T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARMASÖTİK PREPARATLARDA ZENGİNLEŞTİRME YÖNTEMİ UYGULAYARAK GIDA BOYALARININ SPEKTROFOTOMETRİK VE HPLC YÖNTEMLERİ İLE ANALİZLERİ

MERVE DELMİDAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
ANORGANİK KİMYA PROGRAMI

DANIŞMAN
PROF. DR. MAHMURE ÜSTÜN ÖZGÜR

İSTANBUL, 2015

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARMASÖTİK PREPARATLARDA ZENGİNLEŞTİRME YÖNTEMİ UYGULAYARAK GIDA BOYALARININ SPEKTROFOTOMETRİK VE HPLC YÖNTEMLERİ İLE ANALİZLERİ

MERVE DELMİDAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
ANORGANİK KİMYA PROGRAMI

DANIŞMAN
PROF. DR. MAHMURE ÜSTÜN ÖZGÜR

İSTANBUL, 2015

Bu çalışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nün 2013-01-02-YL03 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Lisans bitirme ve Yüksek lisans tez çalışmalarım süresince her türlü kolaylığı sağlayan, bana yol gösteren, bilgi ve desteğini esirgemeyen değerli hocam, tez danışmanım Prof.Dr. Mahmure Üstün Özgür'e,

Deneysel çalışmalarım boyunca bana her konuda yardımcı olan ve desteğini esirgemeyen arkadaşım Uzm. Öznur Dülger Kutlu'ya,

Hayatım boyunca başarılarımda ve başarısızlıklarımda her zaman yanımda duran, maddi manevi her türlü desteği veren annem Filiz Delmidan, babam Rıza Delmidan'a,

Hayatımda önemli yerleri olan doğrularımı ve yanlışlarımı bana göstermeye çalışan ve her zaman yanımda olan ablam İrem Çalışkan, eniştem Caner Çalışkan ve Eylül 2014'te bize gülümseyip neşe kaynağımız olan Derin Çalışkan'a,

Üniversite hayatımda ilk tanıştığım andan itibaren iyi kötü her anımda benimle beraber sevinen, üzülen dostum Asude Pınar Koçhan'a,

Lisans hayatımdan beri her daim yanımda olup bana destek veren, kendimi iyi hissetmemi sağlayan dostum Cemre Bilal'e,

Lisede hayatıma giren ve beni her zaman neşelendiren, moral veren dostum Merve Karaoğlu'na,

Yüksek lisans ile hayatıma giren, bu süreçte bana destek veren arkadaşlarım Çağıl Çakırkoçak ve Saniye Akdaş'a,

İlk çalışma hayatımda bana destek veren ve beni en iyi şekilde anlayan arkadaşım Aslı Erşahin'e,

Sonsuz Teşekkürler...

Aralık, 2015

Merve DELMİDAN

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGE LİSTESİ ix

KISALTMA LİSTESİ x

ŞEKİL LİSTESİ xi

ÇİZELGE LİSTESİ xiv

ÖZET xvi

ABSTRACT xviii

BÖLÜM 1

GİRİŞ 1

1.1 Literatür Özeti 1
1.2 Tezin Amacı 1
1.3 Hipotez 2

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİ 3

2.1 Gıda Katkı Maddesi 3
2.1.1 Gıda Katkı Maddeleri ile İlgili Yasal Düzenlemeler 3
2.1.2 Gıda Katkı Maddeleri ile İlgili Güvenlik Testleri 4
2.1.3 E Kodu 5
2.2 Renklendiriciler 5
2.2.1 Gıdalarda ve Farmasötiklerde Rengin Önemi 6
2.2.2 Renklendiricilerin Sınıflandırılması 6
2.2.2.1 Doğal Renklendiriciler 7
2.2.2.1.1 Organik Doğal Renklendiriciler 8
2.2.2.1.2 İnorganik Doğal Renklendiriciler 9
2.2.2.2 Sentetik Renklendiriciler 10
2.2.2.2.1 Suda Çözünen Sentetik Renklendiriciler 11
2.2.2.2.2 Yağda Çözünen Sentetik Renklendiriciler 12

2.2.2.2.3 Lake Renklendiriciler 12
2.2.3 Avrupa Birliğinde Gıda Renklerinin Düzenlenmesi 13
2.2.4 Renklendiricilerin Numaralandırılması 13
2.2.5 Besinlere ve Farmasötiklere Katılacak Renklendirici Miktarının Belirlenmesi 14
2.2.6 Çalışmada Kullanılan Renklendiriciler Hakkında Genel Bilgi 16
2.2.6.1 Kinolin Sarısı 16
2.2.6.2 Eritrosin 17
2.2.6.3 Indigotin 17
2.2.7 Renklendiricilerin Etkileri 18
2.2.8 Sentetik Renklendiricilerin Analiz Yöntemleri 19
2.2.8.1 Kalitatif Analiz Yöntemleri 19
2.2.8.1.1 Yün Boyama Tekniği 20
2.2.8.1.2 İnce Tabaka Kromotografi Tekniği ve Uygulanması 20
2.2.8.2 Kantitatif Tayin Yöntemleri 21
2.2.8.2.1 Spektrofotometrik Yöntemler 21
2.2.8.2.2 Kromotografik Yöntemler 29
2.2.8.2.3 Diğer Yöntemler 31
2.2.9 Kullanılan Yöntemler 32
2.2.9.1 Bulutlanma Noktası Ekstraksiyonu Sonrası Türev Spektrofotometrisi 32
2.2.9.1.1 Bulutlanma Noktası Ekstraksiyonu 32
2.2.9.1.1.1 Bulutlanma Noktasına Ekstraksiyonu Yöntemindeki Bazı Kavramlar 32
2.2.9.1.1.2 Misel Ortam Özütleme Metodu 36
2.2.9.1.1.2.1 Misel Ortam Özütleme Metodu Uygulanışı ve Kullanım Alanları 36
2.2.9.1.1.3 Konsantrasyon Faktörü (CF) 37
2.2.9.1.1.4 Bulutlanma Noktası Ekstraksiyonu ve Önemi 37
2.2.9.1.1.5 Bulutlanma Noktası Ekstraksiyonuna Etki Eden Faktörler 38
2.2.9.1.1.5.1 Sürfaktan seçimi 38
2.2.9.1.1.5.2 Ortamın pH değeri 39
2.2.9.1.1.5.3 Yüzey aktif madde konsantrasyonu 39
2.2.9.1.1.5.4 Bekleme süresi ve sıcaklık 40
2.2.9.1.1.5.5 İyonik güç 41
2.2.9.1.1.5.6 Faz Ayırımı Kolaylaştırıcı Katkı Maddeleri 41
2.2.9.1.1.6 Bulutlanma Noktası Ekstraksiyonu Yönteminin Uygulanışı 41
2.2.9.1.1.7 Bulutlanma Noktası Ekstraksiyonunun Temel Basamakları 43

2.2.9.1.1.8 Bulutlanma Noktası Ekstraksiyonu Metodunda Modifiye Sistemler Oluşturulması 44
2.2.9.1.1.9 Tayin Yöntemi 46
2.2.9.1.1.10 CPE Yönteminin Avantajları ve Dezavantajları.....46
2.2.9.1.2 Türev Spektrofotometrik Yöntem 48
2.2.9.1.2.1 Giriş.....48
2.2.9.1.2.2 Türev Spektrumlarının Değerlendirilmesi 50
2.2.9.1.2.3 UV-VIS Türev Spektroskopisinin Uygulama Alanları 51
2.2.9.1.2.4 Türev Spektroskopisinin Avantajları ve Dezavantajları ..52
2.2.9.2 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi 53
2.2.9.2.1 HPLC Sistemleri 53
2.2.9.2.2 Normal Faz Kromatografisi 56
2.2.9.2.3 Ters Faz Kromatografisi 56
2.2.9.2.4 HPLC Kullanım Alanları 57
2.2.9.2.5 Kromatografik Verimi Etkileyen Faktörler.....57
2.2.9.2.5.1 Bant Genişliği ve Önemi.....57
2.2.9.2.5.2 Kolon Uzunluğu, Parçacık Boyutu ve Teorik Plaka Sayısının Etkisi 58
2.2.9.2.5.3 Küçük Parçacık Boyutunun Ayrışmaya Etkisi 59
2.2.9.2.5.4 Ayrışma, Etkinlik ve Parçacık Boyutu Arasındaki İlişki....60
2.2.9.2.6 Van Deemter Eğrileri 61
2.2.9.2.7 Performansın Arttırılması 64
2.2.9.2.7.1 Sistem Basıncı.....64
2.2.9.2.7.2 Sıcaklığın Yükseltilmesi 64
2.2.9.2.7.3 Kolon Parçacık Boyutu ve Uzunluğu Oranı (L/dp) 65
2.2.10 Validasyon 65
2.2.10.1 Özgünlük 66
2.2.10.2 Doğrusallık 66
2.2.10.3 Konsantrasyon Aralığı 66
2.2.10.4 Doğruluk 67
2.2.10.4.1 Standart ile karşılaştırma.....67
2.2.10.4.2 Geri kazanım 67
2.2.10.4.3 Standart katma yöntemi 67
2.2.10.5 Kesinlik.....67
2.2.10.6 Dedeksiyon Limiti 68
2.2.10.7 Kantitatif Tayin Limiti 68
2.2.10.8 Standart Katma Yöntemi (SK) 69

BÖLÜM 3

DENEYSEL BÖLÜM 71

3.1 Bulutlanma Noktası Ekstraksiyonu Yöntemi 71
3.1.1 Maddeler ve Çözücüler 71
3.1.2 Çözeltiler 71
3.1.3 Gereçler 72
3.1.4 Çalışma Yöntemi 72
3.1.5 Çalışma Koşullarının Belirlenmesi 72
3.1.5.1 Tuz Cinsi ve Konsantrasyonu Parametrelerinin Belirlenmesi 73
3.1.5.2 Sıcaklık ve Zaman Parametrelerinin Belirlenmesi 74
3.1.5.3 Triton X-100 Konsantrasyonu Parametresinin Belirlenmesi 76
3.1.5.4 CTAB Konsantrasyonu Parametresinin Belirlenmesi 78
3.1.5.5 pH Değerinin Belirlenmesi 78
3.1.6 Ölçü Eğrilerinin Oluşturulması 80
3.1.7 Yöntemin Numunelere Uygulanması 85
3.1.8 Validasyon Çalışmaları 91
3.1.8.1 Geri Kazanım Çalışmaları 91
3.1.8.2 Gün İçi ve Gün Aşırı Tekrarlanabilirlik 91
3.1.8.3 Tayin Limiti (LOD) ve Ölçüm Limiti (LOQ) 92
3.1.8.4 Standart Katma 93
3.2 HPLC Yöntemi 97
3.2.1 Maddeler ve Çözücüler 97
3.2.2 Çözeltiler 97
3.2.3 Gereçler 98
3.2.4 Çalışma Yöntemi 98
3.2.5 Ölçü Eğrilerinin Oluşturulması 99
3.2.6 Yöntemin Numunelere Uygulanması 104

BÖLÜM 4

SONUÇ VE ÖNERİLER 107

KAYNAKLAR 110

ÖZGEÇMİŞ 117

SİMGE LİSTESİ

C	Konsantrasyon
dp	Parçacık boyutu
Fopt	Optimum akış hızı
HETP	Yükseklik eşdeğer teorik plaka
ID	Kolon iç çapı
k	Alıkonma faktörü
L	Kolon uzunluğu
LOD	Deteksiyon limiti
LOQ	Kantitatif tayin limiti
N	Teorik plaka sayısı
Rs	Ayrışma
RSD	Bağıl standart sapma
S	Standart sapma
T	Analiz süresi
w	Pik genişliği
λ_{max}	Maksimum dalga boyu
α	Seçicilik faktörü

KISALTMA LİSTESİ

AB	Avrupa Birliği
ADI	Kabul Edilebilir Günlük Miktar
CAC	Uluslararası Gıda Kodeks Komisyonu
CC	Kolon Kromatografisi
CF	Konsantrasyon Faktörü
CLS	Classical Least Squares
CMC	Kritik Misel Konsantrasyonu
CP	Cloud Point, Bulutlanma Noktası
CPE	Cloud Point Extraction, Bulutlanma Noktası Ekstraksiyonu
CTAB	Setil Trimetilamonyum Bromür
E	Erythosine, Eritrosin, E127
EC	Avrupa Komisyonu
EFSA	Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
FAO	Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
FDA	Gıda ve İlaç Dairesi
GC	Gaz Kromatografisi
GMP	İyi Üretim Uygulamaları
HPLC	Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi
IC	Indigotine, İndigotin, E132
ICP-OES	Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry
ITTFA	Iterative Target Transformation Factor Analysis
JECFA	Birleşik Gıda Katkı Uzman Komitesi
LD50	Orta Derece Letal Doz
NOAEL	Gözlenebilen Hiç Bir Yan Etki Göstermeyen Doz
PC	Kağıt Kromatografisi
PCR	Principal Component Regression
PLS	Partial Least Squares
QY	Quinoline Yellow, Kinolin Sarısı, E104
SCF	Bilimsel Gıda Komitesi
TGKY	Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği
TLC	İnce Tabaka Kromatografisi
UV/VIS	Ultraviolet/Visible
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2. 1 Kinolin sarısı molekül formülü 17
Şekil 2. 2 Eritrosin molekül formülü 17
Şekil 2. 3 İndigotin molekül formülü....18
Şekil 2. 4 Çözelti ortamında misel yapısı [52]....33
Şekil 2. 5 Misel yapısı açık formülü gösterimi [54] 33
Şekil 2. 6 Misel yapısı kapalı formülü gösterimi [54] 34
Şekil 2. 7 Kritik misel konsantrasyonunu asan misel monomerlerinin çözelti içerisinde öbeklenmesi [57]....35
Şekil 2. 8 Misel ortam özütleme metodu [57]....37
Şekil 2. 9 Triton RW-150 isimli yüzey aktif maddesi üzerinde pH etkisi 39
Şekil 2. 10 Arayüzde hidrofilik yapılarla suyun (hidrofobik yapı) sterik engel oluşturması 41
Şekil 2. 11 Bulutlanma noktası ekstraksiyonunun uygulanışı [67] 42
Şekil 2. 12 Metallerin zenginleştirilmesinde bulutlanma noktası ekstraksiyonu işlemi akış şeması [68]....43
Şekil 2. 13 Kantitatif analizler için türev spektrumlarını değerlendirme yöntemleri (t: tanjant yöntemi, P: pik-pik yöntemi, Z: pik sıfır yöntemi) 50
Şekil 2. 14 Yüksek performanslı sıvı kromatografisi sisteminin şematik gösterimi....54
Şekil 2. 15 Teorik plakanın (N) teorik gösterimi 58
Şekil 2. 16 Alıkonma, seçicilik ve plaka sayısı değişimlerinin ayrışmaya etkileri....60
Şekil 2. 17 Eddy Difüzyon 62
Şekil 2. 18 Longitudinal Difüzyon....62
Şekil 2. 19 Bant genişliğinde, kütle transfer ve parçacık boyutu ilişkisi 63
Şekil 2. 20 Analit molekülünün kolon içinde ilerleme tipleri 63
Şekil 3. 1 IC, QY ve E'nin CPE ile kantitatif tayininde NaCl konsantrasyonunun etkisi 74
Şekil 3. 2 IC'nin CPE ile kantitatif tayininde farklı sıcaklık ve inhibüsyon süresinin etkisi 75
Şekil 3. 3 QY'nin CPE ile kantitatif tayininde farklı sıcaklık ve inhibüsyon süresinin etkisi 76
Şekil 3. 4 E'nin CPE ile kantitatif tayininde farklı sıcaklık ve inhibüsyon süresinin etkisi 76

Şekil 3. 5 IC, QY ve E'nin CPE ile kantitatif tayininde Triton X-100 konsantrasyonunun etkisi 77
Şekil 3. 6 IC, QY ve E'nin CPE ile kantitatif tayininde CTAB konsantrasyonunun etkisi 78
Şekil 3. 7 IC, QY ve E'nin CPE ile kantitatif tayininde farklı pH (sitrat tamponu) değerlerinin etkisi 79
Şekil 3. 8 IC, QY ve E'nin CPE ile kantitatif tayininde tampon çözeltinin (pH=2,5 sitrat tamponu) miktarının etkisi 80
Şekil 3. 9 CPE yönteminde Eritrosin'e ait ölçü eğrisi 81
Şekil 3. 10 Eritrosin'in 1-6 µg/mL konsantrasyonlarında alınan birinci türev absorpsiyon spektrumları....82
Şekil 3. 11 CPE yönteminde İndigotin'e ait ölçü eğrisi....83
Şekil 3. 12 İndigotin'in 0,3-1,8 µg/mL konsantrasyonlarında alınan birinci türev absorpsiyon spektrumları....83
Şekil 3. 13 CPE yönteminde Kinolin Sarısı'na ait ölçü eğrisi....84
Şekil 3. 14 Kinolin Sarısı'nın 1-6 µg/mL konsantrasyonlarında alınan birinci türev absorpsiyon spektrumları....85
Şekil 3. 15 (a) E'nin(4µg/mL), QY'nin(3µg/mL), IC'nin(1,2µg/mL), boya karışımının (3µg/mL E+4µg/mL QY+1,8µg/mL IC) ve numunelerin absorpsiyon spektrumları (b) E'nin(4µg/mL), QY'nin(3µg/mL), IC'nin(1,2µg/mL), boya karışımının (3µg/mL E+4µg/mL QY+1,8µg/mL IC) ve numunelerin birinci türev absorpsiyon spektrumları....85
Şekil 3. 16 Eritrosin (4µg/mL) ve Alfoxil'e ait birinci türev absorpsiyon spektrumları....86
Şekil 3. 17 Kinolin Sarısı (4µg/mL) ve TheraFlu'a ait birinci türev absorbsiyon spektrumları....87
Şekil 3. 18 Indigotin (1,8µg/mL) ve Aleve'ye ait birinci türev absorpsiyon spektrumları....88
Şekil 3. 19 Kinolin Sarısı (4µg/mL), Indigotin (1,8µg/mL) ve Emedur'a ait birinci türev absorpsiyon spektrumları....89
Şekil 3. 20 Kinolin Sarısı (5µg/mL), Indigotin (1,8µg/mL), Eritrosin(4µg/mL) ve Ferro Sanol Duodenal'a ait birinci türev absorpsiyon spektrumları 90
Şekil 3. 21 Yalnızca E içeren Alfoxil şuruba uygulanan standart katma çalışmaları 93
Şekil 3. 22 Yalnızca QY içeren TheraFlu tabletlere uygulanan standart katma çalışmaları....94
Şekil 3. 23 Yalnızca IC içeren Aleve tabletlere uygulanan standart katma çalışmaları.94
Şekil 3. 24 QY ve IC içeren Emedur tabletlere QY katılarak uygulanan standart katma çalışmaları....95
Şekil 3. 25 QY ve IC içeren Emedur tabletlere IC katılarak uygulanan standart katma çalışmaları....95
Şekil 3. 26 E, QY ve IC içeren Ferro Sanol Duodenal kapsüllere E katılarak uygulanan standart katma çalışmaları 96
Şekil 3. 27 E, QY ve IC içeren Ferro Sanol Duodenal kapsüllere QY katılarak uygulanan standart katma çalışmaları 96
Şekil 3. 28 E, QY ve IC içeren Ferro Sanol Duodenal kapsüllere IC katılarak uygulanan standart katma çalışmaları 97

Şekil 3. 29 HPLC yönteminde 2,5-12,5 µg/mL konsantrasyon aralığında E'ye ait kalibrasyon grafiği 100
Şekil 3. 30 E'nin 2,5-12,5 µg/mL konsantrasyonları için alınan HPLC kromatogramları.... 100
Şekil 3. 31 HPLC yönteminde 0,2-1 µg/mL konsantrasyon aralığında IC'ye ait kalibrasyon grafiği 101
Şekil 3. 32 IC'nin 0,2-1 µg/mL konsantrasyonları için alınan HPLC kromatogramları.102
Şekil 3. 33 HPLC yönteminde 2,5-12,5 µg/mL konsantrasyon aralığında QY'ye ait kalibrasyon grafiği 103
Şekil 3. 34 QY'nin 2,5-12,5 µg/mL konsantrasyonları için alınan HPLC kromatogramları..... 103

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2. 1 Gıda katkı maddelerinin E kodları 5
Çizelge 2. 2 Organik doğal renklendiriciler hakkında genel bilgi[7] 8
Çizelge 2. 3 İnorganik doğal renklendiriciler hakkında genel bilgi[7] 9
Çizelge 2. 4 Gıda, ilaç ve kozmetikte en çok kullanılan suda çözünen sentetik renklendiriciler ve renk kodları[9] 11
Çizelge 2. 5 Gıda, ilaç ve kozmetik ürünlerinde kullanımına izin verilen gıda renklendiricileri[3] 14
Çizelge 2. 6 Kullanımına izin verilen ve ülkemizde en çok kullanılan renklendiricilerin ADI miktarları[3] 15
Çizelge 2. 7 Yüzey aktif madde çeşitleri [56] 34
Çizelge 2. 8 Bazı noniyonik yüzey aktif maddelerin CP değerlerindeki değişmeler[69].. 44
Çizelge 2. 9 UV-VIS türev spektroskopisinin uygulama alanları 51
Çizelge 3. 1 IC, QY ve E'nin CPE ile kantitatif tayininde NaCl konsantrasyonunun etkisi 73
Çizelge 3. 2 IC, QY ve E'nin CPE ile kantitatif tayininde farklı sıcaklık ve inhibüsyon süresinin etkisi 75
Çizelge 3. 3 IC, QY ve E'nin CPE ile kantitatif tayininde Triton X-100 konsantrasyonunun etkisi.....77
Çizelge 3. 4 IC, QY ve E'nin CPE ile kantitatif tayininde CTAB konsantrasyonunun etkisi 78
Çizelge 3. 5 IC, QY ve E'nin CPE ile kantitatif tayininde farklı pH (sitrat tamponu) değerlerinin etkisi.....79
Çizelge 3. 6 IC, QY ve E'nin CPE ile kantitatif tayininde tampon çözeltinin (pH=2,5 sitrat tamponu) miktarının belirlenmesi 80
Çizelge 3. 7 Eritrosinin CPE yöntemi ile ekstraksiyonunda elde edilen birinci türev absorbans (D^1_{497}) ve bağıl standart sapma değerleri.....81
Çizelge 3. 8 İndigotinin CPE yöntemi ile ekstraksiyonunda elde edilen birinci türev absorbans (D^1_{637}) ve bağıl standart sapma değerleri.....82
Çizelge 3. 9 Kinolin Sarısının CPE yöntemi ile ekstraksiyonunda elde edilen birinci türev absorbans (D^1_{408}) ve bağıl standart sapma değerleri.....84
Çizelge 3. 10 Alfoxil şurupta E'nin CPE yöntemine göre kantitatif analiz sonuçları.....86
Çizelge 3. 11 TheraFlu Forte tablette QY'nin CPE yöntemine göre kantitatif analiz sonuçları 87
Çizelge 3. 12 Aleve tablette IC'nin CPE yöntemine göre kantitatif analiz sonuçları 88

