nm, NHDC 267nm ‘de) (Şekil 4.22) ölçülen oran türev absorbans değerlerinden yararlanarak tatlandırıcıların birbirine etkisi olmadan normal şartlar altında kantitatif tayinleri mümkündür.

Bölüm 3.4.2.2.2’ de anlatıldığı gibi hazırlanan, diğer bir yöntem olan türev spektroskopisi ile üçlü analitin tayinini destelemek için yapılan çalışmalarda üç analitin bir arada tayini mümkündür (asp 227,5 nm, ace-K 247,3 nm, NHDC 240 nm). Ancak numunedeki asesülfam-K miktarının çok düşük olduğundan, tayin limiti sınırları dışında kalmıştır (Şekil 4.39) .

Bölüm 4.4.5’de çalışmaların özgünlüğünü sağlamak amacıyla ortamda bulunan matris etkisi gösteren maddelerin etkilerini en aza indirmek ve doğru kalibrasyon eğrilerini çizebilmek için, örnekte bulunan analitlere narak en yakın konsantrasyonlar

hazırlastandart katma yöntemi uygulanmıştır. Dörtlü tatlandırıcı içeren karışım için standart katma absorpsiyon ve kalibrasyon eğrileri (Şekil 4.54 - 4.73)'da verilmiştir. Üçlü tatlandırıcı karışımını içeren örneklere oran türev spektroskopik yöntem (Şekil 4.75-4.79) ve türev spektroskopik yöntem uyguladıktan sonra elde edilen eğrilerin absorpsiyon spektrumları (Şekil 4.81- 4.83) gösterilmiştir.

5.1.2 Saf Tatlandırıcılara Ait Ölçü Eğrileri

Dörtlü tatlandırıcı içeren karışımında bulunan analitler için asp (5-25 µg/ml), ace-K (2-10 µg/ml), SB (2-10 µg/ml) ve kaf için (3-15 µg/ml) konsantrasyon aralıklarında absorpsiyon eğrileri çizildi.(Şekil 4.1). Bu eğriler tezde belirtilen ikili karışımların eğrilerine oranlandı ve 2. derece türev spektrumları alındı .Üstü üste çizilen türev eğrilerinde iki bileşenin sıfır olduğu diğerinin maksimum verdiği dalga boylarında türev absorbans değerlerinin ölçümleri alındı. Ace-K'nın 223,4 nm'de (Şekil 4.2), asp'ın 215,2 nm'de (Şekil 4.7), SB'ın 235 nm'de (Şekil 4.12) ve kaf 'in ise 243,5 nm'de (Şekil 4.17) 2. derece türev absorbans değerleri alınmıştır. Bu değerler ile ilgili konsantrasyonlar arasında çizilen eğrilere ait regresyon analiz parametreleri çizelge 4.1 ile çizelge 4.8 aralığında Bölüm 4' de verilmiştir.

Üçlü tatlandırıcı içeren karışım da bulunan analitler için oran türev spektroskopik yöntemine göre asp (5-25 µg/ml), ace-K (2-10 µg/ml) , NHDC (75-175 µg/ml) konsantrasyon aralıklarında (Şekil 4.22) absorpsiyon eğrileri çizilmiştir. Bu eğriler tezde verilen ilgili karışımların eğrilerine oranlandı ve türev spektrumları alındı. Bu spektrumlarda NHDC 'nin 267 nm 'de (Şekil 4.23) 2. derece türev, asp'ın 216 nm 'de (Şekil 4.29) 3. derece türev ve ace-K'nın 235 nm 'de (Şekil 4.26) 2. derece türev absorbans değerleri kaydedildi. Bu değerler ile ilgili konsantrasyonlar arasında ölçü eğrileri hazırlandı. Bu eğrilere ait regresyon analiz parametreleri çizelge 4.9 ile çizelge 4.14 aralığında Bölüm 4 de verilmiştir.

Üçlü tatlandırıcı içeren karışım da bulunan analitler için türev spektroskopik yöntemine göre asp (5-25 µg/ml), ace-K (2-10 µg/ml), NHDC (75-175 µg/ml) konsantrasyon aralıklarında (Şekil 4.32) absorpsiyon eğrileri çizilmiştir.Bu eğrilere çizilen türev spektrumlarında NHDC 'nin 240 nm 'de (Şekil 4.35) 2. derece türev, asp'ın 227,5 nm 'de (Şekil 4.38) 3.derece türev ve ace-K'nın 235 nm 'de (Şekil 4.32) 1.türev absorbans

değerleri kaydedildi. Bu değerler ile ilgili konsantrasyonlar arasında ölçü eğrileri hazırlandı. Bu eğrilere ait regresyon analiz parametreleri çizelge 4.15 ile çizelge 4.20 aralığında Bölüm 4' de verilmiştir.

R değerlerinin yüksek, bağıl standart sapma değerlerinin ise düşük olması seçilen konsantrasyon aralıklarında yöntemlerin doğrusal olduğunu belirlemiştir.

5.1.3 Özgünlük

Bölüm 3.4.4 de anlatıldığı gibi buzdolabında bekletilen saf SB (Şekil 4.41), saf asp (Şekil 4.42), saf ace-K (Şekil 4.43), saf kaf (Şekil 4.44)'ın stok çözeltilerin ısı, ışık ve zamana karşı bozunup bozulmadığı farklı zaman aralıklarında (1,5,10,15 ve 20. Gün) absorpsiyon spektrumları alınarak kontrol edildi. Aynı çalışma numune çözeltilerine 1',15',30',45',60' ve 7.gün zaman diliminde uygulandı. Sonuçlar şekil 4.46 -4.49 'de verildi. İlgili grafiklerden görüldüğü gibi verilen zaman dilimlerinde numune ve stok çözeltiler için alınan ölçümler arasında fark olmadığı gözlenmiştir (Bölüm 4.4.1).

5.1.4 Tayin Limiti (LOD) / Ölçüm Limiti (LOQ)

Bölüm 3.4.2' deki gibi çalışılarak elde edilen çalışma sonuçları ortalama, standart sapma ve bağıl standart sapma olarak hesaplandı. LOD değeri için standart sapmanın üç katı, LOQ değeri için standart sapmanın on katı alındı.

Dörtlü tatlandırıcı içeren karışım için Yöntem 1 (Çizelge 4.21);

Asp : LOD:0,16 µg/ml ve LOQ:0,54 µg/ml

Ace-K: LOD:0,20 µg/ml ve LOQ:0,66 µg/ml

SB: LOD:0,25 µg/ml ve LOQ:0,83 µg/ml

Kaf: LOD:0,34 µg/ml ve LOQ: 1,13 µg/ml

Üçlü tatlandırıcı içeren karışım için Yöntem 1 (Çizelge 4.22);

Asp : LOD:0,22 µg/ml ve LOQ:0,74 µg/ml

Ace-K: LOD:0,20 µg/ml ve LOQ:0,65 µg/ml

NHDC: LOD:0,17 µg/ml ve LOQ:0,57 µg/ml

Üçlü tatlandırıcı içeren karışım için Yöntem 2 (Çizelge 4.23):

Asp : LOD:0,70 µg/ml ve LOQ:2,4 µg/ml

Ace-K: LOD:0,36 µg/ml ve LOQ:1,23 µg/ml

NHDC: LOD:0,81 µg/ml ve LOQ:2,71 µg/ml

Bölüm 2.18.6 ve 2.18.7 de anlatıldığı gibi her bir analitin farklı konsantrasyonlardaki çözeltilerinin LOD ve LOQ değerlerinin düşük olması, yöntemin oldukça düşük konsantrasyonlarda uygulanabileceği konusunda bilgi vermiştir.

5.1.5 Gün İçi ve Gün Aşırı Ölçüm Değerleri

Bölüm 3.4.' deki gibi çalışılarak elde edilen çalışma sonuçları ortalama, standart sapma ve bağıl standart sapma olarak hesaplandı. Sonuçlar dörtlü çalışmalar için Çizelge 5.1 – 5.8 ve üçlü çalışmalar içinde Çizelge 5.9-5.20 arasında verildi.

Bölüm 3.4.4.1 .'deki çalışma ile gün içi ve gün aşırı çalışmalar ile oluşan sonuçlar Çizelge 5.24 – 5.29 arasında verildi.

Yapılan bu çalışmalarda bağıl standart sapma (%RSD) değerlerinin düşük olması yöntemin tekrarlanabilir olduğunu göstermiştir ve çalışmaya kesinlik katmıştır.

5.1.6 Yüzde Verim Çalışmaları

Oran spektrofotometrik yöntem, türev spektrofotometrik yöntem ve standart katma yöntem ile saf ve karışım halindeki tüm tatlandırıcılar için % verim çalışmaları Bölüm 3.4.4 (f)' de anlatıldığı gibi yapıldı (Çizelge 4.30 – Çizelge 4.32) .

Validasyon çalışmalarına bağlı olarak yüzde verim çalışmaları %98,7-103 aralığında sonuçlanmıştır. Şekil 4.50, şekil 4.51 ve şekil 4.52'de tatlandırıcı içeren karışımlarda analitlerin konsantrasyon değerlerinin konulan bulunan grafikleri gösterilmiştir.

R değerlerinin ve geri kazanım değerlerinin yüksek oluşu ölçülen değerlerin gerçek değere daha yakın olduğunu göstermiştir.