Çizelge 3. 13 Emedur tablette QY ve IC'nin CPE yöntemine göre kantitatif analiz sonuçları 89
Çizelge 3. 14 Ferro Sanol Duodenal kapsülde E, QY ve IC'nin CPE yöntemine göre kantitatif analiz sonuçları 90
Çizelge 3. 15 Karışım çözeltilerde Eritrosin, İndigotin ve Kinolin sarısına ait % geri kazanım değerleri.....91
Çizelge 3. 16 Çalışılan boyalarda gün içi çalışmaları sonucunda elde edilen standart sapma ve bağıl standart sapma değerleri 92
Çizelge 3. 17 Çalışılan boyalarda gün aşırı çalışmaları sonucunda elde edilen standart sapma ve bağıl standart sapma değerleri 92
Çizelge 3. 18 IC, QY ve E'ye ait LOD (tayin limiti) ve LOQ (ölçüm limiti) değerleri.....92
Çizelge 3. 19 Yalnızca E içeren Alfoxil şuruba uygulanan standart katma çalışmaları sonunda elde edilen % verim değerleri.....93
Çizelge 3. 20 Yalnızca QY içeren TheraFlu tabletlere uygulanan standart katma çalışmaları sonucunda elde edilen % verim değerleri.....93
Çizelge 3. 21 Yalnızca IC içeren Aleve tabletlere uygulanan standart katma çalışmaları sonucunda elde edilen % verim değerleri 94
Çizelge 3. 22 QY ve IC içeren Emedur tabletlere uygulanan standart katma çalışmaları sonucunda elde edilen % verim değerleri 95
Çizelge 3. 23 E, QY ve IC içeren Ferro Sanol Duodenal kapsüllere uygulanan standart katma çalışmaları sonucunda elde edilen % verim değerleri 96
Çizelge 3. 24 Gradient sistem için zamana bağlı çözücü oranları 98
Çizelge 3. 25 HPLC yönteminde E'ye ait 20,490. dk 'da çıkan pik alanları ve bağıl standart sapma değerleri 99
Çizelge 3. 26 HPLC yönteminde IC'ye ait 7,933. dk'da çıkan pik alanları ve bağıl standart sapma değerleri 101
Çizelge 3. 27 HPLC yönteminde QY'ye ait 9,864. dk'da çıkan pik alanları ve bağıl standart sapma değerleri 102
Çizelge 3. 28 Alfoxil şurupta E'nin HPLC yöntemine göre kantitatif analiz sonuçları.104
Çizelge 3. 29 TheraFlu Forte tabletlerde QY'nin HPLC yöntemine göre kantitatif analiz sonuçları 105
Çizelge 3. 30 Aleve tabletlerde IC'nin HPLC yöntemine göre kantitatif analiz sonuçları.....105
Çizelge 3. 31 Emedur tabletlerde QY ve IC'nin HPLC yöntemine göre kantitatif analiz sonuçları 106
Çizelge 3. 32 Ferro Sanol Duodenal kapsüllerde E, QY ve IC'nin HPLC yöntemine göre kantitatif analiz sonuçları 106
Çizelge 4. 1 Farmasötik preparatlarda bulunan renklendiricilerin CPE sonrası uygulanan türev spektrofotometrik ve HPLC yöntemleri ile kantitatif tayin sonuçları.....108
Çizelge 4. 2 Farmasötik preparatlarda bulunan renklendiricilerin CPE sonrası uygulanan türev spektrofotometrik ve HPLC yöntemleri ile kantitatif tayinlerine uygulanan t ve F testi değerleri.....109
Çizelge 4. 3 Farmasötik preparatlarda bulunan renklendiricilerin CPE sonrası uygulanan türev spektrofotometrik ve HPLC yöntemleri ile kantitatif tayinlerine uygulanan ADI miktarı değerleri.....109

ÖZET

FARMASÖTİK PREPARATLARDA ZENGİNLEŞTİRME YÖNTEMİ UYGULAYARAK GIDA BOYALARININ SPEKTROFOTOMETRİK VE HPLC YÖNTEMLERİ İLE ANALİZLERİ

Merve DELMİDAN

Kimya Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Prof.Dr.Mahmure ÜSTÜN ÖZGÜR

Sentetik renklendiriciler gıda, ilaç, kozmetik ve benzeri sektörlerde tüm dünyada kullanılmaktadır. Düşük fiyatları, yüksek etkinlikleri ve iyi stabiliteleri nedenleriyle sentetik renklendiriciler yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu maddelerin ürünlerde kullanılan dozları insan sağlığı için risk oluşturmaktadır. Aynı zamanda bazı ilaçlarda kullanılan renklendiriciler, astım ve alerjik reaksiyonlara neden olmaktadır.

Bu çalışmada farklı farmasötik preparatlarda bulunan Eritrosin, İndigotin ve Kinolin sarısı renklendiricilerinin spektrofotometrik tayini için CTAB ve Triton X-100'ün karışmış misellerini kullanarak bulutlanma noktası ekstraksiyonu yöntemi uygulandı. Bulutlanma noktası ekstraksiyonunda; sürfaktanların konsantrasyonları, tuz konsantrasyonu, pH, sıcaklık ve zaman gibi farklı parametrelerin renklendiricilerin ekstraksiyonu üzerindeki etkisi araştırıldı ve optimum koşullar sağlandı. Ekstrakte edilen sürfaktanca zengin faz asetonla seyreltilerek 1-6 µg/mL E, 1-6 µg/mL QY ve 0,3-1,8 µg/mL IC konsantrasyonlarındaki renklendiricilerin sırasıyla 497, 408 ve 637 nm'de UV-Vis Spektrofotometresi yardımıyla birinci türev absorbans değerleri okundu ve doğrusal kalibrasyon eğrileri elde edildi. Yöntem; seçicilik, doğrusallık, duyarlık, kesinlik, belirleme ve ölçme limitleri (LOD ve LOQ) dikkate alınarak doğrulandı. Her bir renklendirici için ayrı ayrı LOD ve LOQ değerleri; sırasıyla E için 0,031 µg/mL ve 0,103

µg/mL, QY için 0,057 µg/mL ve 0,190 µg/mL, IC için 0,048 µg/mL ve 0,160 µg/mL arasında çeşitlilik gösterdi.

Bulutlanma noktası ekstraksiyonu yöntemiyle elde edilen sonuçlar, diğer geliştirilen yöntem olan HPLC yöntemi ile elde edilen sonuçları ile kıyaslanarak test edildi. Sabit faz olarak C_{18} ve mobil fazlar olarak ise asetonitril-metanol (1:1, v/v) karışımı ve pH 7 olan 0,1 M amonyum asetat çözeltisi kullanıldı. 30 dk içerisinde gradient elüsyonla karışımların başarılı ayrımı sağlandı. 350-800 nm arasında renklendiricileri izlemek için diode-array dedektörü kullanıldı.

Yöntemlerden elde edilen bulgular doğruluk ve kesinlik yönünden t ve F testleri yardımıyla %95 güvenirlik düzeyinde istatiksel olarak karşılaştırıldı ve uygulanan yöntemler değerlendirildi. F değerleri ilgili güven düzeyi ve üç deneme için verilen tablo değerlerinden küçük bulunarak ilgili güven düzeyi için verilen tablolardaki sınır değerleri içerisinde olduğu görülmüştür. t değerleri ilgili güven düzeyi ve üç deneme için verilen tablo değerlerinden büyük bulunarak ilgili güven düzeyi için verilen tablolardaki sınır değerlerini aşmış olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Sentetik Renklendiriciler, Eritrosin (E), Kinolin Sarısı (QY), İndigotin (IC), Bulutlanma Noktası Ekstraksiyonu, CTAB, Triton X-100, Spektrofotometre, Farmasötik Preparat, HPLC, Diode-Array Dedektörü

ABSTRACT

DETERMINATION OF FOOD COLORANTS IN PHARMACEUTICALS BY ENRICHMENT PRIOR TO SPECTROPHOMETRIC AND HPLC METHODS

Merve DELMİDAN

Department of Chemistry

MSc. Thesis

Adviser: Prof.Dr.Mahmure ÜSTÜN ÖZGÜR

Synthetic colorants are used worldwide in food, medicine, cosmetics, etc. Many of their kind are widely used because of their low price, high effectivity, and good stability. Some of these substances doses a potential risk to human health and, in contact with some drugs, they can cause allergic and asthmatic reactions.

A cloud point extraction process using micelles of CTAB and Triton X-100 for preconcentration and spectrophotometric determination of Erythrosine, Quinoline Yellow and Indigotine in pharmaceuticals was developed. The effect of different parameters such as concentration of surfactant, salt concentration, pH, temperature and incubation time on the cloud point extraction of colorants were studied in detail and set of optimum conditions were established. The extracted surfactant rich phase is diluted with acetone and its first derivative absorbance value is measured at 497 nm for E, 408 nm for QY and 637 nm for IC by a spectophotometer. A lineer calibration curve in the range of 1-6 μg/mL of E, 1-6 μg/mL of QY and 0,3-1,8μg/mL of IC were obtained. The method was validated as regards its selectivity, linearity, precision, accuracy, limit of detection (LOD) and quantification (LOQ). LOD values of colorants were 0,031 μg/mL for E, 0,057 μg/mL for QY and 0,048 μg/mL for IC. In the case of LOQ values of colorants were 0,103 μg/mL for E, 0,190 μg/mL for QY and 0,160 μg/mL for IC.

Results of cloud point extraction were tested by comparing the results with the other developed process of HPLC. A C_{18} stationary phase was used and the mobile phase contained acetonitrile-methanol (1:1, v/v) mixture and 0,1 M ammonium acetate buffer solution at pH 7. Successful separation was obtained for all the compounds using an optimized gradient elution within 30 min. The diode-array detector was used to monitor the colorants between 350-800 nm.

Two separate methods; spectrophotometric and HPLC methods for the determination of the colorants (E, QY and IC) were developed and in terms of accuracy and precision of the findings of these methods were compared with 95% confidence level with the help of t and F tests and the applicable methods were evaluated. F value of the confidence level, three trial values of the table is small. However t value of the confidence level, three trial values of the table is big.

Keywords: Synthetic colorants, Erythrosine (E), Quinoline Yellow (QY), Indigotine (IC), Cloud Point Extraction, CTAB, Triton X-100, Spectrophotometer, Pharmaceutical, HPLC, Diode-Array Detector.

BÖLÜM 1

GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

CAC ve EC tarafından oluşturulan, belirli miktarlarda kullanımında sakınca görülmeyen gıda katkı maddeleri; gıdalarda mikrobiyolojik bozulmayı önleme ve dayanıklılığı arttırma, besleyici değeri koruma, teknolojik işlemlere yardımcı olma, renk, görünüş, lezzet, koku gibi duyusal özellikleri düzeltme gibi pek çok nedenle kullanılmaktadır.

Gıda katkı maddelerinden biri olan renklendiriciler; gıda, ilaç ve kozmetik sektöründe önemli bir yer teşkil etmektedir. Son yıllarda, gıda sektöründe doğal renklendiricilerin kullanımı artmasına rağmen stabilitelerinin düşük olması, fiyatlarının yüksek olması nedeniyle ilaç sektöründe sentetik renklendiriciler tercih edilmektedir.

1.2 Tezin Amacı

Gelişen gıda, ilaç ve kozmetik teknolojisine paralel olarak katkı maddelerinin kullanımında meydana gelen artış, kuşkuları da beraberinde getiriyor. Gıda katkı maddelerinin insan sağlığını tehdit etmesine neden olabilecek en önemli etken bu maddelerin yönetmeliklerde izin verilen dozların üzerinde kullanılmalarından kaynaklanmaktadır. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki; renklendirici amaçlı kullanılan sentetik boyaların tüketim miktarı, insanlar tarafından günlük tüketilebilir miktarı (ADI değerini) aşmadığı takdirde sağlık üzerinde olumsuz etkileri minimum düzeyde kalmakta, ancak tüketim miktarı ADI değerini aştığında olumsuz etkiler söz konusu olabilmektedir.

Amacımız, farmasötik preparatlarda kullanılan renklendiricilerin yeni geliştirilen

bulutlanma noktası ekstraksiyonunu takiben spektrofotometrik ve HPLC yöntemi ile tayin etmek ve yasalarca belirtilen sınırlar içerisinde olup olmadığını kontrol etmektir. Çalışmada farklı ilaç preparatları ve tekli, ikili, üçlü renklendirici içeren ürünler kullanarak yöntemlerin uygulanabilirliği, doğruluğu, tekrarlanabilirliği test edilmiştir.

1.3 Hipotez

Bu çalışmada, piyasada olan farmasötik preparatlarda kullanılan renklendiricilerin kantitatif tayini için iki yöntem geliştirilmiştir. Geliştirilen yöntemlerin farklı örneklere uygulanabilirliğinin araştırılması amacıyla tekli, ikili ve üçlü kombinasyonları içeren farklı ürünler seçildi.

Geliştirilen ilk yöntemde; ilaçlarda eser miktarda bulunan Kinolin Sarısı, Eritrosin ve İndigotin renklendiricilerinin ön-zenginleştirme yöntemi olan bulutlanma noktası ekstraksiyonu yöntemi ile zenginleştirilmelerini takiben türev spektrofotometrik yöntem ile kantitatif tayinleri yapıldı. Optimum çalışma koşullarının belirlenmesi için; non-iyonik ve katyonik sürfaktan konsantrasyonu, tuz cinsi ve konsantrasyonu, pH, sıcaklık ve zaman gibi farklı parametrelerin QY, E ve IC'nin ekstraksiyonuna etkisi detaylı bir şekilde araştırıldı. Bulutlanma noktası ekstraksiyonu ile zenginleştirme uyguladıktan sonra türev spektrofotometresi yardımıyla ölçümler kaydedildi.

Geliştirilen ikinci yöntemde ise HPLC ile kantitatif tayin gerçekleştirildi. Oluşturulan gradient yöntem ile QY, E ve IC kromatogramlarının üst üste çakışmaması ve kısa süre içerisinde doğru sonuç alınması sağlandı.

Geliştirilen yöntemlerin doğruluk ve kesinliğini saptamak amacıyla analitik yöntem parametrelerinin (özgünlük, doğruluk, seçicilik, doğrusallık, kesinlik, LOD, LOQ ve hassasiyet açısından) bulunması yönünde çeşitli testler uygulandı. Yöntemlerden elde edilen bulgular doğruluk ve kesinlik yönünden t ve F testleri yardımıyla %95 güvenirlik düzeyinde istatiksel olarak karşılaştırıldı.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİ

2.1 Gıda Katkı Maddesi

Uluslararası Gıda Kodeks Komisyonu (CAC) gıda katkı maddesini "besleyici değeri olsun veya olmasın, tek başına gıda olarak tüketilmeyen ve gıdanın karakteristik bileşeni olarak kullanılmayan, teknolojik bir amaç doğrultusunda üretim, muamele, işleme, hazırlama, ambalajlama, taşıma veya depolama aşamalarında gıdaya ilave edilmesi sonucu kendisinin ya da yan ürünlerinin, doğrudan ya da dolaylı olarak o gıdanın bileşeni olması beklenen maddeler" şeklinde ifade etmektedir[1].

2.1.1 Gıda Katkı Maddeleri ile İlgili Yasal Düzenlemeler

Katkı maddelerinin sistematik bir şekilde ilk ele alınması 1956'da Dünya Sağlık Örgütünün (WHO) ve Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) tarafından, 43 dünya ülkesini kapsayan bir tarama çalışması ile gerçekleşmiştir. 1962'de FAO ve WHO kuruluşlarının bu konularda uzmanları bir araya gelerek oluşan Birleşik Gıda Katkı Uzman Komitesi (JECFA), bugün de katkı maddesi olarak kullanılan her kimyasal madde için toksikolojik çalışmaların düzenlenmesini, yürütülmesini ve sonuçlarının değerlendirmelerini üstlenmiş uluslararası bir kurumdur.

Her ülkede gıda katkı maddelerinin kullanımını düzenleyen ulusal mevzuat ve bunu uygulayan resmi kuruluşlar bulunmaktadır. Gıda katkı maddeleri ile ilgili çalışmalar FAO ve WHO'nun oluşturduğu gıdalarla ilgili komisyonu ve bu kuruluşun alt komitesi olan JECFA tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu kurumlar katkı maddelerinin insan sağlığı

açısından güvenilirliği konusunda çalışmalar yapmakta ve belirli dozlarda kullanımında sakınca olmadığı belirlenen katkı maddeleriyle ilgili listeleri hazırlamaktadır[2].

2.1.2 Gıda Katkı Maddeleri ile İlgili Güvenlik Testleri

Katkı maddeleri laboratuvarlarda uzun süreli ve ayrıntılı güvenlik testlerinden geçirilir. Deney hayvanları üzerinde yapılan toksikolojik testlerle katkı maddelerinin ADI (Kabul Edilebilir Günlük Miktar) yani günlük alınabilecek miktarları saptanır. Deney hayvanlarında öldürücü dozda (letal doz = LD50: deney hayvanlarının % 50'sinin ölümüne neden olan doz) katkı maddesi verilir. Daha sonra doz yavaş yavaş azaltılarak doz-cevap ilişkisi araştırılır. Her dozda; katkı maddesinin emilimi, metabolizması ve atımı incelenir. Deney hayvanlarının hücre, doku ve organları incelenerek, karsinojenik, mutajenik, teratojenik ve allerjik etkileri araştırılır[3]. Bu çalışmalarda, kimya, biyokimya, hematoloji, bakteriyoloji, veteriner patoloji, farmakoloji, immünoloji ve istatistik gibi pek çok disiplin görev alır.

Çalışmalar sonunda katkı maddesinin hiçbir etkisinin bulunmadığı bir doz elde edilemezse katkı maddesinin besinlere katılmasına izin verilmez. Şayet deney hayvanına hiçbir zıt etki göstermeyen bir doz elde edilirse, bu doz "etkisiz doz" veya NOAEL (Gözlenebilen Hiç Bir Yan Etki Göstermeyen Doz) olarak tanımlanır. NOAEL dozu ile deney hayvanlarının yaşam süresinin %85'ini kapsayacak sürede deneye devam edilir. Ancak bu doz deney hayvanının vücut ağırlığının kilogramı başına mg olarak saptanmış bir dozdur ve insandaki etkileri bilinmemektedir. Deney insanlar üzerinde de etik nedenlerle yapılamayacağından, elde edilen dozun 1/10'u alınır. İnsanlar arasındaki bireysel ayrıcalıklar düşünülerek yine 1/10 alınarak NOAEL 100 olan güvenlik faktörüne bölünür. Yani deney hayvanında hiçbir etki göstermeyen dozun 1/100'ü insan için kabul edilir. (ADI = NOAEL / 100). Böylece günlük alınabilecek miktar (ADI) insanın vücut ağırlığının kilogramı başına mg olarak belirlenir.

"Günlük maksimum alım = ADI x Vücut ağırlığı(kg)" şeklinde saptanır.

Gıda katkı maddesinin maksimum miktarının saptanmasında 2. aşama ürünün üretim teknolojisinin gerektirdiği miktarın(Good Manufacturer Practice = GMP = Uygun Üretim Teknolojisi) ADI çerçevesinde belirlenmesidir. Eğer GMP miktarı ile ADI değeri aşılıyorsa

katkı maddesinin kullanılmasına izin verilmez. ADI değeri GMP ile aşılmıyor ise, bilinmesi gereken 2 veri daha vardır. Bunlardan biri katkı maddesinin kaç çeşit ürüne katılacağı, ikincisi ise bu ürünlerin tüketim düzeyidir.

Bu çalışmaların sonuçları, WHO ve FAO'nun ortaklaşa düzenlediği gıda katkı maddeleri üzerinde çalışan ortak uzmanlar komitesi JECFA adlı kuruluş; Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA); ABD Gıda İlaç Dairesi (FDA) gibi uluslararası kuruluşlarca onaylandıktan sonra her bir katkı maddesinin hangi oranlarda hangi ürünlere katılabileceğine karar verilir.

2.1.3 E Kodu

Her gıda katkı maddesinin uluslararası kabul görmüş bir numarası vardır. Avrupa Birliği'nde kullanımına izin verilen katkı maddelerine "Europe" kelimesinin baş harfi olan E kodu verilmiştir. E951: Aspartam, E104: Kinolin sarısı, E330: Sitrik asit gibi. Aroma maddeleri çok geniş bir grup olduğundan E kodu ve numara verilmemiştir. Bazı gıda katkı maddelerinin E kodları Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2. 1 Gıda katkı maddelerinin E kodları

E numarası	**Adlandırma**
E100-E180	Renklendiriciler
E200-E297	Koruyucular
E300-E321	Antioksidanlar
E322-E500	Emülsifiyer ve Stabilizatörler
E500-E578	Asit-Baz Sağlayıcılar
E620-E637	Tatlandırıcılar ve Koku Verenler
E900-E927	Geniş Amaçlı Gıda Katkı Maddeleri

2.2 Renklendiriciler

Uluslararası Gıda Kodeks Komisyonu renklendiricileri "gıdanın rengini düzelten veya renk vermek amacıyla katılan madde" olarak tanımlamaktadır. Renk verme özelliğine sahip pek çok madde kimyasal yapılarındaki farklılıklar nedeniyle farklı fiziksel, kimyasal

ve fizikokimyasal özelliklere sahiptirler ve bu özellikler onların hangi tip ürünlerde ve hangi amaçla ne şekilde kullanılacaklarını belirlemektedir[4].