5.1.7 Örneklerin Analizi ve Standart Katma Yöntemi Sonuçları ile Karşılaştırılması

Light coca cola, light pepsi, bütçem meyve suyu ve link meyve suyu tayininde kullanılmak üzere 0,5-2 ppm ve konsantrasyon aralığında hazırlanan çözeltilerin Bölüm 3.4.4.1 ve bölüm 3.4.4.2' de anlatıldığı gibi çalışılarak absorpsiyon, 1.2. ve 3. derece

türev spektrumları alındı. Bu değerler yardımıyla oluşturulan ölçü eğrilerine ait grafikler ve çizelgeler Bölüm 4'te verilmiştir.(Şekil 4.53 -4.84)

Dörtlü karışım için hazırlanan absorpsiyon eğrilerinden bütçem meyve suyundaki SB tayini yapılamamıştır. Şekil 4.15'de görüldüğü gibi örneğin absorbansı standart eğrilerin dışında kalmaktadır.

Üçlü karışım absorpsiyon eğrileri alınan karışımlar içinse türev spektroskopik yöntemle göre ace-K tayini yapılamamıştır. Şekil 4.33 'de görüldüğü üzere asesülfam-K piki standart eğri dışında kalmaktadır.

Analiz edilen numunelerde matriks etkisinin olup olmadığının kontrolünü sağlamak amacıyla standart katma metodu kullanılmıştır. Bu metod Yöntem 1 ve Yöntem 2 ile karşılaştırıp t-F sonuçları hesaplanmıştır. Yapılan üç deneme sonucuelde edilen ortalama değerlerin karşılaştırılması amacıyla hesaplanan t-F değerleri çalışmaların doğrulugunu ortaya koymuştur.

Bölüm 4.4.5.4 'de sonuçların çizelgeler halinde gösterildiği gibi (Çizelge 4.33) asp, ace-K, kaf ve SB tayini için uygulanan yöntemlerden elde edilen sonuçlar t testi ile ortalamalar, F testi ile presizyonlar yönünden %95 güven düzeyinde karşılaştırıldı. Dört farklı tatlandıcı içeren Light cola analizinde geliştirilen yöntemlerden oran türev spektrofotometrik için hesaplanan t değeri, ilgili güven düzeyi ve üç deneme için verilen tablo değerlerinden küçüktür. F değeri, ilgili güven düzeyi ve üç deneme için verilen tablo değerlerinden küçüktür.

(Çizelge 4.34) Asp, ace-K, kaf ve SB tayini için uygulanan yöntemlerden elde edilen sonuçlar t testi ile ortalamalar, F testi ile presizyonlar yönünden %95 güven düzeyinde karşılaştırıldı. Dört farklı tatlandıcı içeren Light Pepsi analizinde geliştirilen yöntemlerden oran türev spektrofotometrik için hesaplanan t değeri, ilgili güven düzeyi ve üç deneme için verilen tablo değerlerinden küçüktür. F değeri, ilgili güven düzeyi ve üç deneme için verilen tablo değerlerinden küçüktür.

(Çizelge 4.35) Asp, ace-K, kaf ve SB tayini için uygulanan yöntemlerden elde edilen sonuçlar t testi ile ortalamalar, F testi ile presizyonlar yönünden %95 güven düzeyinde karşılaştırıldı. Dört farklı tatlandıcı içeren Bütçem meyve suyu analizinde geliştirilen yöntemlerden oran türev spektrofotometrik için hesaplanan t değeri, ilgili güven

düzeyi ve üç deneme için verilen tablo değerlerinden küçüktür. F değeri, ilgili güven düzeyi ve üç deneme için verilen tablo değerlerinden küçüktür.

(Çizelge 4.36) Asp, ace-K, NHDC tayini için uygulanan yöntemlerden elde edilen sonuçlar t testi ile ortalamalar, F testi ile presizyonlar yönünden %95 güven düzeyinde karşılaştırıldı. Üç farklı tatlandırıcı içeren Ülker Link meyve suyu analizinde geliştirilen yöntemlerden oran türev spektrofotometrik için hesaplanan t değeri, ilgili güven düzeyi ve üç deneme için verilen tablo değerlerinden küçüktür. F değeri, ilgili güven düzeyi ve üç deneme için verilen tablo değerlerinden küçüktür.

(Çizelge 4.37) Asp, ace-K, NHDC tayini için uygulanan yöntemlerden elde edilen sonuçlar t testi ile ortalamalar, F testi ile presizyonlar yönünden %95 güven düzeyinde karşılaştırıldı. Üç farklı tatlandırıcı içeren Ülker Link meyve suyu analizinde geliştirilen yöntemlerden türev spektrofotometrik için hesaplanan t değeri, ilgili güven düzeyi ve üç deneme için verilen tablo değerlerinden küçüktür. F değeri, ilgili güven düzeyi ve üç deneme için verilen tablo değerlerinden küçüktür.