Günümüzde gıda ve ilaç sanayiinin gelişmesine bağlı olarak ürünlerin renklendirilmesi gereksinimi çeşitli nedenlere bağlı olarak artmıştır. Uygulanan işleme tekniklerinin, gıdalarda ve ilaçlarda görünüş özellikleri üzerinde meydana getirdikleri olumsuz etkiler, gıdaların ve ilaçların teknolojik nedenlerle renklendirilmesi gereksinimi ortaya çıkmıştır[5].

Yapay renklendiricilerin, doğal renklendiricilere göre renk tonlarının ve renk şiddetlerinin kuvvetli olması, uygulama kolaylığı ve ucuzluğu gibi özelliklerinden dolayı kullanımları hızla artmış ve doğal renklendiricilere ilgi azalmıştır. Ancak daha sonraki dönemlerde gelişen bilimsel verilerin ışığı altında birçok yapay renklendiricilerinin toksik özellikleri ortaya konulmuş, pek çok ülkede oluşturulan yasal düzenlemelerle, bu renklendiricilerin çok azına izin verilerek kullanımları sınırlandırılmıştır.

2.2.1 Gıdalarda ve Farmasötiklerde Rengin Önemi

Günümüzde gelişen gıda ve ilaç üretim teknolojileri dikkate alındığında gıdalar ve ilaçlar; işleme, depolama ve satışa sunma gibi çeşitli aşamalarda ısı, ışık, pH, oksijen gibi fiziksel ve kimyasal koşullara bağlı olarak renk solması veya kaybına uğramaktadırlar. Ancak üreticiler işleme sırasında ortaya çıkan renk farklılıklarını ve kayıplarını karşılayarak orijinal rengi koruma, ürünün renk tekdüzeliğini sağlama, çekiciliğini arttırma, geliştirilmiş bir formülasyona bağlı olarak üretilen renksiz veya az renkli gıdalara ve ilaçlara renk kazandırma gibi amaçlarla renklendirici katkı maddelerini ürünlerinde kullanma yoluna gitmektedirler[6].

2.2.2 Renklendiricilerin Sınıflandırılması

Çeşitli sektörler dikkate alındığında (gıda, ilaç, kozmetik, kimya, tekstil vb.) her bir sektörün gereksiniminin karşılanması açısından birçok renk maddesinin kullanıldığı görülmektedir. Ancak bu renk maddeleri kimyasal yapıları, elde ediliş kaynakları, kullanılış özellikleri gibi birçok kimyasal ve fiziksel faktörler ile birbirlerinden ayrılmaktadırlar. Gıda ve ilaç sanayi açısından da her bir gıda ve farmasötik ürünün

yapısına bağlı olarak ürünlerin renklendirilmesi amacıyla kullanılacak renk maddelerinin özellikleri de değişmektedir. Teknolojik uygulamalarda bir renklendiricinin gıda ve ilaçlarda kullanımına izin verilmiş olmasının yanı sıra, hangi ürün için daha uygun kullanım özelliği göstereceğinin de belirlenmesi gerekmektedir. Aynı ürün için farklı yapısal özelliklere sahip renklendirici maddeler kullanılabilmektedir. Renklendirici maddeler için verilen genel bir sınıflandırmada bu maddeler elde ediliş şekillerine göre doğal ve sentetik renklendiriciler olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır. Bununla birlikte bazı doğal kaynaklı renklendiriciler yapay olarak da elde edilebilmektedir. Bu durumda bu maddeler "doğala özdeş renklendirici" olarak ifade edilmektedirler[7].

2.2.2.1 Doğal Renklendiriciler

Doğal renklendirici maddeler mikrobiyal, bitkisel, hayvansal ve mineral kaynaklardan elde edilen pigmentlerdir. Sertifikasız renklendiriciler olarak adlandırılan doğal renklendiricilerin renk aralıkları sınırlıdır ve genel olarak zayıf bir stabilite ile zayıf bir renklendirme gücüne sahiptirler, ısı, ışık ve pH'tan etkilenirler. Doğal renk maddelerinin kullanımında çeşitli problemler yaşanmaktadır[7]:

- Birçok fiziksel ve kimyasal etkilere karşı (ısı, ışık, pH) stabiliteleri düşüktür.
- Ürüne kendi tat ve aromalarını verirler.
- Çözünürlükleri düşüktür.
- Isı uygulaması, düşük su aktivitesi, metal kalıntıları ve diğer katkılardan etkilenirler.
- Renk tonları ve renk verme gücü sınırlıdır.

Gıda, ilaç ve kozmetiklerde kullanımlarında bu nedenlerden dolayı problemler yaşanmasına karşın, son yıllarda yapılan araştırmalarda sağlık üzerinde olumlu etkileri nedeniyle kullanımlarının arttığı gözlenmektedir. Bu maddeler, 1960 yılında A.B.D. Gıda - İlaç ve Kozmetik Yasası'nda yapılan değişiklik ile sertifikalı boya maddeleri listesinden çıkarılarak, öncelikli ve sürekli kullanılma olasılığı olan maddeler listesine aktarılmıştır[8]. Gıdalarda doğal olarak oluşan ve bu kaynaklardan elde edilen renk

maddeleri farklı kimyasal yapılara sahip olmaları nedeniyle bir kısmı suda çözünür nitelikte olup pek çoğu ise suda çözünmemektedir. Bu durum doğal renk maddelerinin gıda uygulamalarında renk çeşitliliğinin sınırlanmasına neden olmaktadır. Organik esaslı doğal renklendiricilerin yanı sıra mineral kaynaklı bazı renklendiricilerin de bulunması nedeniyle, doğal renklendirici maddeler kimyasal yapılarına göre sınıflandırılmaktadır:

- Organik Doğal Renklendiriciler,
- İnorganik Doğal Renklendiriciler[7].

2.2.2.1.1 Organik Doğal Renklendiriciler

Çizelge 2. 2 Organik doğal renklendiriciler hakkında genel bilgi[7]

Organik Doğal Renklendirici	**Genel Bilgi**
Annatto	Genellikle Güney Amerika ve Afrika'da yetişmekte olan Bixa orellana L. adlı bitkinin tohumlarından elde edilir. Bitkinin tohumları uzun yıllardır aroma ve renklendirme amacıyla kullanılmaktadır. Annatto yüksek ısı ve ışık stabilitesine sahiptir.
Antosiyonin	Doğada 300'ün üzerinde antosiyanin çeşidi vardır. Üzüm, mor havuç, tatlı patates, kırmızı turp, kırmızı lahana gibi birçok meyve ve sebzeye kırmızıdan maviye kadar farklı renkler veren bileşendir.
Bitkisel Karbon	Bitkilerin karbonize edilmesiyle elde edilmektedir. Kullanılan konsantrasyona bağlı olarak griden siyaha değişen renkler vermektedir. Işık, ısı ve pH stabilitesi yüksektir.
Karamel	Karbonhidratların kontrollü ısıl işleme tabi tutulmasıyla elde edilir.
Karmin	Dactylopius coccus costa adlı bir parazitten elde edilen ve etken maddesi karminik asit olan doğal bir renklendiricidir. Parlak kırmızı bir renge sahiptir.
Klorofiller	Çimen, ısırganotu gibi çeşitli bitkilerden ekstraksiyonla elde edilen yağda çözünen pigmentlerdir. Mg içeriğine bağlı olarak zeytin yeşilinden koyu yeşile kadar değişen renk tonlarında bulunurlar.
Lutein	Antioksidan özelliğine de sahip olan Lutein, Meksika'da bolca bulunan kadife çiçieğinden elde edilmektedir. Sarı renktedir ve ısı, ışık ve pH dayanıklılığı yüksektir.

Çizelge 2. 2 Organik doğal renklendiriciler hakkında genel bilgi[7] (devamı)

Turmerik	Zencefil familyasından *Curcuma longa L.* adlı bitkiden elde edilen ve çoğunlukla Turmerik olarak bilinen bir renklendiricidir. Genellikle Hindistan'da yetiştirilmektedir. Etken renk maddesi Kurkumin'dir.
Pancar Kökü Kırmızısı	Pancar kırmızısı, pancar kökü suyunun konsantre ve pastörize edilmesiyle elde edilir. Pancar kırmızısı, işleme ve uygulamaya bağlı olarak parlak kırmızıdan mavimsi kırmızıya giden bir renk verir.
Karoten	Palmiye ağacının (Yağ palmiyesi-*Elaeis guineensis)* meyvalarından ekstrakte edilerek elde edilen doğal karoten, karotenoid karışımlarının en zengin doğal kaynağıdır.

2.2.2.1.2 İnorganik Doğal Renklendiriciler

Çizelge 2. 3 İnorganik doğal renklendiriciler hakkında genel bilgi[7]

İnorganik Doğal Renklendirici	**Genel Bilgi**
Altın	Gıdaya metalik bir renk vermek maksadıyla kullanılan pahalı bir renklendiricidir. Kendine has rengi olan genellikle toz halinde bulunan bir maddedir.
Aluminyum	Gıdaya metalik bir renk vermek maksadıyla kullanılır. Gümüşümsü gri renkte çok ince öğütülmüş alüminyum taneciklerinden oluşur. Alüminyumun vücutta depolanması toksik etki yarattığından dolayı bazı ülkelerde kullanılması yasaklanmıştır.
Gümüş	Altın ve alüminyum gibi gıda yüzeyine metalik bir görünüm kazandırmak amacıyla kullanılır. Genellikle toz halinde olan gümüş aşırı dozlarda önemli rahatsızlıklara sebep olduğundan dolayı bazı ülkelerde kullanılması yasaklanan bir renklendiricidir.
Titanyum Dioksit	Beyaz toz görünümündedir. Isı ve ışığa karşı dayanıklılığı yüksektir. İlaç sanayinde dolgu maddesi ve boyar madde olarak kullanılmaktadır.
Demir Oksitler	Sarı, kırmızı, kahverengi veya siyah renkte toz halinde bulunan bu maddelerdir. Yüksek dozlarda zehirlidir. Bu sebeple bazı ülkelerde kullanımı yasaklanmıştır. Isı ve ışığa karşı stabiliteleri yüksektir.

Çizelge 2. 3 İnorganik doğal renklendiriciler hakkında genel bilgi[7] (devamı)

Kalsiyum Karbonat	Doğada yaygın olarak kireç taşı ve mermer yaygın şeklinde bulunur. Yüksek dozlarda zehirlidir; safra, böbrek taşı, hemoroite sebep olabilir. Suda ve alkolde pratik olarak çözünür olmayıp, seyreltik asetik asit, seyreltik hidroflorik asit ve seyreltik nitrik asitte köpürerek çözünmektedir.

2.2.2.2 Sentetik Renklendiriciler

Sentetik renklendiriciler, kimyasal yapıları itibarıyla doğada bulunmayan ancak kimyasal sentez yoluyla üretilebilen renk maddeleridir. Hemen hemen hepsinin sentezinde başlangıç materyali olarak kömür kullanılır. Doğal renklendiricilerle karşılaştırıldığında sentetik renklendiricilerin; renk verme güçleri, renk aralıkları, stabiliteleri, kullanım kolaylıkları ve fiyat uygunlukları gibi faktörler açısından üstünlük sağladıkları gözlenmektedir. Sentetik renklendiricilerinin gıda ve ilaç işleme koşullarına karşı stabilitelerinin yüksek olmasına karşın, bu renklendiricilerin stabiliteleri, renklendiricinin kullanıldığı ortama, renklendiricinin konsantrasyonuna, kullanılan çeşitli katkı maddelerinin konsantrasyonuna, sıcaklık, süre gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Bu faktörler her bir renklendirici için farklılık göstermektedir ve bu nedenle kullanılacak renklendiricinin seçimi önem kazanmaktadır.

Sentetik renklendiriciler çok yüksek oranlarda suda çözünme özelliğine sahiptirler. Pek çoğu ısıya, ışığa, asitlere, alkalilere ve koruyucu maddelere karşı stabildirler ve bu nedenle raf ömürleri de oldukça uzundur. Birçok farklı formda sentetik renklendirici üretilebilmesi nedeniyle bu maddelerin renk tonu aralıkları geniştir ve renklendirme güçleri yüksektir.

Sertifikalı renklendiriciler olarakta adlandırılan sentetik renklendiricilerin sınıflandırılmasında kimyasal özellikleri açısından çözünürlük özellikleri önem kazanmaktadır. Sentetik renklendiriciler çözünürlüklerine göre üç grupta toplanmaktadır[7]:

- Suda çözünenler
- Yağda çözünenler
- Lake renklendiriciler.

2.2.2.2.1 Suda Çözünen Sentetik Renklendiriciler

Çizelge 2. 4 Gıda, ilaç ve kozmetikte en çok kullanılan suda çözünen sentetik renklendiriciler ve renk kodları[9]

Boya İsmi	E Kodu	C.I. No.	Verdiği Renk
Tartrazine	E-102	19140	
Sunset Yellow FCF	E-110	15985	
Carmoisine	E-122	14720	
Ponceau 4R	E-124	16255	
Amaranth	E-123	16185	
Erythrosine	E-127	45430	
Allura Red AC	E-129	16035	
Chocolate Brown HT	E-155	20285	
Indigo Carmine	E-132	73015	
Brilliant Blue FCF	E-133	42090	
Quinoline Yellow	E-104	47005	
Food Black PN	E-151	28440	
Fast Green S	E-142	44090	
Patent Blue V	E-131	42051	
Food Red 2G	E-128	18050	
Fast Green FCF	E-143	42053	

2.2.2.2.2 Yağda Çözünen Sentetik Renklendiriciler

Yağda veya organik çözücülerde çözünen sentetik renklendiriciler, suda çözünen renklendiricilerde olduğu gibi tuz formu oluşturabilen gruplar içermedikleri için suda çözünmezler. Bu grup renklendiricilerin toksik özellikleri nedeniyle gıda ve ilaçların renklendirilmesi amacı ile kullanımlarına izin verilmemektedir.

2.2.2.2.3 Lake Renklendiriciler

Suda çözünen sentetik renklendirici maddelerin genellikle alüminyum oksit üzerine alüminyum klorür ilavesi ile alüminyum tuzu olarak çöktürülmeleri yolu ile elde edilen suda çözünmeyen pigmentlerdir. Lake renklendiricilerin renk tonları, dağılabilirlikleri, renklendirme güçleri, partikül büyüklükleri gibi özelliklere söz konusu renklendiricilerin hazırlanma koşullarına bağlı olarak değişebilmektedir. Lake renklendiriciler stabiliteleri açısından en iyi uygulama özelliklerini pH 3,5-9,5 arasında göstermektedirler. Kuvvetli asidik veya bazik koşullarda renklendirici-alüminyum bağının yıkıma uğraması nedeniyle bu koşullarda kullanımları uygun olmamaktadır.

Lake renklendiriciler;

- Şekerleme sanayiinde ve farmakolojik endüstride sıkıştırılmış tabletlerin renklendirilmesinde,
- Işığa bağlı olarak renk solmasının meydana geldiği veya ısı stabilitesinin arttırılmasının istendiği durumlarda,
- Suyun bulunmasının istenmediği, yağ esaslı karışımların renklendirilmesinde,
- Şekerlemelerde; şeker kristallerinin, donmuş şekerlerin ve film kaplı tatlıların renklendirilmesinde,
- Kuru görünümün önemli olduğu toz içecekler, tatlılar, çorbalar ve baharat karışımları gibi ürünlerin renklendirilmesinde,
- Plastik paketleme materyallerinin, mürekkep ve metal kaplar için iç lakelerin renklendirilmesinde kullanılmaktadır.

2.2.3 Avrupa Birliğinde Gıda Renklerinin Düzenlenmesi

Avrupa Parlamento ve Konsey Direktifi 94/36/EC gıda maddelerinde renklerin kullanımı ve Komisyon Direktifi 95/45/EC, Avrupa Birliğindeki (AB) gıda maddelerinde kullanılan renklerin spesifik saflık kriterinin esas düzenlemeleridir. Bu düzenlemeler çeşitli üye ülkelerde uygulanmaktadır ve esas provizyonlar izinli renkleri liste halinde belirleyerek spesifik saflık kriterini tahmin eder. Doğal veya sentetik olsa da bütün renk katkılarının güvenliği, kesinlikle test edilir ve periyodik olarak tekrar tayin edilir. AB düzeyinde, bütün renk katkıları Bilimsel Gıda Komitesi (SCF) tarafından değerlendirilir ve onaylanır. Bu komite AB tarafından bütün Üye Ülkelerden atanan bir grup bilimsel uzmandır. Gıda renk katkısının değerlendirilmesinde SCF ve ADI tahsis eder. Bu değer, spesifik rengin hayat boyu her gün emniyetle tüketilmesi için komite tarafından hesaplanır.

2.2.4 Renklendiricilerin Numaralandırılması

Birçok teknik özellikleri tanımlanmış renk maddelerinin daha kolay anlaşılmaları amacıyla bu maddelere kod numaraları da verilmektedir.

Konu ile ilgili ilk uygulama İngiliz Boya Üreticileri ve Boyacılar Birliği ile Amerikan Tekstil Kimyacıları ve Boyacıları Birliği tarafından oluşturulmuştur. Bu kodlama gıda renklendiricileri de dahil bütün sektörde kullanılan mevcut renklendiricileri içermekte olup renk indeks numarası ile anılmaktadır.

Gıda renklendiricilerini diğer renklendiricilerden ayırmak için FDA tarafında Gıda, İlaç ve Kozmetik Yasası çerçevesinde izin verilen renklendiricilere bir FD&C numarası verilmektedir.

Benzer şekilde Avrupa Topluluğu Konseyi tarafından da söz konusu renklendiricilere E kodu verilmiştir. Bu nedenle literatürde aynı renklendirici madde için 3 farklı kod numarası ile karşılaştırılabilmektedir. Bir renklendiricinin gıdada kullanılabilmesi açısından FD&C ve E kodu ile anılmış olması önem kazanmaktadır.

Ülkemizde de gıda üreticileri Avrupa Topluluğu direktiflerine uygun olarak düzenlenen Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği'nde (TGKY) yer alan renklendiricileri kullanmak durumundadır[3].

2.2.5 Besinlere ve Farmasötiklere Katılacak Renklendirici Miktarının Belirlenmesi

Gıda katkı maddeleri ile güvenlik testleri kısmında (sf.3) belirtildiği gibi ürüne katılacak maksimum renklendirici miktarının belirlenmesi için;

- ADI (mg/kg) değerinin,
- Besinin üretim teknolojisinin gerektirdiği miktarın (GMP),
- Katkı maddesinin kaç besine katılacağının,
- Besinlerin ortalama günlük tüketim miktarının belirlenmesi gerekir[10].

Farmasötik ürünlerde "Türk Gıda Kodeksi Gıdalarda Kullanılan Renklendiriciler Tebliği" nin sadece EK-I'inde yer alan liste kapsamındaki renklendiriciler kullanılır[3].

Çizelge 2. 5 Gıda, ilaç ve kozmetik ürünlerinde kullanımına izin verilen gıda renklendiricileri[3]

E Kodu	**Genel Adı**
E 100	Kurkumin
E 101	Riboflavin, Riboflavin-5'-fosfat
E 102	Tartrazin
E 104	Kinolin sarısı
E 110	Sunset yellow FCF, Orange yellow S
E 120	Koşineal, Karminik asit, Karminler
E 122	Azorubin, Karmosin
E 123	Amarant
E 124	Ponso(ponceau) 4R, Koşineal Red A
E 127	Eritrosin
E 128	Red 2G
E 129	Allura Red AC
E 131	Patent Blue V
E 132	İndigotin (İndigo Karmin)

Çizelge 2. 5 Gıda, ilaç ve kozmetik ürünlerinde kullanımına izin verilen gıda renklendiricileri[3] (devamı)

E 133	Brilliant Blue FCF
E 140	Klorofiller ve Klorofilinler
E 141	Klorofiller ve Klorofilinlerin bakır kompleksleri
E 142	Green S
E 150a	Sade Karamel
E 150b	Kostik sulfit karamel
E 150c	Amonyum karamel
E 150d	Amonyum sülfit karamel
E 151	Brilliant Black BN, Black PN
E 153	Bitkisel karbon
E 154	Brown FK
E 155	Brown HT
E 160a	Karışım halindeki karotenler, Beta-karoten
E 160b	Anatto, Biksin, Norbiksin
E 160c	Paprika ekstraktı, Kapsantin, Kapsorubin
E 160d	Likopen
E 160e	Beta-apo-8'karotenal
E 160f	Beta-apo-8'-karotenik asidin etil esteri
E 161b	Lutein
E 161g	Kantaksantin
E 162	Pancar kökü kırmızısı, Betanin
E 163	Antosiyaninler
E 170	Kalsiyum karbonat
E 171	Titanyum dioksit
E 172	Demir oksit ve hidroksitler

Çizelge 2. 5 Gıda, ilaç ve kozmetik ürünlerinde kullanımına izin verilen gıda renklendiricileri[3] (devamı)

E 173	Alüminyum
E 174	Gümüş
E 175	Altın
E 180	Litolrubin BK

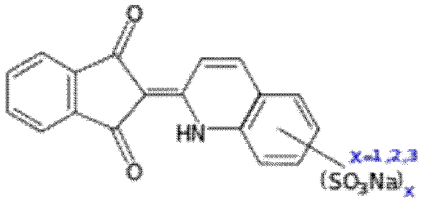
Çizelge 2. 6 Kullanımına izin verilen ve ülkemizde en çok kullanılan renklendiricilerin ADI miktarları[3]

E Kodu	**Renklendirici**	**ADI (mg/kg)**
E100	Kurkumin	1
E101	Riboflavin	0,5
E102	Tartrazin	0,5
E104	Kinolin Sarısı	10
E110	Sunset Yellow	2,5
E122	Karmosin	4
E124	Ponceau 4R	4
E129	Allura Red	7
E127	Eritrosin	0,1
E132	Indigotin	4

2.2.6 Çalışmada Kullanılan Renklendiriciler Hakkında Genel Bilgi

2.2.6.1 Kinolin Sarısı

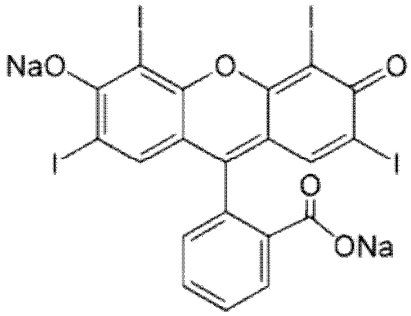
- **Kaynağı:** Sentetik olmayan azo boyası.
- **Fonksiyon ve Özellikleri:** Sarı gıda renklendiricisidir. Suda çok çözünür.
- **Kabul edilebilir günlük alım miktarı:** Vücut ağırlığı üzerinden 10 mg/kg.
- **Yan etkileri:** Histamin serbest bırakıcısı olarak rol oynamasına rağmen, kullanılan konsantrasyonlarda yan etkisi bilinmemektedir.