Bölüm 4.4.5' de dörtlü ve üçlü farklı tatlandırıcı içeren karışımların analizi için numunelere uygulanan yöntemlerde elde edilen sonuçlar belirtildi. Geliştirilen yöntemlerde numunede bahsedilen analitlerin miktarı üç adet tayin üzerinden hesaplanan ortalama (X_{ort}) lar, standart sapma (S) lar kapsamında değerlendirildi. Deneysel çalışmada kullanılan çoğu örnekte geliştirilen üç yöntemin uygulanmasıyla hesaplanan miktarların ortalamaları çok fazla farklılık göstermemiştir. Standart sapma değerleri kıyaslandığında geliştirilen yöntemlerin çoklu tatlandırıcı içeren karışımların tayini için kullanılabilirliğini ortaya koymuştur. Bu yöntemleri doğru uygulayabilmek için, analiz koşullarına uygun hazırlanan çözeltiler, analizin süresini kısaltır, hata faktörlerini ortadan kaldırır, duyarlılığı artırır, özel tanınmayı, doğrulamayı ve kolayca ölçmeyi sağlar.

KAYNAKLAR

-
- [1] Dinç E., Baydan E., Kanbur M. Ve Onur F.(2002) “ Spectrophotometric muticomponent determination of sunset yellow, tartrazine and allura red in soft drink powder by double divisor-ratio spectra derivative, insolve least-square and principal component regression methods”, Talanta 58:579-594.
- [2] Bayhan, A., Küçükömrler, S. ve Yentür, G., (1997). Bazı Gıda Maddelerine Katılan Yapay Tatlandırıcılar Üzerinde Araştırmalar, Gıda 22 (3):187-191.
- [3] Küçüköner E. (2006) . Yeni Ürün Gelistirmede Gıda Katkı Maddelerinin Fonksiyonları ve Önemi. GIDA 31 (3): 175-181.
- [4] Altuğ, T., Elmacı, Y. (2006). Tatlandırıcılar “Gıda Katkı Maddeleri, Altuğ, T., Ed. ”. Meta Basım .’ 2. Baskı. İzmir. 209-232.
- [5] Yılmaz, N., (2007). Yapay Tatlandırıcılar Ve Gıda Sanayinde Kullanımları, Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa, 1525
- [6] Tatlandırıcılar, www.saglikvakfi.org.tr, 11 Şubat 2013.
- [7] Tatlandırıcılar, www.fao.org, 7 Mart 2012.
- [8] Tatlandırıcılar, <http://www.fao.org/waicent/faoinfo/economic/jecfa/jecfa.htm>, 19 Ocak 2013.
- [9] Tatlandırıcılar, <http://www.cfsan.fda.gov/list.html>, 23 Ocak 2013.
- [10] Tatlandırıcılar , www.saglikvakfi.org.tr, 23 Ocak 2013.
- [11] Tatlandırıcılar, www.hammaddeler.com, 24 Nisan 2013.
- [12] Tatlandırıcılar , <http://tr.wikipedia.org/wiki/Aspartam>, 15 Mayıs 2013.
- [13] Anonim 2004. Position Of The American Dietetic Association: Use of Nutritive and Nonnutritive Sweeteners. Journal of the American Dietetic Association 25(104): 255–275.
- [14] Anonim 2006. B. Sweet Choices: Questions and Answers about Sweeteners in Low-Calorie Foods and Beverages. Calorie Control Council 5775 Peachtree-Dunwoody Rd., Bldg. G, Suite 500, Atlanta, 6 p.
- [15] Doğan, M. Ve Boroğlu, E. (2000). Süt Endüstrisinde Aspartam E 951 Süt Mikrobiyolojisi Katkı Maddeleri. VI. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu Tekirdağ. 479–483.
- [16] Öz, Ş.G., (2003). Aspartam: Güvenilirliği Üzerine Yapılan Tartışma, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası 56 (2) : 113-120.