Şekil 2. 1 Kinolin sarısı molekül formülü

2.2.6.2 Eritrosin

- **Kaynağı:** Sentetik iyodin içeren kırmızı boya.
- **Fonksiyon ve Özellikleri:** Kırmızı gıda renklendiricisidir. Suda çok çözünür.
- **Kabul edilebilir günlük alım miktarı:** Vücut ağırlığı üzerinden 0,1 mg/kg.
- **Yan etkileri:** İzin verilen konsantrasyonlarında bazı yan etkileri vardır. Birkaç olayda hiperaktiviteyi yükselttiği rapor edilmiştir, mutajenlerle bağlantılı olma olasılığı vardır. Eritrosin güneş ışığına duyarlılığı ile insanlarda ışığa duyarlılığın yükselmesine neden olur. Eritrosinin yüksek konsantrasyonları iyot metabolizmasıyla zarar verir.

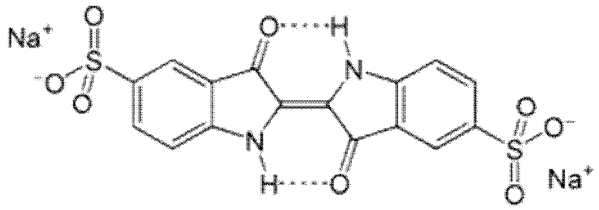


Şekil 2. 2 Eritrosin molekül formülü

2.2.6.3 Indigotin

- **Kaynağı:** Mavi renklendirici, doğal olarak *Indigofera tinctoria* çalısının yapısında bulunur, ticari olarak sentetik üretilir.
- **Fonksiyon ve Özellikleri:** Mavi gıda renklendiricisidir. Suda çok çözünür.
- **Kabul edilebilir günlük alım miktarı:** Vücut ağırlığı üzerinden 5 mg/kg.

- **Yan etkileri:** İzin verilen konsantrasyonlarında nadiren yan etkileri görülür. Seyrek olarak alerjik reaksiyonlar tanımlanmıştır, bunlar renklendiricinin (vücut) proteinlere bağlanması yüzündendir. Histaminin serbest bırakılmasından sorumludur.



Şekil 2. 3 İndigotin molekül formülü

2.2.7 Renklendiricilerin Etkileri

Yapılan araştırmalar bazı renklendiricilerin çocuklarda hiperaktiviteye yol açtığını göstermiştir. Ayrıca uzmanlar "Karmen kırmızısı"nın alerjiye neden olduğunu, hatta devamlı tüketilmesi halinde ölüme götüren şok yaratabildiğine dikkat çekiyor. Uzmanlar renk verici maddelerin insanlardaki kanser riskini %30 arttırdığı konusunda uyarıyor. Aynı zamanda çoğu renklendiricilerin alerjiye yol açtığı görülmüştür. İngiltere'de Southampton Üniversitesi tarafından yapılan bir araştırma ise, renklendirici denilen boya katkı maddelerinin hiperaktif çocukları olumsuz etkileyebileceğini göstermiştir. Çalışma sonunda; 8-9 yaş arası çocukların boya katkılarından olumsuz etkilendiği tespit edilmiştir. 3 yaş grubu çocuklarının ise bunların kana sadece bir kez karışmasıyla bile olumsuzluk yaşadıkları belirlenmiştir. Bazı katkı maddeleri (renklendiriciler gibi) aşağıdaki bulgulardan birinin veya daha fazlasının oluşmasını tetikleyebilir[4, 11]:

- Dikkat Sürdürüm Bozukluğu / Hiperaktivite Sendromu
- Alerji
- Astım
- Otizm, yaygın gelişimsel bozukluk, enüresis (altına idrar kaçırma)
- Davranış bozuklukları
- Depresyon, duygu durum değişiklikleri

- Kulak ağrıları, kronik orta kulak iltihabı
- Göz problemleri
- G6PD Enzim eksikliği, mide-bağırsak problemleri, mide ağrısı
- Baş ağrısı, migren
- Nazal polip
- Cilt problemleri, egzema, ürtiker
- Uyku problemleri
- Tikler, Tourette sendromu

2.2.8 Sentetik Renklendiricilerin Analiz Yöntemleri

Gıda ve farmasötiklerde sentetik renklendiricilerin iyi ve tanımlanmış, kesin ve doğru sonuç veren analiz yöntemlerine ihtiyaç duyulmasında ki sebepler:

- Renklendiricilerin var olup olmadığının belirlenmesi,
- Var olan renklendiricilerin miktarının belirlenmesi,
- Gıda ve ilaçlarda beyan edilmeyen boyaların yokluğunun doğrulanması,
- Proses ve depolama sırasında boyaların stabilitesinin kontrol edilmesidir.

Ayrıca sentetik renklendiricilerin kullanımlarının mevzuatlarla yasallaştırılması, bu maddelerin tayinleriyle ilgili yöntemlerin geliştirilmesi gereğini ortaya çıkarmıştır. Suda çözünen sentetik organik boyaların analizlerinde yün boyama yöntemi, kağıt kromatografisi (PC), ince tabaka kromatografisi (TLC), kolon kromatografisi (CC), gaz kromatografisi (GC), yüksek basınçlı sıvı kromotografisi (HPLC) ve spektrofotometrik tekniklerden yararlanılmaktadır[4, 11].

2.2.8.1 Kalitatif Analiz Yöntemleri

Karışımlardaki boyaların tek tanımlanması kalitatif TLC, HPLC veya HPLC parmak izi ile yapılır. Sırasıyla analiz protokolü 3 aşamadan oluşur:

- Su veya başka uygun çözücü ile boyanın ekstraksiyonu,

- Renklendiricinin konsantre edilmesi ve saflaştırılması,
- Renklendirici moleküllerinin tespiti.

Örneğin, 5 farklı sentetik boya (tartrazin, sunset yellow, ponceau 4R, amaranth ve brillant blue FCF) içecek ve şekerlerden pH 4'te poliamid adsorpsiyonu ile ayrılmıştır[12].

2.2.8.1.1 Yün Boyama Tekniği

Bu yöntem, asidik boyaların sulu asetik asit çözeltisinde, bazik boyaların amonyak çözeltisinde yağı alınmış beyaz renkli yünü boyaması ilkesine dayanmaktadır.

- **Yün İpliklerinin Hazırlanması:** Ham yün ipliklerinin yağı soxhlet cihazında petrol eteri ile birkaç kez ekstrakte edilerek alınır. Kuruduktan sonra %5'lik NH_3 solüsyonu ilave edilerek 80^{o}C'deki su banyosunda 1 saat tutulur. En son aşamada saf su ile bolca yıkanarak kurumaya bırakılır. Temiz ve kuru yünler cam kap içerisinde muhafaza edilir.
- **Yün Boyamanın Yapılması:** Renklendirici içeren gıda veya farmasötik numunesi bir beherde distile su ile çözülür. Birkaç damla asetik asit çözeltisi ile ortam asitlendirilerek yukarıdaki şekilde yağı alınmış yün ipliklerden bir miktar konur. Beher 60^{o}C'deki su banyosuna konarak ortamdaki renklendiricilerin yün iplikleri tarafından absorblanması için yarım saat kadar tutulur. Daha sonra yün iplikleri beherden alınarak distile su ile yıkanır. Renklendiriciler yün tarafından tutulmuş, su ile yıkama sonucu akmıyor ise sentetik boya, akarak yünü terk ediyor ise doğal renklendirici olduğu anlaşılır. Boyalı yün iplikleri bir behere konulur. Üzerine 10 ml % 5'lik NH_3 çözeltisi ilave edilerek su banyosunda 30 dakika ısıtılır. Sentetik renklendiriciler amonyaklı ortamda yün ipliklerden ayrılırlar. Renklendiriciler kuruluğa kadar su banyosunda tutulur[12].

2.2.8.1.2 İnce Tabaka Kromotografi Tekniği ve Uygulanması

İnce tabaka kromotografisi karışımdaki bileşenlerin sayısının belirlenmesi, belirli maddelerin karışımda olup olmadığının belirlenmesi, reaksiyonun yürüyüşünün kontrol edilmesi gibi pek çok amaçla yapılmaktadır. TLC'de en yaygın kullanılan adsorbanlar

silikajel, alümina ve selülozdur. TLC'nin uygulanmasında az miktardaki madde karışımı adsorban tabakanın bir ucuna damlatılır, plaka kapalı bir geliştirme tankına daldırılır, kapiler etkisiyle yürütücü çözücünün tabakanın yukarısına kadar ilerlemesi beklenir, uygun bir şekilde görünür hale getirilen spotlar değerlendirilir.

Socaciu yaptığı çalışmada renklendirici içeren çözeltiyi ayırma hunisine alarak üzerine Amberlit reçine çözeltisi eklemiştir. Faz ayrımı için bekleyip ve daha sonra doygun amonyum sülfat çözeltisi eklenerek alt tabaka atılır. Ayırma hunisinde kalan çözeltiye su ilavesiyle fazların ayrılması beklenir. Suyun pH'sı asidikse nötr olana dek yıkama işlemine devam edilir. Sulu faz alındıktan sonra geri kalan reçine tabakasından boya, amonyak çözeltisi ile çalkalanarak alınır. Kromotografi plağına numune ve standart boya çözeltileri uygulanır. Sonra plak alınarak kurutulur ve spotların ilerlediği mesafe ölçülür. Rf değerleri kıyaslanarak ekstrakte edilen boyaların neler olduğu saptanır[13].

2.2.8.2 Kantitatif Tayin Yöntemleri

2.2.8.2.1 Spektrofotometrik Yöntemler

Bu çalışmada; bulutlanma noktası ekstraksiyonundan sonra kısmi en küçük kareler metodu kullanılarak sulu çözeltide eser miktarda bulunan Malachite Green ve Crystal Violetin aynı anda tayinine çözüm getirilmiştir. Çalışmada optimum ekstraksiyon koşullarının belirlenmesi için pH, çözücü konsantrasyonu, zaman ve sıcaklık etkisi noniyonik sürfaktan olarak Triton X-114 kullanılarak araştırılmıştır. Ölçüm yapılacak maksimum absorpsiyon dalga boyunun Malachite Green ve Crystal Violet için sırasıyla 624 ve 529 nm olduğu, ölçüm eğrisinin 9,9-800 ve 16-1000 ng/mL konsantrasyonları aralığında doğrusal olduğu, tayin limitlerinin sırasıyla 2,9 ve 4,8 ng/mL ve gerçek matris örnekleri içerisindeki eser miktarda bulunan Malachite Green ve Crystal Violet' in aynı anda tayininde geri kazanımların 92,45–102,5 % olduğu belirtilmiştir. Sonuçlar, zorlu ön ayırma prosedürleri ve pahalı cihazlar olmaksızın düşük hata payı ve yüksek geri kazanımlarla birlikte bulutlanma noktası ekstraksiyonu sisteminin etkinliğini başarıyla göstermektedir[6].

Pourreza ve Ghami'nin yaptıkları bu çalışma, gıda örneklerinde bulunan Carmoisine ve Brilliant Blue'nun eş zamanlı tayini için bulutlanma noktası ekstraksiyonuyla ön

zenginleştirme yapıldıktan sonra spektrofotometrede ölçülmesine dayanmaktadır. Geliştirilen metot, boyaların Triton X-100'ün sulu çözeltisine bulutlanma noktası ekstraksiyonuyla alınıp, suyla seyreltildikten sonra 522 ve 640 nm'de sırasıyla Carmoisine ve Brilliant Blue'nun absorpsiyon ölçümlerinin alınmasına dayanmaktadır. Her iki boya için pH, sürfaktan konsantrasyonu ve sıcaklık gibi farklı parametrelerin bulutlanma noktası ekstraksiyonu üzerindeki etkileri araştırılmış ve optimum koşullar saptanmıştır. Çalışmada, epey düşük deteksiyon limiti, daha geniş konsantrasyon aralığında doğrusallık ve daha düşük standart sapma değeri gözlemlenmiştir[9].

Pourreza ve arkadaşları, gıda örneklerinde eser miktarda bulunan Allura Red'in spektrofotometrik tayini için CTAB, Triton X-100 ve Triton X-114'ün karıştırılmış misellerini kullanarak bulutlanma noktası ekstraksiyonu metodunu uygulamışlardır. Sürfaktan konsantrasyonu, elektrolit konsantrasyonu, sıcaklık ve pH gibi farklı parametrelerin bulutlanma noktası ekstraksiyonu üzerine etkisi detaylı bir şekilde çalışılmıştır. Allura Red'in lineer kalibrasyon eğrisi 20-1400 µg/L konsantrasyon aralığında oluşturulmuş ve deteksiyon limiti 7,8 µg/L olarak bulunmuştur. Ayrıca 757 µg/L Allura Red için bağıl standart sapma (RSD) değeri 3,87 (n=10) olarak elde edilmiştir. Çalışmada karışmış misel kullanımının fazların etkin ayrılmasında kolaylık sağladığı ve çözücü ekstraksiyon metoduyla kıyaslandığında daha az sürfaktan kullanımından dolayı metodun daha az toksisiteye sahip ve güvenilir olduğu gözlemlenmiştir[14].

Ni ve arkadaşı yaptıkları çalışmada renklendirici karışımlarının bir arada spektrofotometrik tayinini incelemişlerdir. Bu çalışmada Tartrazine, Sunset yellow, Ponceau 4R, Amaranth ve Brillant blue içeren renklendirici karışımı ön kimyasal ayırma yapılmaksızın spektrofotometri ile bir arada analiz edilmiştir. Deneylerden elde edilen veriler normal absorpsiyon spektrumu, 1. ve 2. türev absorpsiyon spektrumları kullanılarak CLS, PCR, PLS ve ITTFA gibi kemometrik yaklaşımlarla işleme tabi tutulmuştur. 5li kombinasyonla 16 renklendirici karışımının farklı kemometrik yaklaşımların uygulanması ile elde edilen sonuçlar tartışılmış ve değerlendirilmiştir. ITTFA' nın CLS, PCR ve PLS' den daha iyi doğruluk verdiği ve 1. türev verilerine dayanan kalibrasyonların bu dört yöntem için bazı avantajlar sağladığı bulunmuştur. Yöntem

birçok ticari gıda örneğindeki renklendiricilerin tayinine başarılı olarak uygulanmıştır[15].

Sacide Altınöz ve Suna Toptan, gıda örneklerindeki İndigotin ve Ponceau-4R'nin bir arada tayini için Vierordt, birinci derece türev spektrum oranı ve türev UV spektrofotometrisi yöntemlerini uygulamışlardır. Bu metodlarda ayırma basamağına ihtiyaç duyulmaksızın 300-700 nm dalga boyu aralığında çalışılmış ve pH=7 fosfat tamponu kullanılmıştır. Lineerlik alanları geliştirilen UV spektrofotometrik yöntemde, İndigotin için 1-50 µg/mL, Ponceau-4R için 1-52 µg/mL olarak bulunmuştur. Her iki boyayı tayin etmek için, bu prosedürler sakkaroz ve sitrik asit içeren ticari toz içecekler, şekerlemeler gibi gıda örneklerine uygulanmıştır. Geliştirilen spektrofotometrik yöntemlerin doğru, kesin, tekrarlanabilir olduğu belirtilmiştir[16].

J.J Berzas Nevado ve arkadaşları ticari gıdalarda üçlü karışım halindeki Tartrazine, Sunset Yellow ve Ponceau 4R'ın tayinini 1.derece türev spektrofotometrisi (zero-crossing yöntem) ile gerçekleştirmişlerdir. Geliştirilen bu yöntemde, farklı oranlardaki sentetik renklendirici karışımlarının tayini için herhangi bir ayırma işlemine ihtiyaç duyulmamış olup geri kazanımın % 94-105 olduğu görülmüştür. Elde edilen sonuçlar HPLC yöntemi ile kıyaslanmış ve sonuçların çok yakın olduğu bulunmuştur[17].

Jonnalgadda ve arkadaşları, sokakta satılan tüketime hazır gıdalarda tip, boyut ve kullanılan renkler üzerine yaptıkları araştırmada 545 numune incelemişlerdir. Bu numunelerin % 90'ında izin verilen boyalar, %8'inde kullanımı yasak olan boyalar ve %2'sinde izin verilen ve kullanımı yasak boyaların karışımları tespit edilmiştir. Ancak bu %90'lık dilimdeki numunelerin %27'sinde yerel yönetimce belirlenmiş oranlarda gıda boyası kullanıldığını, diğer %73'lük kısmında ise izin verilen oranları aştığını saptamışlardır. En çok kullanılan gıda boyası olarak Tartrazin ve Sunset Yellow F.C.F'ye rastlanmıştır[18].

Altıniğne'nin yaptığı bir çalışmada, bazı şekerlemeler ve toz içeceklere katılmış olan Sunset Yellow FCF ve Tartrazine boyar maddelerinin analizleri, voltametrik (DPP) ve spektrofotometrik metotlarla yapılarak karşılaştırılmıştır. Şekerlemelerde ve sentetik toz içeceklerde, boyar maddenin yalnız bir tanesi bulunduğunda, doğru, hassas ve güvenilir sonuçlar elde edilebilmektedir. Bu çalışma, nitel ve nicel tayinlerin,

spektrofotometrik metot yanında voltametri metoduyla da yapılabildiğini göstermiştir[19].

Özdemir ve Akkan'ın yaptıkları çalışmada toksik ve kanserojen etkileri bulunan, jölelerde kullanımı yasak olan Carmoisine ve Patent Blue V karışımlarının miktar tayininde birinci derece türev spektrofotometrisi ve C_{18} kartuş ile ön ayırma işleminden sonra birinci derece türev yöntemleri kullanılmıştır. Her iki yöntemin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Çalışma sonunda Carmoisine ve Patent Blue V içeren karışımlar için C_{18} kartuş ile ön ayırma işleminden sonra birinci derece türev yönteminin, birinci derece türev spektrofotometrisine göre daha hızlı, doğru ve ekonomik olduğunu belirtmişlerdir[20].

Lau ve arkadaşları, alkolsüz içeceklerdeki suda çözünebilen sentetik gıda boyalarını tayin etmek için basit bir spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Yöntem, pH 5,6'da %0,5'lik oktadesil-trimetilamonyum bromür kullanarak iyon çifti oluşturmaya dayanmaktadır. Önerilen bu metot Amarant, Carmoisine, Green 5, Orange 6, Patent blue V, Ponceau 4R, Sunset yellow F.C.F ve Tartrazin içeren içeceklerde yapılan tayinlerde kullanılmıştır. Green 5 dışındaki diğer renk maddeleri optimum sınırın altında çıkmıştır[21].

Pourreza ve Zarein yaptıkları çalışmada gıda örneklerinde spektrofotometreyle eser miktarda Orange 2 tayini için bulutlanma noktası ekstraksiyonu yöntemini uygulamışlardır. Metod noniyonik sürfaktan Triton X-100 ve katyonik sürfaktan CTAB'ın karışmış misellerini kullanarak asidik ortamdaki sulu çözeltiden Orange 2 ekstaksiyonuna dayanmaktadır. Ekstraksiyondan sonra, sürfaktanca zengin faz suyla seyreltilmiş ve spektrofotometrede 484 nm'de absorbans değeri ölçülmüştür. Ekstraksiyonun verimliliği üzerinde sürfaktan, asit ve tuz konsantrasyonu, inkübasyon zamanı ve sıcaklık etkisi araştırılmıştır. Orange 2'nin kalibrasyon grafiğinin 2,1-420 ng/mL aralığında doğrusal olduğu belirtilmiştir(r=0,9991). 35 ve 105 ng/mL konsantrasyonlarındaki Orange 2'nin 10'ar kez ölçülmesi sonucu elde edilen standart sapmanın 3 katı olarak belirlenen LOD değerleri sırasıyla 1,20% ve 1,49% bulunmuştur (n=10). Geliştirilen yöntemin basit, seçici ve duyarlı olmasının yanı sıra deteksiyon limitinin daha önce rapor edilmiş yöntemlere göre daha iyi olması tercih edilmesinde

en büyük faktör olduğu belirtilmiştir[22].