- [17] Butchko HH, Stargel WW, Comer PC ve Mayhew DA,et al. , (2002). ‘Aspartame Review of safety.Regul Toxicol Pharmacol , 35: S1-S93, Gio B. Gori; USA.
- [18] Kroeze J.H.A.,(2000). Neohesperidin Dihydrochalcone is not a Taste Enhancer in Aqueous Sucrose Solutions. Chem. Senses, Oxford University Press. 25(4): 555 – 559.
- [19] Tatlandırıcılar, <http://www.agri.gov.il/Units/Kidum/eyal.html>, 15 Mayıs 2013.
- [20] Anonim (2004). Position of the American Dietetic Association: Use of Nutritive and Nonnutritive Sweeteners. Journal of the American Dietetic Association.2004;104: 255-275.
- [21] Coiffard, C., L. Coiffard, F. Peigné Ve Y. De Roeck-Holtzhauer ,(1998). Effect of pH on Neohesperidin Dihydrochalcone Thermostability in Aqueous Solutions Analysis, 26, 150-153.
- [22] Anonim (2006) A . Gıda Maddelerinde Kullanılan Tatlandırıcılar Tebliği. Tebliğ No:2006/45, 16s.
- [23] Tatlandırıcılar, www.hammadeler.com, 15 Mayıs 2013
- [24] Tatlandırıcılar, <http://gida.mersin.edu.tr/Gm324/Kafein.Pdf> ,17 Haziran 2013
- [25] Tatlandırıcılar , <http://gida.mersin.edu.tr>,18 Nisan 2013
- [26] Yasa, M., (2003). Avrupa Birliği ve Gıda Katkı Maddeleri. Dünya Gıda 2003 10,72-74.
- [27] Lotz, A., (1991). Applications of Acesulfame K in the Food Industry. The Third International Congress on Food Industry. 4-8 November 1991, Kuşadası-Türkiye. 349 –362.
- [28] Özavar, Ş., 1999. Meşrubat Sektöründe Yapay Tatlandırıcı Kullanımı. Gıda Teknolojisi. 4 (4) : 34-35.
- [29] Beier, R.C.,(1990). Natural pesticides and bioactive components in foods. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. 133: 47- 123
- [30] Karakaya, A.E. (2011). Gıda Katkı Maddeleri ve Gıda Kontaminantları, <http://www.turktox.org.tr/Gida/> (Erişim 14.07.2012).
- [31] Karaali, A. (2006). Gıda Katkı Maddeleri. İTÜ Gıda Mühendisliği Bölümü, İstanbul
- [32] 1.Ulusal Helal ve Sağlıklı Gıda Kongresi (2011), Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Konya
- [33] Tatlandırıcılar, www.mevzuat.gov.tr/MevzuatMetin/yonetmelik/7.5.15691%20ek.doc , 14 Mart 2013
- [34] Renklendiriciler ve Tatlandırıcılar Dışındaki Gıda Katkı Maddeleri Tebliğinde, Değişiklik Yapılması Hakkında Tebliğ (Tebliğ No:2004/49) (13.1.2005 tarih ve 25699 sayılı Resmi Gazetede yayınlandı.)
- [35] Saldamlı İ, Uygun Ü. Gıda Katkı Maddeleri. Saldamlı İ (ed) Gıda . Kimyası, Hacettepe Üniversitesi Yayınları,1998.
- [36] L.M.L.Nollet ve Toldra F.,(2012) Food Analysis by HPLC, Third Edition ,

Taylor & Francis Group New York, UK

- [37] D. Odacı, S. Timur and A. Telefoncu, (2004) "Carboxyl Esterase-Alcohol Oxidase based Biosensor for the Aspartame Determination", Food Chemistry, 84(3): 493- 496
- [38] Armenta S, Garrigues S, de la Guardia M., (2004) ." FTIR determination of Aspartame and Acesulfame-K in tabletop sweeteners " J Agric Food Chem. 29;52(26):7798-803.
- [39] Montijano H, Borrego F, Tomas-Barberan FA and Lindley MG, (1997) . " Stability of neohesperidine dihydrochalcone in a lemonade system", Food Chemistry, 58, 1, 13
- [40] Horie M, Ishikawa F, Oishi M, Shindo T, Yasui A and Ito K. (2007) "Rapid detrmination of cyclamate in foods by solid-phase exstraction and capillary electrophoresis" J Chromatogr A 2007;1154:423-428.
- [41] Zyglar, A., Wasik, A., and Namieśnik, J. (2009). Analytical methodologies for determination of artificial sweeteners in foodstuffs. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 28(9): 1082-1102.
- [42] Demir N.,(2005). Gıdalarda Kullanılan Tatlandırıcılar Lisans Bitirme Tezi,,Yıldız Teknik Üniv.Fen Bilimleri Enstitüsü,İstanbul
- [43] Khurana, H. K., Shim, J. Y., Cho, I. K., Li, Q. X., and Jun, S. (2008).“ Attenuated Total Reflectance–Fourier Transform Infrared Spectroscopy Coupled with Multivariate Analysis for Measurement of Acesulfame-K in Diet Foods”, Journal of food science, 73(5): C426-C431.
- [44] Sastry, Chilukuri SP, Kommula R. Srinivas, and Kommuri MMK Prasad. (1996)."Spectrophotometric determination of bio-active compounds in commercial samples with nitrous acid and cresyl fast violet acetate." Analytical letters 29.(8) :1329-1349.
- [45] Pierini, G. D., Llamas, N. E., Fragoso, W. D., Lemos, S. G., Di Nezio, M. S., and Centurión, M. E. (2012). Simultaneous determination of acesulfame-K and aspartame using linear sweep voltammetry and multivariate calibration. Microchemical Journal.
- [46] Llamas, N. E., Di Nezio, M. S., Palomeque, M. E., and Band, B. S. F. (2008).Direct determination of saccharin and acesulfame-K in sweeteners and fruit juices powders, Food Analytical Methods, 1(1): 43-48.
- [47] Ni, Y., Xiao, W., and Kokot, S. (2009). A differential kinetic spectrophotometric method for determination of three sulphanilamide artificial sweeteners with the aid of chemometrics. Food Chemistry, 113(4): 1339-1345.
- [48] YE, S., NI, Y. N., and QIU, P. (2007). Simultaneous UV-spectrophotometric Determination of Acesulfame-K, Aspartame and Saccharin Using Principal Compo-nent Regression Method. Journal of Nanchang University (Natural Science), 2007.
- [49] Shaogang L. ,Huahong W.,Ailiang T. And Zaixin L. (2004) , Analytical Laboratory ; 114 ,652
- [50] Armenta, S., Garrigues, S., and de la Guardia, M. (2004). "FTIR determination of aspartame and acesulfame-K in tabletop sweeteners" Journal of agricultural