Pourreza ve Elhami, gıda örneklerinde Amaranth'ın spektrofotometrik yöntemle tayini için non-iyonik Triton X-100 ve Tetrabutilamonyum hidrojen sülfat kullanarak bulutlanma noktası ekstraksiyonu yöntemini uygulamışlardır. Ekstraksiyondan sonra, ekstrakte edilen sürfaktanca zengin faz suyla seyreltilmiş ve spektrofotometrede 518 nm'de absorbans değeri ölçülmüştür. Ekstraksiyonun verimliliği için sürfaktan konsantrasyonu, pH, denge sıcaklığı ve zamanı, tetrabutilamonyum hidrojen sülfat ve tuz konsantrasyonu gibi parametrelerin etkisi araştırılmış ve optimum düzeyler belirlenmiştir. Amaranth'ın 20-1600 ng/mL doğrusal aralıkta kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur(r=0,9993/n=12). Blank'in 10 kez ölçülmesiyle standart sapmasının 3 katı olarak belirlenen LOD değeri 13 ng/ mL bulunmuştur(n=10). Ayrıca 100 ve 1000 ng/mL Amaranth konsantrasyonları için bağıl standart sapma değerleri sırasıyla 4,2% ve 1,4% bulunmuştur(n=10). Çalışılan bu yöntemde gıdalarda renklendirici analizi için ön işlem prosedürüne ihtiyaç duyulmamıştır ve analizin duyarlı, seçici, basit ve nispeten daha kısa sürede tamamlandığı belirtilmiştir[23].

El-Shahavi ve arkadaşları yaptıkları bu çalışmada, gıda örneklerinde bulunan Sunset Yellow'un tayini için bulutlanma noktası ekstraksiyonunu takiben spektrofotometrik ölçüm yöntemi geliştirmişlerdir. Bu yöntem, HCl-Triton X-100 içindeki Sunset Yellow ve trioktilaminin iyon ortaklığının bulutlanma noktası ekstraksiyonuna dayanmaktadır. Sürfaktan fazında Sunset yellow trioktilamin ile reaksiyona girerek hidrofobik iyon ortaklığı oluşturmaktadır. Sürfaktanca zengin faz ve sulu faz arasındaki, Sunset yellow'un ayrışma kat sayısı yaklaşık olarak 104 bulunmuştur. Validasyon, standart HPLC sonuçlarıyla kıyaslanarak test edilmiştir[24].

Purkait ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, non-iyonik sürfaktan Triton X-100 kullanılarak bulutlanma noktası ekstraksiyonu ile atık sulardan toksik eosin boyasının ayrılması sağlanmıştır. Birçok boya molekülleri renksiz sulu fazdan ayrılarak sürfaktanca zengin fazda çözünmektedir. İki faz tamamen ayrıldıktan sonra iki fazada boya ve sürfaktan konsantrasyonunun, sıcaklık ve tuz konsantrasyonunun etkisi araştırılmıştır. Deneysel sonuçlardan yola çıkarak, 10 µg/mL'e kadar boya konsantrasyonu için 95°C'de 0,2 M Triton X-100 kullanılmasıyla atık sulardan eosin boyasının geri kazanımı 100%

oranında sağlanmıştır. Daha yüksek konsantrasyonlarda (200 µg/mL'ye kadar) 80°C'de 0,1 M Triton X-100 ve 0,2 M NaCl konsantrasyonları kullanılarak 87,5-100% oranlarında atık sulardan boyanın geri kazanımı sağlanmıştır[25].

Abedi ve Nekouei yaptıkları çalışmada noniyonik sürfaktan olarak Triton X-100'ü kullanarak bulutlanma noktası ekstraksiyonu ile su örneklerinden Direct Yellow 12' nin ayrılması ve zenginleştirilmesini sağlamışlardır. Boyanın farklı konsantrasyonları üzerine sürfaktan konsantrasyonu, pH, sıcaklık ve tuz konsantrasyonunun etkisi çalışılmış ve Direct Yellow 12'nin ayrılması için optimum koşullar belirlenmiştir. Seyreltilmiş fazda Direct Yellow 12 konsantrasyonu UV-VIS spektrofotometresi kullanılarak ölçülmüştür. Optimum koşullar altında tek ekstraksiyon ile 600 mg/L' ye kadar Direct Yellow 12' nin kantitatif olarak tayin edilebileceği belirtilmiştir[26].

Mousavi ve Nekouei noniyonik sürfaktan olan Triton X-100'ü kullanarak atık sulardan toksik Reaktif Black 5 boyasının ayrılma ve zenginleştirilmesi için geliştirdikleri bulutlanma noktası ekstraksiyonu yöntemini kullanmışlardır. Ekstraksiyona, boyanın farklı konsantrasyonu, pH, sıcaklık ve tuz konsantrasyonunun etkisi çalışılmış ve Reaktif Black 5 'in ayrılması için optimum koşullar belirlenmiştir. Seyreltilmiş fazda Reaktif Black 5 konsantrasyonu UV-VIS spektrofotometresi kullanılarak ölçülmüştür. Sonuçlar optimum koşullar altında tek ekstraksiyonda bulutlanma noktası ekstraksiyonu prosedürüyle 600 mg/L' ye kadar Reaktif Black 5' in kantitatif olarak tayininin (>97%) mümkün olduğunu göstermiştir[27].

Bu çalışmada balık yetiştiriciliğindeki su örneklerinde Brillant Green'in eser miktarları spektroskopi yöntemiyle belirlenmiştir. Bu metotta etanol kullanarak seyreltme işlemi yapılmış ve böylece hassaslığın ve ekstraksiyon etkinliğinin arttırılması hedeflenmiştir. Bu yöntem balık yetiştiriciliğindeki su örneklerinde ve farklı su örneklerinde Brillant Green'in miktar tayininde iyi sonuçlar alınmasını sağlamıştır[28].

Purkait ve grubu bulutlanma noktası ekstraksiyonunda, Chrysoidine boyasını ekstrakte edebilmek için 2 noniyonik sürfaktan kullanmışlardır: TX-100 ve TX-114. Boyanın ekstraksiyonuna sürfaktan, boya ve tuz konsantrasyonu, sıcaklık ve pH gibi parametrelerin etkisini belirlemişlerdir. Boya ekstraksiyonunun sıcaklık, sürfaktan ve tuz konsantrasyonuyla arttığını belirtmişlerdir[29].

Güzin Alpdoğan ve Mahmure Üstün Özgür yaptıkları çalışmada üçlü boya karışımının tayini için türev spektrofotometrik yöntemi kullanmışlardır. Bu 3'lü boya karışımı toz içeceklerde Karmosin, Tartrazin, ve Pancar Kırmızısı (E110, E102 ve E162)'dir. Önerilen yöntem bu boyaların tayini için uygulanmıştır ve RP-HPLC yöntemi referans yöntem olarak uygulanmıştır. Sonuçların istatiksel değerlendirilmesi her 2 yöntem arasında iyi uyum olduğunu doğrulamıştır. Uygulanması kolay, hızlı ve ucuz olduğu için türev spektrofotometrik yöntemin daha avantajlı olduğunu belirtmişlerdir[30].

Yongnian ve arkadaşları kemometrik amaçla karışımlardaki Amaranth, Ponceau 4R, Sunset Yellow, Tartrazin ve Brillant Blue boyalarının birlikte tayini için basit ve hassas kinetik spektrofotometrik yöntemi kullanmışlardır. Her bir boya için deteksiyon limiti 0,04-0,50 µg/mL aralığındadır. Gıda maddelerindeki 5 boyanın birlikte tayini için bu yöntem kullanılmış ve sonuçlar referans HPLC yöntemiyle karşılaştırılmıştır[31].

Gülderen Yentür ve arkadaşları yaptıkları araştırmada Ankara piyasasından sağlanan reçel, meyveli yoğurt, meyve suyu, alkolsüz içecek, elma şeker örneklerinden oluşan toplam 160 gıda maddesinde bazı sentetik boyaların saptanmasını amaçlamıştır. Bütün örneklerde Tartrazin, Quinoline Yellow, Sunset Yellow FCF, Carmoisine, Ponceau 4R, Indigotin sentetik boya maddeleri yün boyama ve kağıt kromotografisi yöntemi ile kalitatif olarak saptanmıştır. Kantitatif tayin için ise birinci derece türev spektrofotometrik yöntemi kullanmışlardır. 11 adet alkolsüz içecek örneğinde Ponceau 4R ve Carmoisine boyalarının ortalama değeri 49,2405±0,0002 mg/L olarak bulunmuştur. A ve B pastanelerine ait elmalı şekerlerde Ponceau 4R'nin ortalama düzeyleri ise sırasıyla 2265,3140±36,0215 mg/kg ve 584,4700±3,5281mg/kg olarak saptanmıştır[32].

A. Zalacain ve arkadaşları safrandaki yapay boyaların (Naftol sarısı, Tartrazin, Kinolin sarısı, Sunset yellow, Allura red, Amaranth, Azorubin, Ponceau 4R ve Red 2G) belirlenmesi için tarama metodu tanımlamışlardır. Bu yöntem poliamid SPE kolonunda matriks bileşenlerin ayrılmasını ve sonra belirlenmesini içerir. Metanol ile yıkanan kolondan sırasıyla aseton ve metanol ile elüsyon edilen boyalar metanol/amonyak (95/5) çözücü karışımı ile analiz edilmiştir ve türev spektroskopisi ile boyalar tayin edilmiştir. Eritrosinin absorbansı pH'a bağlı olduğundan bu koşullar altında tespit

edilememiştir. Her bir boya için en düşük tespit miktarının kimyasal yapıyla değişiklik gösterdiğini belirtmişlerdir[33].

Erdal Dinç ve arkadaşları, Sunset Yellow, Tartrazin ve Allura Red içeren sentetik karışımların ve toz içeceklerin analizini farklı kemometrik yöntemler (PLS, PCR) ve türev spektrofotometrik yöntemler ile herhangi bir kimyasal ayırma işlemi uygulamadan yapmışlardır. 325-584 nm arasındaki spektral bölgede bulunan 7 noktadaki absorbans değerlerinden faydalanarak kemometrik yöntemlerden yararlanmışlardır. Sonuçlar birbiriyle karşılaştırılarak değerlendirilmiştir[34].

Khesorn Nantachit ve arkadaşları ambalajlı 10 üzüm suyu paketi örneğini analiz etmişlerdir. 4 örnekte izin verilmemiş organik sentetik boya saptanmış ve 2 örnekte izin verilen boya saptanmış fakat bulunan değerlerin izin verilen değerlerin üstünde olduğunu belirtmişlerdir. Diğer 4 örnekte ise organik sentetik boya bulunmamıştır. Bu boyalar kağıt kromotografisi ile tanımlanmıştır. 4 çözücü kullanılarak ve boyaların görünür bölge absorpsiyon pikleriyle izin verilen standart boyaların piklerinin karıştırılmasıyla yapılmıştır. Görünür bölge spektrofotometrik yöntemiyle boyaların miktarları belirlenmiştir ve bir örnekte indigo karmin 88 µg/mL ve karmosin 320,9 µg/mL bulunmuştur. Bu yöntem ortalama geri kazanımın % 111,7 bağıl standart sapmanın 9,2 ve deteksiyon limitinin 2 µg/mL olduğunu göstermiştir[35].

Mohammed Reza Oveısı ve arkadaşları Ponceau 4R, Ponceau 6R, Scarlet GN içeren gıda boya karışımlarını spektrofotometri yöntemiyle kimyasal ayırma yapmadan bir arada tayin etmişlerdir. 3 bileşenli boya karışımlarının 60 tanesi değerlendirilmiş ve spektrumlar yedi deneysel noktanın kullanımıyla düzeltilmiştir. Çözeltilerin 300-650 nm'de 1. ve 2. türev absorpsiyon spektrumu kaydedilmiştir. Tüm deneylerden elde edilen veriler PLS metodu ile analiz edilmiş ve önerilen yöntem 2 ticari gıda ürünündeki boyaların analizi için uygulanmıştır[36].

T.M. Coelho ve arkadaşları fotoakustik spektroskopisini (PAS) boyalı gıda örneklerine uygulamışlar ve 1. türev spektrofotometrisiyle karşılaştırmışlardır. Brillant Blue (B), Sunset Yellow (S) ve Tartrazin (T) boyaları genel gıda boyalarıdır. Spektrofotometrik tayin için adsorbe edilen boyalar dimetilformamid kullanılarak geri kazanılmıştır. PAS yöntemi oldukça hassasiyet gösterir. Deteksiyon limitleri Sunset Yellow ve Tartrazin

karışımında sırasıyla Sunset Yellow ve Tartrazin için 0,028 µg/mL ve 0,086 µg/mL, B+T karışımında B ve T için sırasıyla 0,012 µg/mL ve 0,068 µg/mL'dir. Tüm boyalar için kabul edilebilir rölatif hata değerleri spektrofotometrik yöntem için yaklaşık % 0,3-3,6; PAS yöntemi için ise yaklaşık %0,1-2,9'dur. Ticari gıdalardaki seçilmiş boyaların tayininde bazı avantajlarıyla birlikte PAS tekniğinin uygulanabileceğini belirtmişlerdir[37].

2.2.8.2.2 Kromotografik Yöntemler

Khanavi ve arkadaşları, gıda renklendiricilerinin (Tartrazin, Kinolin Sarısı, Sunset Sarısı, Karmosin, Ponso 4R, Allura Red, İndigotin ve Brilliant Blue) aynı anda tayini için green kromatografik yöntem geliştirmişlerdir. Geliştirilen yöntemde sabit faz olarak C_{18}, mobil faz olarak ise 0,25% v/v Triton X-100 içeren 50mM fosfat tamponu (pH=7) karışımı kullanılmıştır. Metod; seçicilik, doğrusallık, duyarlılık, doğruluk yönünden ve ayrıca LOD ve LOQ değerleri de dikkate alınarak valide edilmiştir. Renklendiricilerin LOD ve LOQ değerleri sırasıyla; Allura Red için 0,17 µg/mL ve 0,52 µg/mL, Kinolin Sarısı için 1,91 µg/mL ve 5,79 µg/mL arasında çeşitlilik göstermiştir. 22 örnekte bulunan renklendiricilerin tayininde metodun uygulanabilirliği doğrulanmıştır[38].

Yoshioka ve Ichihashi yaptıkları çalışmada, içeceklerde ve şekerlermelerde bulunan 40 çeşit gıda renklendiricisinin fotodiode-array dedektörü kullanarak HPLC'de ters faz kromatografi yöntemle tayinini gerçekleştirmişlerdir. İçecek ve şekerlemelerde bulunan renklendirici karışımlarının geri kazanım değerleri 5 µg/g konsantrasyonu için 76,6-115% arasında çeşitlilik göstermiştir ve bağıl standart sapma değeri 6%'dan küçük bulunmuştur. LOD ve LOQ değerleri ise 0,03 ve 0,1 µg/g arasında çeşitlilik göstermiştir[39].

Katerina S. Minioti ve grubu, suda çözünebilen 13 sentetik gıda renklendiricisinin analizini diode-array dedektör ile ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografisini (HPLC) kullanarak uygulamışlardır. 13 sentetik gıda renklendiricisinin (Tartrazin, Kinolin Sarısı, Sunset Yellow, Carmoisine, Amaranth, Ponceau 4R, Eritrosin, Red 2G, Allura Red, Patent Blue, İndigo Carmine, Brilliant Blue ve Green S) tayini için ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi başarıyla geliştirilmiştir. Sabit faz olarak C_{18} kullanılırken mobil faz da asetonitril-metanol karışımı ile pH 7,5 amonyum asetat tampon çözeltisi içermektedir. 29 dakika içinde optimize edilmiş bir elüsyon gradyanı

kullanılarak tüm bileşikler başarılı bir ayırma ile elde edilmiştir. 350-800 nm arasında renklendiricileri izlemek için diode-array dedektörü kullanılmıştır. Yöntem özellikle şekerleme ve tatlılarda, meyve aromalı içecekler, alkollü içecekler, reçel, şeker gibi çeşitli suda çözünür gıdalarda renklendiricilerin tayininde uygulanmıştır[40].

M.C. Gennaro ve çalışma grubu, ev yapımı tatlıları süslemede kullanılan şekerlemelerde kullanılan kırmızı renklendiricilerin iyon etkileşimi yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile belirlenmesini ve tayinini incelemişlerdir. Özellikle Carmoisine, Amaranth ve Ponceau 4R içeren gıdalar, özel bir ilgi ile 1976 yılında ABD Gıda ve İlaç İdaresi tarafından, 1977 yılında İtalyan mevzuatınca yasaklanan ve sonra tekrar 1994 yılında Avrupa Topluluğu (94/36 EEC Direktifi) tarafından kısıtlamalar dahilinde izin verilen Amaranth içeren gıdalar incelenmiştir. Bu yöntem Fransa ve İtalya'da üretilen iki ticari ürüne uygulanmış ve sonuçlar EEC Direktifi ışığında tartışılmıştır[41].

Eliane C. Vidotti ve grubu, gıda örneklerinde renklendiricilerin tayini için yeşil kromatografik yöntem geliştirmiştir. Tartrazine, Brilliant Blue ve Sunset Yellow içeren gıda numunelerinin yeşil kromatografik yöntem kullanılarak elde edilen sonuçlar, klasik spektrofotometrik yöntem kullanılarak elde edilenler ile uyum içinde olduğu belirtilmiştir[42].

Garcia-Falcon ve Simal-Gandara yaptıkları çalışmada, alkolsüz aromalı içeceklerde doğal renklendiriciler ile birlikte kullanılan Tartrazin, Kinolin Sarısı, Sunset Yellow F.C.F, Azorubin ve Ponceau 4R sentetik gıda boyası miktarlarının belirlenmesi amacıyla 9 adet numuneyi HPLC yöntemi ile analiz etmişlerdir. Yapılan analizlerde numunelerde bulunan sentetik gıda boyası miktarlarının 1994 Avrupa Birliği Direktiflerinde (94/36/EC), belirtilen maksimum miktardan düşük olduğunu saptamışlardır[43].

Martha Kurchaska ve Jan Grabka sentetik boyar maddelerin analizi için kromatografik yöntemler üzerinde yapılan çalışmaları derlemişlerdir. Yapılan çalışmalar sonucunda bilgi verilen yöntemler şunlardır; ince tabaka kromatografisi, yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi, kolon kromatografisi, yüksek performanslı sıvı kromatografisi. Buna iyon ve yüksek performanslı iyon kromatografisi yöntemlerini de dahil ederek çalışmalarını tamamlamışlardır[44].

Nidal A. Zatar suda çözünen gıda boyalarının (Tartrazin E102, Kinolin E104, Sunset

Yellow E110, Karmosin E122, Ponceau 4R E124, Eritrosin E127, Karmin E132 ve Brillant Blue FCF E133) bir arada kantitatif analizi için seçici gradient iyon çifti ters faz HPLC yöntemini geliştirmiştir. Analiz Lichroser 100RP C_{18} kolonunda gerçekleştirilmiştir. Mobil faz akış hızı 1 ml/dk ve enjeksiyon hacmi 50 µL'dir. Mobil faz su/asetonitril (1:1, v/v) çözücü karışımından oluşur ve 0,35M trimetilamonyum bromür (CTAB) içerir ve mobil faz A pH 7 tamponu olup mobil faz B ise su/asetonitrildir. Bu yöntem çeşitli içecek ve gıda örneklerindeki boyaların tayini için uygulanmıştır[45].

Narumal Vachirapatama ve arkadaşları alkolsüz içecek ve gıda maddelerinde kullanılan 7 sentetik boyayının kantitatif analizini (Amaranth, Ponceau 4R, Sudan Red 1, Tartrazin, Sunset Yellow FCF, Fast Green FCF ve Brillant Blue FCF) HPLC yöntemi ile gerçekleştirmişlerdir. Mobil faz olarak farklı pH'larda asetat tamponu içinde metanol/su çözücü karışımını kullanmışlardır ve her bir boya için maksimum dalga boyunda ölçüm alınmıştır. Alıkonma zamanı, pik alanı ve pik yüksekliğine ilişkin standart sapmalar sırasıyla % 0,18-0,83; % 0,44-3,49; % 0,49-3,56 olarak bulunmuştur. Deteksiyon limiti ise bu boyalar için sırasıyla 3,38, 2,89, 2,6, 1,92, 3,83, 1,23, 1,56 µg/mL'dir. Bu sonuçlar Tayland'da bazı yiyecek ve içecek örneklerindeki boya konsantrasyonunun maksimum sınır limitinin üzerinde olduğunu göstermiştir[46].

Ksileva gıdalardaki 10 sentetik boyanın ayrılması ve tayininde C_{18} kolon ve iyon çift reaktifi olarak tetrabütilamonyum dihidrojen fosfat kullanılan HPLC yöntemi önermiştir. Bu çalışmanın amacı 7 sentetik suda çözünebilir boyanın bir arada tayini için ters faz yüksek performans sıvı kromotografi metodu geliştirmektir. Gıda boyalarının tamamen ayrılmasını sağlamak için C_{18} kolonu ve mobil faz olarak katyonik yüzey aktif madde iyon çifti oluşturan N-trimetilamonyum bromür kullanılır. Bu yöntem alkolsüz meyve aromalı konsantre içecekler, reçeller, tatlılar ve şekerlemeler gibi çeşitli gıda ürünlerindeki boyaların kantitatif analizi için uygulanmıştır[47].

2.2.8.2.3 Diğer Yöntemler

S.Chanlon ve çalışma grubu, şekerleme ve içeceklerde Carmoisine, Ponceau 4R ve Allura Red'in tayini için Diferansiyel Puls Polarografik yöntemini kullanmışlardır. Carmoisine, Ponceau 4R, Allura Red gibi azo grubu içeren sentetik boyalar, şurup, soda ve tatlılara genellikle kırmızı renk vermek için kullanılır. Bu boyalar Diferansiyel Puls

Polarografisi kullanılarak elektroaktif olmayan doğal boyalardan kolaylıkla ayırt edilir. pH=9 fosfat tamponu kullanımı ile renklendiricilerin veya pikleri ayrılmış ve geri kazanımın % 96-105 oranında olduğu belirtilmiştir. Elde edilen sonuçlar sıvı kromatografisi ile karşılaştırılmış ve daha iyi sonuç alındığını belirtmişlerdir[48].

Chen B. ve arkadaşları gıdalarda bulunan suda ve yağda çözünebilir olan sentetik renklendiricilerin tayini için yüksek performans sıvı kromotografisi ve dedeksiyon-elektro sprey mass spektrometriyi kullanmışlardır[49].

Richard A. Frazier ve arkadaşları, gazlı alkolsüz içeceklerdeki boyaların, koruyucuların ve yapay tatlandırıcıların eş zamanlı testi için hızlı kapiler elektroforez yöntemini geliştirmişlerdir. Kapiler elektroforezin kapasitesi onu alkolsüz içeceklerin çok bileşenli karışımları için ideal analiz tekniği yapmıştır[50].

Otto DOKA ve arkadaşları UV-VIS fotoakustik (PA) spektroskopi yöntemiyle efervesan multivitamin tabletlerde bulunan Sunset Yellow (E110)'un tayinini gerçekleştirmişlerdir. E 110 içeren toz haldeki tabletlerde ölçümler, sentetik boyanın absorbans yaptığı 480 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Elde edilen PA bilgileri difüzyon yansıtma spektroskopi yöntemi ve geleneksel spektroskopi yöntemi ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmıştır. PA tekniğinin en önemli kolaylığı hızlı yanıt ve örnekleme kolaylığıdır[51].

2.2.9 Kullanılan Yöntemler

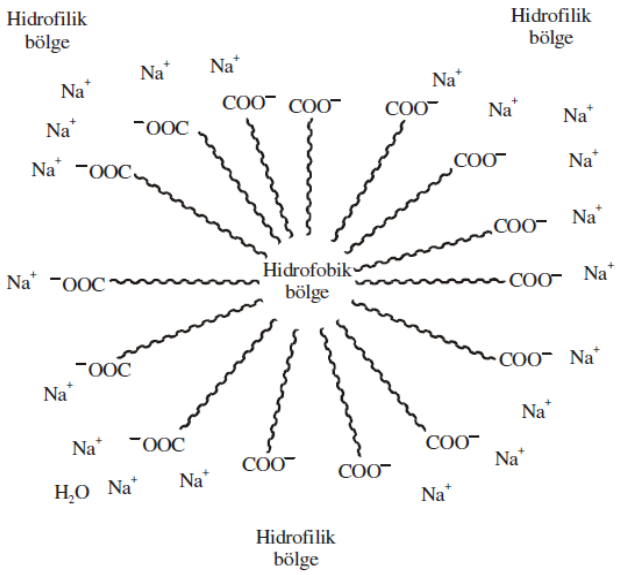
2.2.9.1 Bulutlanma Noktası Ekstraksiyonu Sonrası Türev Spektrofotometrisi

2.2.9.1.1 Bulutlanma Noktası Ekstraksiyonu

2.2.9.1.1.1 Bulutlanma Noktasına Ekstraksiyonu Yöntemindeki Bazı Kavramlar

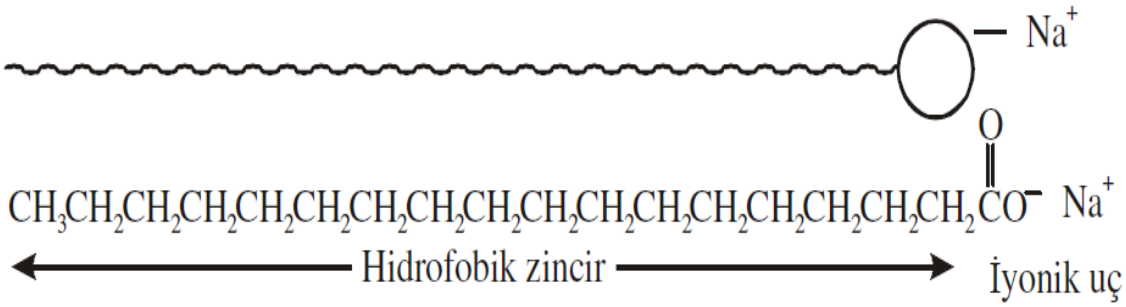
Misel Oluşumu: Misel yapılarının en çok kullanıldığı alanlardan olan temizlik sektöründe kullanılan sabunlar misellerden oluşmuştur[52]. Kimyasal olarak sabunlar; yağ asitlerinin sodyum veya potasyum tuzlarıdır. Negatif yüklü karboksilat grubu hidrofilik, uzun hidrokarbon zincirli grubu ise hidrofobik bir yapıya sahiptir. Bu iki yönlü özelliklerinden dolayı yüzey aktif maddeler temizleyici ve deterjan formülasyonlarında,

yüzey gerilimi modifikasyonu, emülsiyon, köpük ve bulut noktası oluşumu amacıyla kullanılırlar. Yüzey aktif maddeler; spektroskopi, elektroanalitik kimya ve ayırma teknikleri alanında kullanılmışlardır[53]. Su içerisinde sabun bulutsu bir haldedir bunun nedeni misellerdir. 100-200 arasında sabun molekülü polar (karboksilat su seven) başları ile birlikte yüzey üzerine tutunarak toplanır ve bu yapı hidrofobik uçlar aracılığı ile çevrelenir. Polar uç özelliğine sahip olan uzun zincirli karboksilatlar sulu çözeltiler içerisinde bir araya gelerek küresel yapılar oluştururlar. Bu yapılar misel olarak isimlendirilir[54].



Şekil 2. 4 Çözelti ortamında misel yapısı [52]

Ortadaki kısım su sevmeyen hidrofobik bölgeyi temsil etmektedir. Uçlarda bulunan kısımlar ise su seven kısım olarak isimlendirilmektedir.



Şekil 2. 5 Misel yapısı açık formülü gösterimi [54]



Şekil 2. 6 Misel yapısı kapalı formülü gösterimi [54]

Yüzey Aktif Maddeler: Tipik bi yüzey aktif madde, R; 8-18 karbonlu hidrokarbon zinciri, X; polar ya da iyonik bir grup olmak üzere R-X yapısına sahiptir. Hidrofilik grubun türüne göre yüzey aktif maddeler, iyonik olmayan, katyonik, anyonik ve amfoterik (ikiz iyonik) yüzey aktif maddeler olmak üzere 4 gruba ayrılır[55].

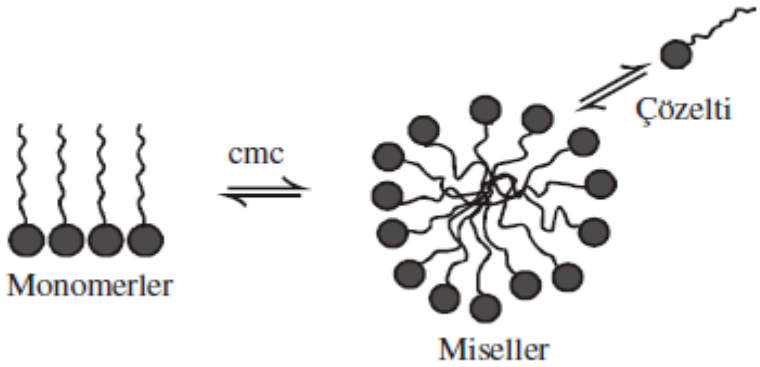
Yüzey Aktif Maddelerin Sınıflandırılması: Yüzey aktif maddeler molekülün yüzey aktif kısmıyla taşınan yüke göre anyonik, katyonik, non-iyonik ve amfoterik olarak sınıflandırılırlar. Ayrıca yüzey aktif maddeler, sık sık teknolojik uygulamaları ile ilişkili olarak adlandırılır, bu yüzden deterjan, ıslatıcı ajan (wetting agent), emülsiye edici ve dağıtıcı (dispersant) gibi isimler alırlar.

Çok iyi çözünebilen yüzey aktif maddelerin (sabunlar, sentetik deterjanlar ve boyalar) hidrofilik kısmı, çoğunlukla iyonik gruptur. Çizelge 2.7'de yüzey aktif madde çeşitlerine bazı örnekler verilmiştir.

Çizelge 2. 7 Yüzey aktif madde çeşitleri [56]

	Yük	**Ürün İsmi**	**Ürün tipi**
Katyonik	+	CTAB (Hekzadesil-trimetil-amonyum bromür)	Sülfoksüksinatlar, Amonyum tuzları
Anyonik	-	TRİTON ve DOWFAX	Sülfatlar, Sülfonatlar, Disülfonatlar, Fosfat esterleri
İyonik olmayan	Yüksüz	TRİTON™ ve TERGİTOL™	Etoksilatlar, Glikositler
Amfoterik	+/-	Euroquat LA 47	Dodesil betain

Kritik Misel Konsantrasyonu (CMC): Bulutlanma noktası değerine ulaşıldığı vakit çözelti tek fazlı halden iki fazlı hale geçer. Bu noktadaki yüzey aktif madde konsantrasyonu kritik misel konsantrasyonu olarak (CMC) isimlendirilir[51]. Yapılan çalışmalarda yüksek verim elde edebilmek amacı ile kullanılması gereken yüzey aktif madde konsantrasyonu belirli bir değerin üzerinde olmalıdır. Kritik misel konsantrasyonu olarak isimlendirilen bu değer çözelti ortamında yüzey aktif maddenin misel oluşturabilmesi için gerekli olan minimum konsantrasyon değerini temsil eder. Bu değer birçok parametreye bağlı olarak değişim gösterir (pH, sıcaklık, tuz-iyon türü vs). Çözelti ortamında kompleks oluşumu ve oluşan kompleksin misel ortam içine hapsedilmesi verim üzerinde en önemli rolü oynar. Çeşitli çalışmalarda farklı non-iyonik yüzey aktif maddelerin yapı, isimlendirme ve CMC değerleri gösterilmektedir. Burada dikkat edilmesi gereken husus CMC değerinin ortamda çeşitli ilaveler ve safsızlık olması durumunda değişebileceği gerçeğidir[56].



Şekil 2. 7 Kritik misel konsantrasyonunu aşan misel monomerlerinin çözelti içerisinde öbeklenmesi [57]

Kraft Noktası: Misel oluşturan yüzey aktif maddelerin çözünürlükleri Kraft noktası olarak bilinen belli bir sıcaklığın üzerinde artar. Bu davranış, miseller yüksek derecede çözünebilir özellik gösterirken, birleşmemiş yüzey aktif maddenin sınırlı çözünürlüğe sahip olması ile açıklanır.

Kraft sıcaklığının altında yüzey aktif maddenin çözünürlüğü miselleşme için yetersizdir. Sıcaklık arttırıldığında, çözünürlük kraft sıcaklığında CMC'ye ulaşıncaya kadar yavaşça artar ve kısmen çok miktarda yüzey aktif madde misel formunda dağılabilir. Bunun sonucunda çözünürlükte büyük bir artış gözlenir[58].

Bulutlanma Noktası: Sulu fazın ve yüzey aktif maddenin ayrılmaya başladığı sıcaklık noktasıdır. Bu noktada çözelti bir bulut şeklinde görülmektedir[59].

2.2.9.1.1.2 Misel Ortam Özütleme Metodu

Eser madde analizi için misel ortam özütleme işlemi hem madde tayinini gerçekleştirmekte hem de zenginleştirme işlemlerini sağlamaktadır.

Misel ortam özütleme işleminin sahip olduğu avantajlar:

- Verimi yüksek ayırma işlemleri gerçekleştirilmektedir.
- Zenginleştirme faktörü yüksek olan ayırma işlemleri yapılmaktadır ve çeşitli uygulamalar için çok çeşitli alternatif şartlar hazırlanarak istenilen başarıya ulaşmak mümkün kılınmaktadır.
- Yüzey aktif madde kullanımı çevreye karşı sorun oluşturmamaktadır, ticari bulunabilirliği geniş ve maliyeti ucuzdur.
- Biyolojik ve çevresel numunelere rahatlıkla uygulanabilir oluşu kullanım alanını genişletmektedir.

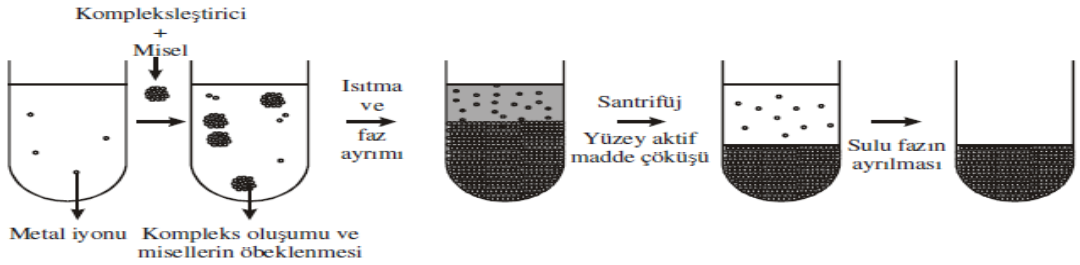
Misel ortam özütleme tekniği, bulutlanma noktası özütleme metodunu da içerir. Bu teknik analitik kimyada ayırma ve zenginleştirme kavramları içinde geniş kullanım alanları dolayısıyla her geçen gün daha fazla ilgi odağı olmaktadır. Özütleme işleminde sistem başarısı miseller ile ayrımı yapılacak yapıların bağ etkileşimlerine, çözünürlüklerine, pH değerlerine, tuz konsantrasyonuna bağlı olarak değişir[57].

2.2.9.1.1.2.1 Misel Ortam Özütleme Metodu Uygulanışı ve Kullanım Alanları

Ayrılması istenilen maddeyi içeren çözelti ortamına kompleksleştirici kimyasal ilave edilerek iyon ya da molekül tutulur. Ardından ortama konulan yüzey aktif madde aracılığı ile su içerisinde hidrofobik bir hücre oluşturulur. Ayrımı yapılacak olan maddeye bağlı olarak oluşturulan özel şartların ardından (pH, sıcaklık, tuz konsantrasyonu, ilave kimyasal maddeler vs.) hedef yapı miseller içerisinde hapsedilerek çözeltide bulunan yüzey aktif maddenin yapısına göre bulutlanma noktası değerine kadar çözelti ortamı ısıtılır. Çözelti ortamı bulutlanma değerine ulaşıldığında

iki ayrı faz oluşur. Bu faz oluşumunun ardından santrifüj işlemi yapılarak fazlar net biçimde birbirinden ayrılır. Bu sayede hedef yapı ortamdan ayrılmış, ilk etapta bulunduğu çözelti hacmine göre çok daha küçük bir hacim içerisine hapsedilmiş olur. Misel ortam özütleme metodu tersinir bir olaydır. Yani çözelti ortamında faz ayırımını yapmadan soğutmak suretiyle ortam tekrar tek fazlı hale döndürülebilir[57, 60].

Metal analizlerinde, çevresel çalışmalarda, biyolojik alanda ve tıp dünyasında misel ortam özütleme metodu uygulamaları sıkça rapor edilmiştir.



Şekil 2. 8 Misel ortam özütleme metodu [57]

2.2.9.1.1.3 Konsantrasyon Faktörü (CF)

Konsantrasyon faktörü (CF) misel ortam özütleme metodunda zenginleştirme faktörü değerini temsil eder. Süreç sonucu verim hesabının yanında zenginleştirme işlemindeki başarının hesabı, konsantrasyon faktörü aracılığı ile yapılabilir[60]. Zenginleştirme faktörünün yüksek olması için düşük hacimli yüksek konsantrasyonlu yüzey aktif madde kullanılmalıdır. Bu anlatılan basit işlem çeşitli kompleksleştirici, organik madde, değişken pH değerleri, konsantrasyon rakamlarındaki çeşitlilikler sayesinde belirli amaçlar için kullanılabilecek bir sistem haline dönüştürülebilir. Zaten günümüzde bulutlanma noktası ile özütleme birçok alanda özel amaçlar için kullanılmaktadır[61].

2.2.9.1.1.4 Bulutlanma Noktası Ekstraksiyonu ve Önemi

Eser madde tayinlerinde karşılaşılan iki temel sorundan biri, kullanılan yöntemin duyarlığının analitin derişimi için yeterli olup olmadığı, diğeri ise girişim etkilerinin bulunup bulunmadığıdır. Bu sorunlardan birincisi tayin işleminden önce bir zenginleştirmenin yapılmasını ikincisi ise genellikle bir ayırma işleminin yapılmasını gerektirir. Uygulamada ise genellikle yapılan bir ayırma işlemi aynı zamanda

zenginleştirme işleminin de gerçekleşmesini sağlayabilmektedir. Son yıllarda eser madde analizlerinde ayırma ve zenginleştirme amacıyla misel çözeltilerinin kullanıldığı CPE'nin önemli uygulama alanları bulduğu görülmektedir[14, 24, 27].

Miura ve arkadaşlarının 1976 yılında uyguladığı bu sıra dışı yöntem diğer ekstraksiyon türlerine göre oldukça avantajlıdır; uygulaması kolay ve ekonomiktir[62]. CPE ile ayırma şu esasa dayanmaktadır: Bazı yüzey aktif maddelerinin sulu çözeltileri sıcaklık veya basıncın değişmesiyle ya da çözeltiye uygun bir maddenin ilave edilmesiyle bulanık hale gelerek iki faza ayrılır. Bu fazlardan küçük hacimli olanı yüzey aktif maddece zengin olan faz olup analiti veya metali (organik veya inorganik türler) içerirken büyük hacimli olanı ise seyreltik sulu çözeltiyi oluşturur.

Genel olarak fazların ayrılması sıcaklığın arttırılması ile gerçekleştirilir. Düşük sıcaklıkta her bir yüzey aktif madde molekülü su molekülleri ile sarılır. Sıcaklık arttığı zaman, entropi artışı ile bu örgü bozulur ve yüzey aktif madde molekülleri arasındaki zayıf Van der Waals kuvvetleri üstün gelerek faz ayrımı meydana gelir[63].

Yüzey aktif maddeler, sıvı-sıvı ekstraksiyonda kullanılan organik çözücülerin aksine alev almazlar, uçucu değildir ve zehirsizdirler. Diğer bir avantajı ise yüksek zenginleştirme faktörleri elde etmek için büyük numune hacimlerine ihtiyaç duymamasıdır. Çok sayıda metal, küçük hacimli (0,2-0,5 mL) yüzey aktif maddece zengin fazda toplandığı için kantitatif geri kazanım sağlanır ve yüksek zenginleştirme faktörleri elde edilir[55].

2.2.9.1.1.5 Bulutlanma Noktası Ekstraksiyonuna Etki Eden Faktörler

2.2.9.1.1.5.1 Sürfaktan seçimi

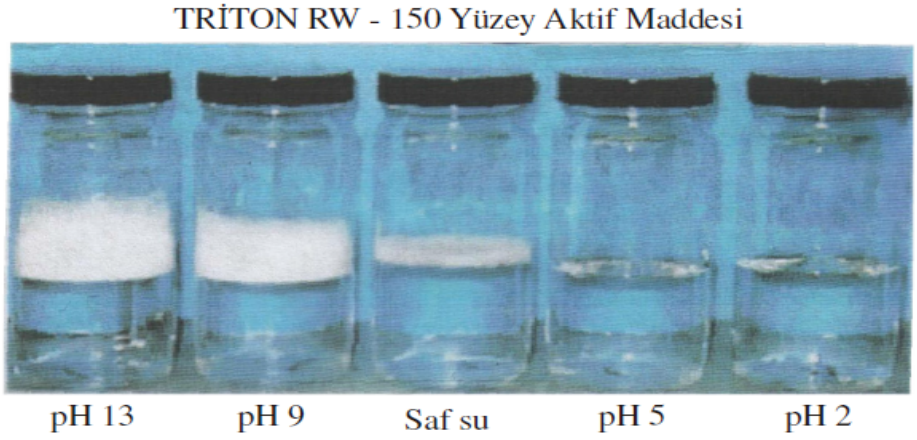
Kullanılan sürfaktanlar çoğunlukla noniyoniktir. Çünkü iyonik sürfaktanların bulutlanma noktası sıcaklıkları genellikle 100°C'nin üstünde ve oldukça yüksektir. Yüksek bulutlanma noktası sıcaklığı deneysel şartları zorlaştırmaktadır.

Literatürde bu amaçla kullanılan sürfaktanlar incelendiğinde en çok Triton X-45, Triton X-100, Triton X-114 ve Ponpe 7,5 sürfaktanlarının kullanıldığı görülülür. Bu sürfaktanların gözlenen bulutlanma noktası sıcaklıkları sırasıyla, 35˚C, 65˚C, 45˚C ve 45˚C'dir.

Ekstraksiyonun etkinliği, belli bir değere kadar sürfaktan derişimi ile artar ve genellikle bu değerde maksimum nicel geri kazanım gözlenir. Sürfaktan derişimi hem ekstraksiyon etkinliğini hem de zenginleştirme faktörünü etkiler. Maksimum zenginleştirme faktörü elde edebilmek için sulu faz/sürfaktanca zengin faz hacmi oranı olabildiğince büyük olmalıdır. Bu nedenle sürfaktan hacmi minumum değerde tutulmalıdır. Ancak sürfaktan derişimi çok da az olursa kiritik misel derişimine ulaşılamayacağı için faz ayırımı gözlenmez. Bu nedenle iyi kontrol edilip optimize edilmelidir.

2.2.9.1.1.5.2 Ortamın pH değeri

Organik ve inorganik moleküllerin misel ortam içerisine çekilerek istenilen verime ulaşılmasında ortam pH'sı büyük önem taşır[57]. Ortam pH değeri asidik bölgeye kaydıkça ortamdaki "+" yüklü iyon miktarı artmakta ve bu durum yüzey aktif maddenin hidrofilik (su seven) baş kısmının çözelti ortamı içerisinde aktivitesini engelleyici etki göstermektedir. Ancak bu etki yüzey aktif madde çeşidine göre değişim gösterir. Şekil 2.9 pH değerinin Triton RW-150 isimli yüzey aktif maddesi üzerine etkisini net olarak göstermektedir.