- and food chemistry, 52(26):7798-7803.
- [51] AIP Conference Proceedings, (2012) ,Germany, Vol.,1425 ,98p
 - [52] Maes, P., Monakhova, Y. B., Kuballa, T., Reusch, H., and Lachenmeier, D. W. (2012), Qualitative and quantitative control of carbonated cola beverages using ¹H NMR spectroscopy, *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(11): 2778-2784.
 - [53] Nollet, L. M., and Toldrá, F. (Eds.). (2012). *Food analysis by HPLC* (Vol. 100). CRC Press.
 - [54] Odacı, D., Timur, S., and Telefoncu, A. (2004). Carboxyl esterase-alcohol oxidase based biosensor for the aspartame determination. *Food chemistry*, 84(3): 493-496.
 - [55] Armenta, S., Garrigues, S., and de la Guardia, M. (2004). FTIR determination of aspartame and acesulfame-K in tabletop sweeteners. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(26): 7798-7803
 - [56] Wróbel, K., and Wróbel, K. (2007). Determination of aspartame and phenylalanine in diet soft drinks by high-performance liquid chromatography with direct spectrofluorimetric detection. *Journal of Chromatography A*, 773(1): 163-168
 - [57] Tomas-Barberan, F. A., Borrego, F., Ferreres, F., and Lindley, M. G. (2005). Stability of the intense sweetener neohesperidine dihydrochalcone in blackcurrant jams. *Food chemistry*, 52(3): 263-265.
 - [58] Matsumoto, H., Hirata, K., Sakamaki, N., Hagino, K., and Ushiyama, H. (2008). Simultaneous determination of neotame, alitame and aspartame in foods by HPLC, *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, 49(1), 31.
 - [59] Tomas-Barberan, F. A., Borrego, F., Ferreres, F., and Lindley, M. G. (1995). Stability of the intense sweetener neohesperidine dihydrochalcone in blackcurrant jams. *Food chemistry*, 52(3): 263-265.
 - [60] Tomas-Barberan Montijano, H., Borrego, F., Canales, I., and Montijano,, F. A. (1997). Validated high-performance liquid chromatographic method for quantitation of neohesperidine dihydrochalcone in foodstuffs. *Journal of chromatography A*, 758(1): 163-166.
 - [61] Ozkan, G. and Guzel Seydim, Z., (2006). Isocratic separation of some food additives by reversed phase liquid chromatography. *Chromatographia* 63(1/2): 91-96
 - [62] N.Dossi,R.Toniolo, S.Susmel,A.Pizzarello and G.Bontempelli, (2006) “Simultaneous RP- LC Determination of Additives in Soft Drinks”*Chromatographia* 63(11-12): 557-562.
 - [63] Matsumoto H, Hirata V, Sakamaki N., Hagino K., Ushiyama H.,Eiseigaku Zasshi S., (2008) “Simultaneous determination of neotame,alitame and aspartame in foods by HPLC” *Pubmed.gov* 31. 49(1):31-6
 - [64] V.George, Arora S.Wadhwa, and B.K.Singh A.K,(2010) “Analysis of multiple sweeteners and their degradation products in lassi by HPLC and HPTLC plates”,*Journal of Food Science and Technology*, S47(4):408-413
 - [65] H.S.Lim, Park and Kwak I. ,(2013) , “ HPLC-MS/MS analysis of 9 artificial