Şekil 2. 9 Triton RW-150 isimli yüzey aktif maddesi üzerinde pH etkisi

2.2.9.1.1.5.3 Yüzey aktif madde konsantrasyonu

Yüzey aktif madde konsantrasyonu bulutlanma noktası özütleme metodunu etkileyen önemli parametrelerden birisidir. Yapılacak ayırma işlemleri için en verimli yüzey aktif

madde konsantrasyonu değeri dar bir aralıkta gözlemlenir. Eğer yüzey aktif madde konsantrasyonu değeri olması gerekenin altında olursa misel oluşumu yeterince gerçekleşmez ve elde edilecek verim değeri düşer. Şayet yüzey aktif madde konsantrasyonu fazla tutulursa bu sefer yüzey aktif maddece zengin fazın hacmi artacağı için zenginleştirme faktöründe azalma olur. Bulutlanma noktası özütleme metodunda ortamda bulunan ayrılması düşünülen maddenin ortamdan ayrılma verimini arttırmak amacıyla yüzey aktif madde konsantrasyonunu düşürerek zenginleştirme faktörünü arttırma amacı güdülebilir. Ancak artan zenginleştirme faktörü; işlemin uygulanabilirliğini, tekrarlanabilirliğini ve verimliliğini ters orantılı olarak etkilemekte, zenginleştirme faktörü artışına bağlı olarak tekrarlanabilirlik değeri azalmaktadır[61].

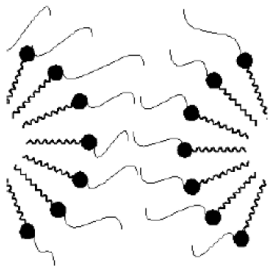
2.2.9.1.1.5.4 Bekleme süresi ve sıcaklık

Ortamda bulunan türlerin etkileşim zamanını arttırmak metodun başarısını da arttırmaktır. Belirlenen şartlar altında kompleksleşme reaksiyonunu tamamladıktan sonra bekleme süresinin çok fazla arttırılması, ekstraksiyon verimi üzerinde önemli bir değişiklik yaratmamıştır. Birçok çalışmada reaksiyon için kullanılan zaman en az on dakika olarak tespit edilmiştir[57, 60]. Bunun yanında otuz dakikanın üzerindeki denge zamanlarının özütleme verimi üzerinde çok büyük değişikliklere sebep olmadığı görülmüştür[61].

Diğer taraftan, bütün yüksüz yüzey aktif maddelerin faz hacim oranları denge sıcaklığı arttıkça genellikle azalır. Önderiştirme faktörlerinde en büyük değerler genellikle yüzey aktif maddenin bulutlanma noktasının üstünde sıcaklık değerlerinde gerçekleştirilen CPE ile elde edilir. Yüzey aktif maddenin karakteristik özelliğine bağlı olarak tespit edilen bulutlanma noktası değerinin çok üzerindeki sıcaklıklar verim açısından ters etki gösterebilir[60]. Bunun sebebi, sıcaklığın artmasıyla hidrojen bağlarının bozulması ve dehidrasyon oluşması olarak açıklanır. Sıcaklığın artmasıyla, yüzey aktif maddece zengin fazdaki su miktarı azalır, böylece bu fazın hacmi düşer. Yüksek önderiştirme faktörü değerleri elde etmek için, bulutlanma noktası sıcaklığından daha yüksek bir sıcaklıkta çalışılması önerilmektedir[64].

2.2.9.1.1.5.5 İyonik güç

Ortama tuz eklendiği zaman misel boyutunun ve toplanma kat sayısının artması beklenir[65]. Tuz ilavesinde; iki ayrı yüzey, Van der Waals kuvvetleri, itme kuvvetini geçene kadar birbirine yaklaşır ve birleşir. Ara bir şiddette iki kuvvet birbirine eşit olur ve damlalar bir çap uzunluğu kadar birbirinden ayrı kalır. Diğer bir deyişle, emülsiye edici iyonikse, ortama tuz ilave edilmesi emülsiyon kararlılığına etki eder. Düşük tuz derişimi kararlılığı çoğaltır; yüksek tuz derişimi ise flokülasyonu ve/veya agregasyonu (birleşmeyi) arttırır. Emülsiyon kararlılığını; hidrofobik yapıların ara yüzde hareketsiz tabaka oluşturmaları veya katı bir arayüz filmi oluşturmaları nedeniyle, birbirleriyle temas edememeleri olarak açıklanabilir (sterik engel).



Şekil 2. 10 Arayüzde hidrofilik yapılarla suyun (hidrofobik yapı) sterik engel oluşturması

2.2.9.1.1.5.6 Faz Ayırımı Kolaylaştırıcı Katkı Maddeleri

Çoğu durumda ekstraksiyon ortamına bir organik çözücü ya da inorganik tuz eklenmesiyle ekstraksiyon etkinliği artar. Sürfaktan ortama etanol eklendiğinde bulutlanma noktası sıcaklığını artırdığı, daha yüksek zenginleştirme faktörü sağladığı bilinmektedir[66].

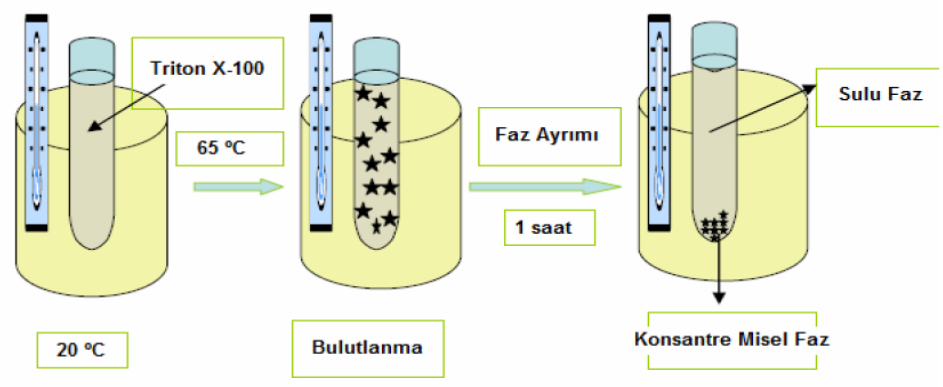
Sürfaktan ortama inorganik tuzlar eklendiğinde ise, polioksietilen grupların dehidratasyonu yüzünden bulutlanma noktası sıcaklığını azaltmaktadır. Ayrıca inorganik tuzlar sürfaktan kümeleri ve analit iyonları arasındaki hidrofobik etkileşimleri artırmakta ve bu sayede analitik özellikleri iyileştirmektedir.

2.2.9.1.1.6 Bulutlanma Noktası Ekstraksiyonu Yönteminin Uygulanışı

Noniyonik sürfaktan çözeltisi bulutlanma noktası (CP) adı verilen kritik bir sıcaklığın üzerinde ısıtıldığında çözelti kendiliğinden iki ayrı faza ayrılır. Fazlardan birincisi hacmi

küçük olan sürfaktanca zengin faz diğeri ise sürfaktan derişiminin hemen hemen kritik misel derişimine (CMC) eşit olduğu büyük hacimdeki sulu fazdır. Bu ayırma işleminin mekanizması sürfaktan misellerinin bulutlanma noktası olarak tanımlanan bir sıcaklığa kadar ısıtıldığında çözeltinin bulanıklaşmasına dayanır[66]. Uygun bir hidrofobik ligant ya da organik bileşikler ile bir araya gelen metal iyonları misellerin hidrofobik kısımlarıyla etkileşim halindedir. Bu sayede bulutlanma noktasında hidrofobik özellikteki metal-ligant bileşiği küçük hacimdeki sürfaktanca zengin fazda toplanır. Aslında bütün işlem geleneksel sıvı-sıvı ekstraksiyonuna benzer fakat tek fark burada organik faz, homojen bir çözeltinin daha sonra heterojen bir karışıma çevrilmesiyle sulu fazın içinde üretilir(Şekil 2.11).

Misel oluşumu termodinamik özellikleri kullanılarak da anlaşılabilir. Miseller entropi ve entalpi arasındaki bir denge ile eş zamanlı olarak oluşabilir. Suda, sürfaktan moleküllerinin bir araya gelmesi entropiyi düşürmesine rağmen misel oluşumu için yürütücü kuvvet hidrofobik etkilerdir. Kritik misel derişiminin üstünde sürfaktan moleküllerinin bir araya gelmesiyle oluşan entropi artışı su moleküllerinden fazladır. Ayrıca sürfaktanların yüklü kısımları arasında olan elektrostatik etkileşimler entalpik özellikleri değiştirir. Misel oluşumuyla bu termodinamik parametreler noniyonik sürfaktanlar için geçerlidir. Sulu çözeltilerdeki misel oluşum entalpisi çok küçük ya da negatif olabilir. Misel oluşumuna götüren temel kuvvet sürfaktan moleküllerinin hidrokarbon kuyruk kısımlarındaki hidrofobik etkileşimlerden kaynaklanan entropi değişimidir. Bu etkileşim sayesinde miseller bir araya gelerek daha az enerjili hale gelirler.



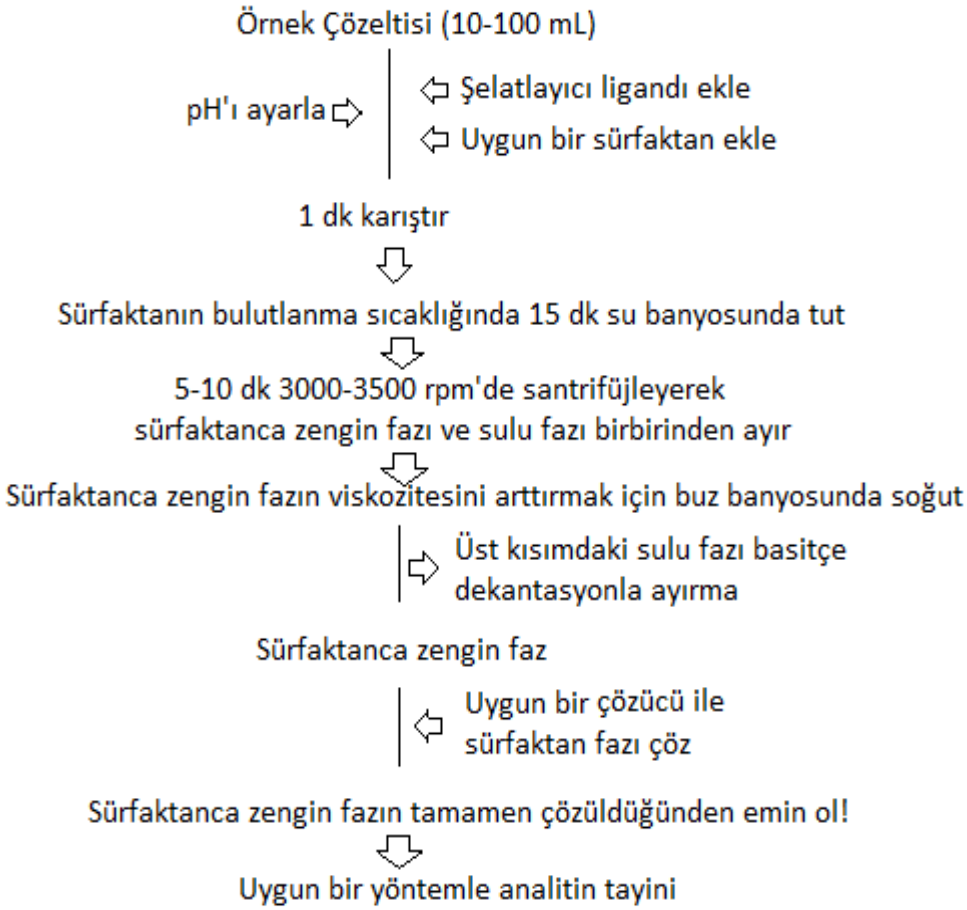
Şekil 2. 11 Bulutlanma noktası ekstraksiyonunun uygulanışı [67]

2.2.9.1.1.7 Bulutlanma Noktası Ekstraksiyonunun Temel Basamakları

Analit-Ligand Kompleksinin uygun şartlarda oluşumu (metaller için)

- Ortama iyonik şiddet artırıcı ve uygun sürfaktanın eklenmesi,
- Su banyosu yardımıyla sürfaktanın bulutlanma noktası sıcaklığına kadar çözeltinin ısıtılması,
- Faz ayırımını kolaylaştırmak için karışımın soğutulması ve santrifüjlenmesi,
- Sürfaktanca zengin faz ve sulu fazın dekantasyonla birbirinden ayrılması,
- Sürfaktanca zengin fazın uygun bir çözücü ile çözülerek sinyal okumaya hazır hale getirilmesi

Yukarıda anlatılan basamaklar Şekil 2.12' da şematik olarak da görülebilir.



Şekil 2. 12 Metallerin zenginleştirilmesinde bulutlanma noktası ekstraksiyonu işlemi akış şeması [68]

2.2.9.1.1.8 Bulutlanma Noktası Ekstraksiyonu Metodunda Modifiye Sistemler Oluşturulması

Özel amaçlı uygulamalar için çeşitli yüzey aktif madde karışımları ya da kimyasal madde ilaveleri kullanılarak modifiye çözelti sistemleri elde edilebilir. Bunun sonucunda sistemde bulutlanma noktası değeri ve özütleme verimi üzerinde oynamalar yapılabilir, istenilen verim elde edilebilir. Yapılan her bir yenilik ve ilave sistemin özel amaçlarda kullanımını kolaylaştırır, uygulanabilirliğini ve tutarlılığını arttırır ve maliyet üzerinde etkili azalmalara sebebiyet verebilir. Örnek bir çalışmada Triton X 45 ile Triton X 114'ün çeşitli oranlarda karışımları oluşturulmuş ve bu karışımların bulutlanma noktası değerinin 4°C ile 22°C arasında gerçekleşmesi sağlanmıştır[53].

Başka bir uygulamada ise %20 gliserol varlığında Triton X 114 ün bulutlanma noktası değeri 10°C daha düşmüştür. Çözelti ortamına ilave edilen tuz yapıları, alkol, yüzey aktif madde karışımları, çeşitli organik veya inorganik kimyasal maddeler bulutlanma noktası değeri üzerinde önemli etkinlikler göstermektedir[61]. Noniyonik yüzey aktif maddelerde hidrokarbon zincirinin uzunluğu azaldıkça ve oksietilen zincir uzunluğu arttıkça bulutlanma noktası değeri artar. Sürekli oksietilen içeren yüzey aktif maddelerde; yüzey aktif maddenin moleküler kütlesi azaldıkça ve/veya hidrofobik grup dallandıkça bulutlanma noktası değeri düşer. Bunun yanında yüzey aktif madde ortamına yapılan çesitli ilavelerle birlikte bulutlanma noktası değeri artar veya azalır. Bu anlatılanları noniyonik yüzey aktif maddeler üzerine yapılan çeşitli ilavelerin CP değerinde ne gibi değişmeler meydana getirdiğini gösteren Çizelge 2.8 daha net biçimde açıklamaktadır.

Çizelge 2. 8 Bazı noniyonik yüzey aktif maddelerin CP değerlerindeki değişmeler [69]

Non-İyonik Yüzey Aktif Madde	İlave Edilen Kimyasal	CP (°C)
PONPE -7,5	-	24,8
	0,1 M KSCN	35,1
	0,5 M KSCN	41,5
	1 M KSCN	43,8

Çizelge 2. 9 Bazı noniyonik yüzey aktif maddelerin CP değerlerindeki değişmeler [69] (devamı)

$C_{12}E_6$	-	47,8
	0,04 M Na_2CO_3	36
	1 M NaCl	41
$C_{12}E_8$	-	74
	%40 Gliserol	62
	%60 Gliserol	43
	6 M Üre	>100
$C_{12}E_{24}$	-	>100

Sulu noniyonik yüzey aktif madde çözeltileri üzerine yüklü iyonik yüzey aktif madde ilavesi sonucu bulutlanma noktası değerlerinde artış gözlenir. Sülfat ve karbonat bileşiklerinin ilavesi bulutlanma noktası değerini azaltırken, iyodat ve tiyosiyonat türlerinin ilavesi bulutlanma noktası değerini yükseltir. Doymuş hidrokarbonların ilavesi genellikle bulutlanma noktası değerini çok fazla etkilemez oysa misel ortam içerisinde çözünebilen nonpolar organik bileşikler bulutlanma noktası değerini yükseltirler. Alifatik alkoller, yağ asitleri ve fenoller gibi polar organik bileşikler bulutlanma noktası değerini önemli ölçüde düşürürler. Tüm bu anlatılanlar doğrultusunda çeşitli uygulamalar için doğru yüzey aktif madde ya da yüzey aktif madde karışımı veya ilave kimyasallar koymak suretiyle özel amaçlı ortamlar oluşturulabileceği ve bulutlanma noktası değeri üzerinde oynanabileceği sonucuna varılabilir.

Daha önce değindiğimiz gibi amfolitik yüzey aktif maddeler de faz ayırımı amacıyla kullanılabilmektedirler. Noniyonik yüzey aktif maddelerin aksine tüm amfolitik yüzey aktif maddelerin sulu çözeltilerinde faz ayırımı olayı sıcaklık düşüşü ile gerçekleşir. Amfolitik yüzey aktif maddeler tek fazlı hallerini bulutlanma noktası değerinin üzerinde sergilerler. Bu kural kısmen istisnalar içermekle birlikte genel olarak bu şekilde gerçekleşir[53].

2.2.9.1.1.9 Tayin Yöntemi

Sürfaktanca zengin faz ayrıldıktan sonra tayin basamağında;

- UV-VIS absorpsiyon spektroskopisi,
- Alevli atomik absorpsiyon spektroskopisi,
- Grafit fırınlı atomik absorpsiyon spektroskopisi,
- Hidrür oluşturmalı atomik absorpsiyon spektroskopisi,
- İndüktif eşleşmiş plazma-optik emisyon spektroskopisi(ICP-OES),
- Sıvı kromotografisi(HPLC),
- Gaz kromotografisi(GC) gibi yöntemlerden uygun olan biri analit belirlenmesi için uygulanır.

2.2.9.1.1.10 CPE Yönteminin Avantajları ve Dezavantajları

Avantajları:

- Bulutlanma noktası ekstraksiyonu metodu diğer zenginleştirme yöntemleriyle kıyaslanabilecek ölçüde yüksek verim sağlamaktadır.
- Küçük örnek hacimlerinde (<50 mL) bile yüksek zenginleştirme faktörü elde edilir.
- Toksik kimyasalların kullanımı minimal düzeyde olduğundan çevre dostudur.
- Çok sayıda örnek ve bazı durumlarda da analit, eş zamanlı çalışılabilir.
- Kullanılan donanım, her laboratuvarda bulunabilecek basit aletlerdir.
- Klasik sıvı–sıvı ekstraksiyon metodunda yüksek miktarda organik çözücü kullanılırken, CPE'de birkaç mL sürfaktan ilavesi ile çalışılmaktadır.
- Zenginleştirme işlemi sonrasında analit, çoğu durumda asidik alkollü bir çözelti içerisinde olduğundan atomik tayin öncesinde aspirasyona hazırdır.
- CPE metodu ile elde edilen fazlarda tespit yapabilmek için birçok spektroskopik metod kullanılabilir.

- Organik yapıların ayrılması ve tayini için klasik sıvı-sıvı ekstraksiyon metoduna bir alternatif olabilir.
- Yöntem basit ve kullanışlıdır.
- İşlemin uygulanışı esnasında sistem için yapılan en büyük harcamanın ısıtma anında gerçekleşen enerji sarfiyatı oluşudur.
- CPE metodu aynı zamanda katı örneklerde bulunan organik yapıların özütlenmesini de sağlar. Bu uygulamada ilk olarak katı örnek sulu noniyonik sürfaktan içeren çözelti ile muamele edilir. Isıtma ile birlikte organik yapının, katı yüzeyinden desorbsiyonu ve misel ortamı içinde çözünmesi sağlanır. Daha sonra çözelti, katının ayrılması için süzülür. Bunun ardından klasik bulutlanma noktası özütleme metodu basamakları uygulanır.
- Klasik ekstraksiyon yöntemlerine göre yüksek zenginleştirme faktörü elde edilir.
- Sürfaktan kullanımı çevreye karşı sorun oluşturmamaktadır, ticari bulunabilirliği geniş ve maliyeti ucuzdur.
- Biyolojik ve çevresel numunelere rahatlıkla uygulanabilir oluşu kullanım alanını genişletmektedir.

Dezavantajları:

- Yapılacak çalışmada en uygun şartlar geniş kapsamlı araştırılmadan (optimizasyon yapılmadan) deneylere devam edilirse, verim olarak istenilen başarı sağlanamayabilir. Çünkü daha önce de değinildiği gibi CPE, birçok parametreye bağlı olarak gerçekleşen çok duyarlı bir metottur.
- CPE sırasında, santrifüjleme yaparken optimum sıcaklık değeri az da olsa düşer ve bu durum ekstraksiyon verimini azaltır. Bu nedenle sürfaktan seçimi esnasında bulutlanma noktası değeri göz önünde bulundurulmalı ve muhtemel verim kayıplarını engelleme adına düşük bulutlanma noktası değerine sahip olan sürfaktanlar tercih edilmelidir.
- Yüksek sıcaklık değerlerine ulaşılması en iyi şartlar için gerekli olursa bu gibi durumlarda kompleksleştirici maddeler için dayanıklılık sorunu ortaya

çıkmaktadır. Bu durumda değişik kompleksleştiriciler için kapsamlı araştırma yapmak gerekebilir.

- Bulutlanma noktası özütleme metodunda faz ayırımının ardından viskozitesi yüksek olan yüzey aktif maddece zengin fazın ölçümü başka bir sorun oluşturmaktadır. Ancak bu sorun değişik çözücü sistemleri ile ya da mikro dalga çözücü sistemleri ile çözüme kavuşturulmaktadır.
- Olayın mekanizması henüz tam anlamıyla açıklanmamıştır.
- Elde edilen sürfaktanca zengin faz oldukça viskoz olduğunda çoğu tayin yöntemi öncesinde seyreltilmesi gerekir. Bu nedenle zenginleştirme faktörü düşer[70].

2.2.9.1.2 Türev Spektrofotometrik Yöntem

2.2.9.1.2.1 Giriş

Türev Spektroskopi; dalga boyunun bir fonksiyonu olarak dalga boyuna karşı absorbansın 1, 2, 3,..., n türevidir. F (λ)' nın fonksiyonu olarak dA/dλ, d2A/dλ2, d3A/dλ3 , ... denklemleri ile verilir.