- sweeteners, imported foods”, *Food Science and Biotechnology* , 22(1):233-240
- [66] Ji C, Sun Y., Li X, Chu X and Chen Z. (2009) “ Simultaneous determination of artificial sweeteners in beverage by ultra performance liquid chromatography” , *PubMed*, 27(1):111-3
 - [67] Ree M., and Stoa E., (2011) “ Simultaneous determination of aspartame , benzoic acid, caffeine, and saccharin in sugar-free beverages using HPLC” *Concordia College Journal of Analytical Chemistry*, 7(4): 73-77.
 - [68] D. Yang , B. Chen , and J. Agric. (2009) “Simultaneous Determination of Nonnutritive Sweeteners in Foods by HPLC/ESI-MS” *Food Chem.* 57(8) : 3022-3027.
 - [69] Nieland, B., and Lock, S. (2011), The Quantitation and Identification of Coccidiostats in Food by LC-MS/MS using the AB SCIEX 4000 Q TRAP® System.
 - [70] Trandafir I., Nour V., and Ionica E. M., (2009) “ Development and Validation Of An HPLC Method For Simultaneous Quantification of Asesulfam-k, Saccharin, Aspartam, Caffeine and Benzoic Acid in Cola Soft Drinks” , *Scientific Study & Research* , 2:1582.
 - [71] Zyglis A., Wasik A., and Namieśnik, (2011), “ Determination Of Nine High-Intensity Sweeteners In Various Foods By High Performance Liquid Chromatography With Mass Spectrometric Detection” , *Anal Bioanal Chem* , 400(7):2159-2172.
 - [72] Mohd Idris, K. M. Varshney, P. Sudhakar, S. K. Shukla and T. R. Baggi, (2012), “ HPLC Determination Of Aspartame In Tabletop Sweeteners By Precolumn Derivatization Using 2,4-Dinitrofluorobenzene” , *Academic science*, 4(1):975.
 - [73] Grembecka M. Szefer P. (2012) “Simultaneous Determination Of Caffeine And Aspartame In Diet Supplements And Non-Alcoholic Beverages Using Liquid Chromatography Coupled To Corona CAD And UV-DAD Detectors” , *Food Anal. Methods*, 5:1010-1017.
 - [74] Demiralay E., Özkan G., and Seydim Z. G., (2006), “Isocratic Separation of Some Food Additives by Reserved Phase Liquid Chromatography” , *Chromatographia*, 63(1-2): 91- 96.
 - [75] Yan, Q, Yang L., Ma. X, and Feng H. , (2013) , “Simultaneous Determination Of Six Food Additives In Drinks By High Performance Liquid Chromatography Coupled To Diode Array Detector Detection” , *Journal of the Chem. Society of Pakistan* , 35(4): 1060-1065
 - [76] Qu, F., Qi, Z. H., Liu, K. N., and Mou, S. F. (1999). Determination of aspartame by ion chromatography with electrochemical integrated amperometric detection. *Journal of chromatography A*, 850(1): 277-281.
 - [77] Chen, Q. C., and Wang, J. (2004). Simultaneous determination of artificial sweeteners, preservatives, caffeine, theobromine and theophylline in food and pharmaceutical preparations by ion chromatography. *Journal of Chromatography A*, 937(1): 57-64.
 - [78] Y. Nakaie, T. Yogi, K. Khakei, D. Inoue, H. Hirose, S. Haschimot and Y. Tonogai, *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* 40 (2000): 223

- [79] Pesek, J. J., and Matyska, M. T. (1997). Determination of aspartame by high-performance capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 781(1): 423-428.
- [80] Walker, J. C., Zaugg, S. E., and Walker, E. B. (1997). Analysis of beverages by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 781(1):481-485.
- [81] McCourt, J., Stroka, J., and Anklam, E. (2005). Experimental design-based development and single laboratory validation of a capillary zone electrophoresis method for the determination of the artificial sweetener sucralose in food matrices. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 382(5):1269-1278.
- [82] Fernandes V.N.O., Fernandes L.B., Vasconcellos J.P., Jager V., Tonin F.G. and Oliveria M., (2013) , “ Simultaneous analysis of aspartame, cyclamate, saccharin and acesulfame- K by CZE under UV detection”, *Anal. Methods* , 5:1524-1532
- [83] R.A.Frazier ,E.L.Inns,N.Dosi,J.M.Ames, andH.E.Nursten,(2000), Development of a capillary electrophoresis method for the simultaneous analysis of artificial sweeteners, preservatives and colours in soft drinks, *Journal of Chromatography A*, 876 (2000): 213
- [84] Bergamo A.B., Silva J.A., and Jesus D.P., (2011) “Simultaneous determination of aspartame, cyclamate, saccharin and acesulfame-K in soft drinks and tabletop sweetener formulations by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection” *Food Chemistry*, 124(5):1714-1717
- [85] Fatibello-Filho, O., Marcolino-Junior, L. H., and Pereira, A. V. (1999). Solid-phase Reactor with copper (II) phosphate for flow-injection spectrophotometric determination of aspartame in tabletop sweeteners, *Analytica chimica acta*, 384(2): 167-174
- [86] Capitan-Vallvey, L. F., Valencia, M. C., and Nicolás, E. A. (2004). Flow-through spectrophotometric sensor for the determination of aspartame in low-calorie and dietary products. *Analytical sciences*, 20(10): 1437-1442.
- [87] García-Jiménez, J. F., Valencia, M. C., and Capitán-Vallvey, L. F. (2006). Improved Multianalyte Determination of the Intense Sweeteners Aspartame and Acesulfame-K with a Solid Sensing Zone Implemented in an FIA Scheme. *Analytical letters*, 39(7) :1333-1347.
- [88] García-Jiménez, J. F., Valencia, M. C., and Capitán-Vallvey, L. F. (2007). Simultaneous determination of antioxidants, preservatives and sweetener additives in food and cosmetics by flow injection analysis coupled to a monolithic column. *Analytica chimica acta*, 594(2): 226-233.
- [89] Tatlandırıcılar, <http://hbogm.meb.gov.tr/modulerprogramlar/kursprogramlari/gida/moduller/GidalardaEnstrumantalAnalizler1.pdf>, 24 Mayıs 2013
- [90] Tatlandırıcılar, <http://www.innovatekoloji.com>, 9 Şubat 2013
- [91] Tatlandırıcılar, www.mevzuat.gov.tr/ , 12 Nisan 2013
- [92] Tatlandırıcılar , <http://biyokure.org/uv-gorunur-bolge-spektroskopisi/5276>, 07 Haziran 2013
- [93] Topsoy H., (1998). Ankara Piyasasında Satılan Bazı Şeker ve Şekerli Gıda Maddelerine Katılan Gıda Boyalarının Türev Spektroskopi Yöntemi İle Kantitatif Tayini, Doktora Tezi, Ankara Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Besin

Hijyeni ve Teknolojisi Ana Bilim Dalı,Ankara.

- [94] Tatlandırıcılar, <http://www.bogamedikal.com/helma.ht>, 25 Temmuz 2013
- [95] Kalibrasyon Eğrisi Oluşturma, Milli Eğitim Bakanlığı Ortaöğretim Projesi, Ankara, 2010
- [96] Akgün,M.K.,(2001). Gıda Boyalarının Türev Spektrofotometrik Yöntem ile Tayini, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniv. Fen Bilimleri Enstitüsü,İstanbul.
- [97] Tatlandırıcılar, <http://www.belgeler.com/blg/m33/coklu-ilac-karisimlarinda-etken-madde-kantitatif-tayinleri-icin-metod-gelistirme-comparative-study-of-electrospray-mass-spectrometry-and-first-derivative-method-and-validation-by-hplc-method>, 14 Mayıs 2013
- [98] Hussein,G., and Peter A.i (2005). “Simultaneous Determination of Sudan Dyes and Carotenoids in Red Pepper and Tomato Products by HPLC ” Journal of Chromatographic Science, 43(9):461-465
- [99] Akdağ i.(2006). “ISO 17025 Laboratuvar Akreditasyonu Teknik Kriterleri ”.
- [100] Tatlandırıcılar, www.kimyaevi.org,25 ,Nisan 2013
- [101] Ertaş,Ö., ve Kayalı ,A.,(2005). “ Analitik Yöntem Geçerliliğine Genel Bir Bakış , Ankara Ecz.Fak.Derg. ” 34(1):41-57
- [102] Tatlandırıcılar, http://www.bayar.edu.tr/besergil/eak_6_kalibrasyon.pdf, 14 Nisan 2013

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : HANDAN ALTUN
Doğum Tarihi ve Yeri : 02.06.1985 İstanbul
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : handanaltun@hotmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul / Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Kimya	Yıldız Teknik Üniversitesi	2014
Lisans	Kimya	Çanakkale 18 Mart Üniversitesi	2009
Lise	Fen	75.Yıl Cumhuriyet Lisesi (Süper Lise-YDA)	2004

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2011 (Devam)	Adnan Akat Kozmetik	Proje ve Satınalma/İthalat Uzmanı
2010	Tepecik Lisesi	Kimya Öğretmeni
2009	Sora Kozmetik San. Tic. A.Ş.	Kalite Kontrol Sorumlusu
2007	Abdi İbrahim İlaç Sanayi	Stajyer

Proje

- 1.TÜBİTAK(7110446) -Farklı Doğal Yağlardan Oluşan Karışımın Saç üzerindeki Etkileri
- 2.TÜBİTAK(7120227)-SPF 15 Faktörlü Güneş Kreminin Doğal Hammaddeler Kullanılarak Geliştirilmesi ve Kullanım Ömrünün Arttırılması