Aşağıdaki eşitliklerde Lambert-Beer kanununda elde edilen farklılıklar gösterilmektedir.

Zero-order Türev: A= ε x b x C

Birinci Türev: dA/dλ = b x C x dε/d λ

İkinci Türev: d2A/dλ2 = b x C x d 2ε/d λ2

...

n. Türev: dnA/dλn = b x C x d nε/d λn

Türev spektroskopi yöntemi oldukça eskiye dayanır. İlk defa 1920'lerde Rutherford tarafından kütle spektrumları yorumlanmasında kullanılmış sonra genel kullanıma 1950ler de başlanmış ve 1953-1955 Hammand ve ark., Marsson, Giese ve French bu yöntemi kullanmıştır[71]. Mikro işlem teknolojisindeki gelişmelere paralel olarak türev spektroskopisi yöntemi yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanılmıştır. Günümüzde geliştirilen spektrofotometreler bu şekilde donatılmıştır. Son senelerde yayınlanan ilaç analizlerinde araştırmacıların çoğunda bu yöntemle ilgili çalışmalar bulunmaktadır.

Türev spektrofotometrisi; türev spektrumlarının kullanılması esasına dayalı bir analiz yöntemidir. Türev eğrilerinin hazırlanması matematiksel işlemler gerektirmektedir. Orjinal spektrum herbir noktasındaki türevinin hesaplanması ve bulunan sonuçların grafiğe geçirilerek yani türev eğrilerinin hazırlanması oldukça zordur. Bilgisayar yardımı ile hesaplamalar yapılabilir.

Günümüzde 1.'den 4.'ye kadar türev eğrisi çizen cihazlar bulunmaktadır. Yalnız 3. türevden sonra türev spektrumu alınması pek istenmemektedir. Çünkü ana maddenin yapısı her türev alındığında bozulur.

1.Türev; Orijinal absorpsiyon bandının her noktasındaki eğimini anlatır. Burada orijinal spektrumun maksimum noktası kaybolur buna karşılık orijinal spektrumda absorbansın yükseldiği kısımlar için pozitif azaldığı kısımlar için negatif değerler almaktadır. Orijinal spektrumdaki eğri üzerinde eğimin en büyük olduğu noktada yani eğrinin yarı yüksekliğine karşılık bir maksimum bir minimum göstermekte ve eğimin en düşük olduğu tepe noktasında sıfırdır. Gaus eğrisinin maksimum noktasında (λ max) birinci türev eğrisine bir kesim noktasına (zero-crossing) karşılık gelmektedir ($dA/d\lambda=0$). Birinci türev spektrumunda %53 civarında eliminasyon vardır ve türev eğrilerinin aynı dalga boyu aralığı içerisinde alınması nedeniyle piklerin genişliği azalmaktadır. Bu azalma birinci türevde yarısına eşittir[71].

2.Türev; Aynı şekilde ikinci türev spektrumu; orijinal eğrinin maksimum noktasına (λ max) karşılık gelen bir kesim noktası vardır ($d2A/d\lambda2 =0$). İkinci türev spektrumunda % 40 eliminasyon vardır ve pik genişliğindeki azalma %53 civarındadır.

3.Türev; Aynı şekilde üçüncü türev spektrumu; orijinal eğrinin maksimum noktasına (λ max) karşılık gelen bir kesim noktası vardır ($d3A/d\lambda3 =0$). Üçüncü türev spektrumunda % 30 eliminasyon vardır ve pik genişliğindeki azalma % 40 civarındadır.

4.Türev; için $d4A/d\lambda4 =0$ kesim noktası, n. türev için $dnA/d\lambda n =0$ kesim noktası karşılık gelmektedir.

Türev spektroskopisi; absorpsiyon spektrumunun eğimlerindeki herhangi bir değişikliğe karşı son derece hassastır ve üst üste çakışan piklerin olduğu absorbans bantlarının analizinde çok uygun bir metottur[72].

Türev spektrumlarıyla karışım içerisinde herhangi bir ayırma işlemi gerekmeksizin bazı maddelerin diğerleri yanında miktar tayinlerinin yapılabilmesi mümkündür. Bu da özellikle karışım halinde maddeleri; etken maddeler olarak içeren farmasötik preparatların analizi için yöntemin çok etkili ve kolay bir miktar tayini yöntemi olmasını sağlar [73].

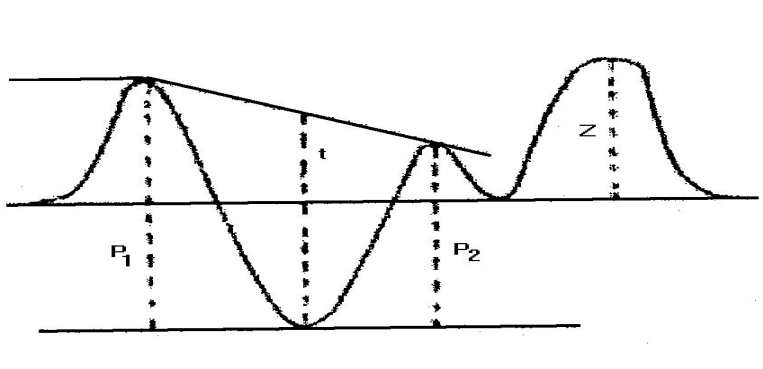
2.2.9.1.2.2 Türev Spektrumlarının Değerlendirilmesi

Pik-sıfır Yöntemi: Peak-zero ya da zero-crossing yöntemi olarak adlandırılan bu yöntem pik tepesinin absise olan uzaklığının ordinata paralel olarak ölçülmesidir (z). Absise göre simetrik sinyaller içeren yüksek türevlerin değerlendirilmesinde ve birbiri üzerine binen eğrilerden birinin sıfırdan geçtiği durumda uygundur.

Tanjant Yöntemi: Birbirini izleyen iki maksimum ya da iki minimuma ortak teğet çizilir. Bu teğetin aradaki ekstremuma olan uzaklığı ordinata paralel olarak ölçülür (t). Bu yöntem doğrusal bir zemin olduğu zaman daha iyi sonuçlar verir ve zeminin spesifik olmayan etkilerinin ortadan kaldırılmasında, en azından azaltılmasında yararlanılır.

Pik-Pik Yöntemi: Birbirini izleyen iki ekstremum arasındaki uzaklık, ordinata paralel olarak ölçülür (P1 ya da P2). Bu yöntem çok bileşenli karışımların kantitatif analizinde kullanılmaktadır. Zemin absorbansının giderilmesinde de kullanılır.

Pik-Pik Oranı Yöntemi: Birbirine komşu iki pikin oranı alınır (P1:P2). Bu teknik ikili karışımların kantitatif analizinde kullanılır. Çalışma eğrisi yapay karışımların bağıl derişimleri ile pik-pik oranları arasında hazırlanır.



Şekil 2. 13 Kantitatif analizler için türev spektrumlarını değerlendirme yöntemleri (t: tanjant yöntemi, P: pik-pik yöntemi, Z: pik sıfır (peak-zero) yöntemi)

2.2.9.1.2.3 UV-VIS Türev Spektroskopisinin Uygulama Alanları

Çizelge 2. 10 UV-VIS türev spektroskopisinin uygulama alanları

Uygulama Alanı	Genel Bilgi
λ max'ın Belirlenmesi	Orijinal spektrumda, maksimum absorpsiyon dalga boyunda 1.türev eğrisi 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 minumumlar, 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 bir zemin absorpsiyonu ile çakışır. Türev spektrumundaki uygun pik-pik uzaklıkları değerlendirerek, 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 ile 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 spektrumlarıyla karşılaştırılması sonucu saflık kontrolü yapılabilir.

Çizelge 2. 11 UV-VIS türev spektroskopisinin uygulama alanları (devamı)

Eser Madde Analizi	İlaç maddesi, besinler, vb. maddelerdeki eser miktarlardaki safsızlıkların saptanması ve miktarının tayin edilmesi de UV-VIS türev spektrofotmetrisinin 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 absorbsiyon 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.

2.2.9.1.2.4 Türev Spektroskopisinin Avantajları ve Dezavantajları

Avantajları:

- 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.
- Çoğunlukla orijinal spektrumda elde edilen bu eğriler birçok pikin üst üste gelmesiyle meydana gelmiştir. Türev alma ile bu absorpsiyon eğrileri daha ayrıntılı şekle girer ve böylece bir anda bulunan piklerin tek tek görünmesi sağlanır.
- Bilindiği gibi spektrofotometride bulanık çözeltiler ile çalışırken çökme hızı tanecik büyüklüğü gibi faktörlere bağlı olarak büyük oranda hata yapılabilir. Türev eğrilerinin hazırlanması ile bulanıklığın oluşturduğu bu olumsuz etki ortadan kaldırılabilir.
- Birden fazla maddenin karışım halinde bulunduğu ortamlarda ekstraksiyon ve kromatografi ile herhangi bir ayırma işlemine başvurmaksızın tek tek miktarları tayin edilebilir.
- Reaksiyon ortamından kaynaklanan gürültü piklerinin yok edilmesi sağlanır.

Dezavantajları:

- Kullanımı çok kolay olmasına karşılık pahalı spektrofotometrelerde bulunur ve oldukça karmaşık bir elektronik yapıya ihtiyaç vardır.
- Türev spektrumlarında çok sayıda girişim yapan piklerde görülür. Bu pikler bir karışım ile çalışırken başka bileşenlerinde varlığına bizi götürür. Türev derecesi arttıkça bu cins piklerin sayısı da artacağı için karışıklık daha da artacaktır.

2.2.9.2 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

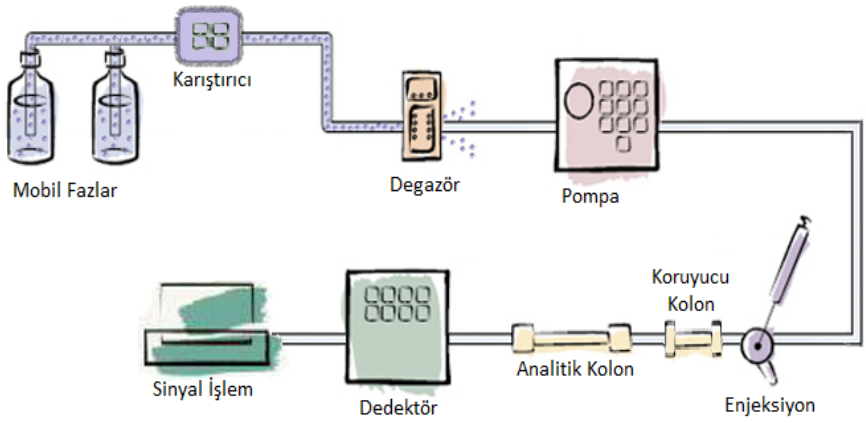
Kromatografik yöntemlerden biri olan sıvı kromatografisi, 1900'lu yılların başlarında bulunmuş ve 1960'lı yıllardan itibaren sıvı kromatografisinin geliştirilmesi için geniş çapta araştırmalar yapılmaktadır. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ise sıvı fazda çözünebilen bir kimyasal karışımın kolay ve hızlı bir şekilde bileşenlerine ayrılabildiği oldukça duyarlı bir yöntemdir. Uygun çözücü kullanılarak çözülen örnek karışımı (analitler), yüksek basınç altında kromatografik kolondan geçirilir ve burada bileşenlerine ayrılır. Bileşenlerin birbirinden ayrılması ve bunun derecesi, analitler ile sabit faz arasındaki etkileşime bağlıdır ve önemlidir. Sabit faz, kolon içerisindeki hareketsiz dolgu materyali olarak tanımlanır. Analitler ile sabit ve sürekli fazlar arasında istenilen etkileşim sürekli faz olarak kullanılan çözücülerin ve sabit fazın değiştirilmesi ile elde edilebilir[74].

Duyarlılığı, doğru kantitatif tayinlere kolaylıkla uygulanabilir olması, uçucu olmayan türlerin veya sıcaklıkla kolayca bozunabilen türlerin ayrılmasına uygun olması ve hepsinden de önemlisi sanayinin, birçok bilim dalının ve halkın birinci derecede ilgilendiği maddelere geniş bir şekilde uygulanabilir olması HPLC'nin bu kadar yaygın olmasını açıklamaktadır[75].

2.2.9.2.1 HPLC Sistemleri

HPLC sistemi temel olarak; pompa, enjektör, kolon, dedektör ve bilgisayar birimlerinden oluşmaktadır. Kromatografik analiz işleminde örnek enjektör yardımı ile sisteme gönderilir. Örnek hareketli faz ile kolon boyunca geçer ve kolon içerisinde bileşenlerine ayrılmaya başlar. Kolon çıkışında ayrılan bileşenlerin sinyallerini dedektör

kaydeder. Dedektör tarafından kaydedilen ve bilgisayara aktarılan sinyallerin tamamına kromatogram adı verilir. Şekil 2.14'da HPLC sistemi şematik olarak sunulmaktadır [74].



Şekil 2. 14 Yüksek performanslı sıvı kromatografisi sisteminin şematik gösterimi

Çözücü Sistemleri: Kolon içerisinde mobil fazın devamlı olarak içinde aktığı, geniş yüzey alanına sahip hareketsiz dolgu materyaline sabit faz adı verilmektedir. Örnek bileşenlerini kolon boyunca taşıyan sıvı faza da hareketli (mobil) faz adı verilmektedir. Her bir HPLC türünde kullanılan mobil fazların farklı özellikleri söz konusudur. İyon değişim, afinite ve hidrofobik etkileşim kromatografisinde, farklı pH değerlerine ayarlanmış sulu tampon çözeltiler mobil faz olarak kullanılırken; normal faz sıvı kromatografisinde apolar, ters faz sıvı kromatografisinde su ve asetonitril gibi polar çözücü karışımları mobil faz olarak kullanılmaktadır. Kullanılan mobil fazın dedektör ile uyumlu, yüksek derecede saf, düşük viskoziteli, kimyasal açıdan inert ve örneği çözebilecek kimyasal yapıda olması gerekmektedir[74].

Pompa: HPLC pompası, sıvı kromatografi sisteminin en önemli kısımlarından bir tanesidir. Sistemde; elüent'in; enjektör, kolon ve dedektör boyunca sürekli sabit akışını sağlayan kısımdır. Yüksek basınçta hareketli fazı, sabit faz üzerinden geçirmelidir. İdeal pompa; yüksek basınca, kararlı akış hızına, tekrarlabilirliğe, geniş basınç aralığına sahip olmalıdır.

Enjeksiyon: İlk ve en basit numune verme düzeneği, kendi kendine sızdırmazlık sağlayan elastomerik septumlardan şırınga ile enjeksiyon sistemiydi. Bu teknik basit olmasına rağmen tekrarlanabilirlik açısından dezavantaj sağlamaktadır[75]. Son zamanlarda otomatik örnekleyici sayesinde cihazdan verilen komutla istenilen hacimde

enjeksiyon gerçekleşmektedir. Bu da doğru ve kesin sonuçlar alınmasını sağlamakla birlikte tekrarlanabilirliği avantaja çevirmektedir.

Kolonlar: Sıvı kromatografi kolonları normal olarak düzgün iç çaplı paslanmaz çelik borulardan yapılır, ancak ara sıra kalın cidarlı cam borular da kullanılmaktadır. Yapısal olarak ikiye ayrılır:

- **Koruyucu Kolon:** Analitik kolonun ömrünü artırmak amacıyla, analitik kolondan önce genellikle kısa bir kolon yerleştirilir. Bu kolonun görevi, sadece partikül haldeki maddeleri ve çözücü içindeki yabancı maddeleri tutmak değil, aynı zamanda numune içinde bulunan ve sabit faza tersinmez olarak bağlanan bileşenleri de tutmaktır. İlave olarak koruyucu kolonlar, hareketli fazı sabit faz ile doyurarak analitik kolondaki çözücü kaybının en az indirilmesini sağlarlar. Koruyucu kolondaki dolgu maddesinin bileşimi, analitik kolondakine çok benzer olmalıdır; bununla beraber, basınç düşüşünü en aza indirmek için tanecik boyutu genellikle daha büyüktür[76].
- **Analitik Kolon:** Kullanılan kolonun boyu doğrudan verimliliği etkilemektedir. Kolon boyundaki artış verimliliği arttırmaktadır. Fakat resolüsyonu arttırmak için kolon boyunu uzatmak iyi bir yol değildir. Kolon boyundaki artış analiz süresinin uzamasına neden olurken, sistem geri basıncını da artırır. Kısa kolonlar hızlı gradiyent sistemler için uygunken, uzun kolonlar yüksek pik kapasiteli ve yavaş gradiyent sistemler için daha uygundur. Kolon iç çapı (ID) kolon dolgu maddesi doldurulmuş olan yapının iç çapıdır ve milimetre (mm) cinsinden ifade edilir. Kolonun iç çapı Van Deemter eşitliğinden dolayı doğrudan akış hızını etkilemekte ve doğrudan kolon verimliliğini etkilemektedir. Bu kromatografik kavrama göre kolon verimliliği (bant genişlemesi) doğrusal akış hızına bağlıdır. Kolon iç çapı (ID) küçüldüğü zaman, doğrusal akışın devamı için akış hızı da o oranda azaltılmalıdır. Belirtmek gerekir ki, partikül boyutu küçüldüğü zaman, optimum akış hızı artmaktadır. 1,9, 2,2 µm gibi küçük parçacık boyutlu kolonlar kullanılarak daha iyi bir ayrım yapabilmek için akış hızının arttırılması gerekmektedir[76].

Dedektör: Maddenin etrafındaki değişikliği algılayıp onu elektrik sinyaline çeviren sistemdir. İdeal bir dedektörden beklenen özellikler:

- Yeterli duyarlılık,
- İyi bir kararlılık ve tekrarlanabilirlik,
- Geniş bir doğrusal çalışma aralığı,
- Yüksek sıcaklıklardan etkilenmemesi,
- Akış hızında bağımsız cevap süresi kısalığı,
- Yüksek güvenirlik ve kullanım kolaylığı,
- Bant genişlemesini azaltmak amacıyla, minimum iç hacimli olmasıdır[75].

Sıvı kromatografisinde dedektörler genel olarak kütleye ve konsantrasyona duyarlı olarak ikiye ayrılır. Kullanılan en yaygın dedektör duyarlığı ve seçiciliği yüksek, doğrusal alanı geniş olmasından kaynaklı olarak absorbans dedektörüdür. En çok kullanılan Diode Array Dedektörünün en önemli özelliği aynı anda tüm dalga boylarındaki ışını aynı anda absorplamasıdır.

2.2.9.2.2 Normal Faz Kromatografisi

Polar sabit faz (örneğin silika jel) yüzeyi ile n-hekzan ya da tetrahidrofuran gibi apolar mobil faz türlerinin kullanıldığı kromatografik ayırma tekniğidir. Burada polar olan kolon dolgu materyali ile etkileşen polar örneklerin alıkonma süreleri daha az polar olan örneklere oranla daha fazladır. Bu nedenle örnek bileşenlerinden daha polar olanlar, kolondan daha geç çıkarlar ve ayırma gerçekleşir.

2.2.9.2.3 Ters Faz Kromatografisi

Apolar (hidrofobik) sabit faz yüzeyi ile metanol, su-asetonitril karışımı gibi polar mobil faz türlerinin kullanıldığı kromatografik ayırma tekniğidir. Burada en polar yapıdaki örnek bileşenleri sabit faz ile en az etkileşime girerek kolonu en hızlı şekilde terk eder. Daha apolar olanlar ise sabit faz ile arasındaki etkileşim şiddetine göre kolonu daha geç terk ederler[74].

2.2.9.2.4 HPLC Kullanım Alanları

HPLC sistemleri günümüzde birçok alanda kullanılırken başlıca kullanım alanları olarak ayırma, saflaştırma, tanımlama ve derişim tayini sayılabilir. Ayırma işleminde temel prensip, uygun çözücü kullanılarak çözülen örnek karışımının kolondan geçirilerek sabit faz ile etkileşimine dayalı olarak bileşenlerine ayrılmasıdır. Yapılan ayırma işleminin derecesi çoğunlukla sabit faz ve mobil faz seçimine göre değişiklik göstermektedir. Saflaştırma işlemi, saflaştırılmak istenen maddenin atıklardan veya diğer maddelerden ayrılmasıdır. Bu işlem yapılırken istenen madde kolon çıkışında toplanmakta ve diğer fraksiyonlar ortamdan izole edilmektedir. Saflaştırma yapabilmek için doğru mobil faz seçimi ve ayrılmak istenen maddenin kolondan çıkış süresinin istenmeyen maddelerin çıkış süresinden kısa olması gerekmektedir. HPLC sistemlerinde bilinmeyen maddelerin tanımlama işlemi de yapılabilmektedir. Bu işlem, tanımlanacak maddeye ait pik alıkonma süresinin standarda ait alıkonma süresi ile çakıştırılması ile mümkün olabilmektedir. Doğru tanımlama için, tanımlamaya çalışılan maddenin seçilen dedektör ve analiz koşullarında kabul edilebilir bir çıkış süresi ve belirgin bir piki olması gerekmektedir. Tanımlı bir maddenin, HPLC kullanılarak derişim tayinini yapmak da mümkündür. Bu işlem için derişimi tespit edilmek istenen maddenin değişik derişimlerdeki çözeltileri sisteme enjekte edilmekte ve alınan seri piklerin altında kalan alanlar hesaplanarak derişime karşı grafiğe geçirilmektedir. Derişimi bilinmeyen maddenin verdiği pikin altında kalan alan hesaplanarak ve kalibrasyon eğrisi kullanılarak derişimi tespit etmek mümkün olabilmektedir[74].

2.2.9.2.5 Kromatografik Verimi Etkileyen Faktörler

Analiz edilecek numune kromatografik sistemdeki hareketli fazın akış hattına enjekte edilir, bu aşamadan sonra analit hareketli faz tarafından analitik kolona taşınır ve burada analitik kolonun gözeneklerinde yol alıp detektöre ulaşarak tespit edilir.

2.2.9.2.5.1 Bant Genişliği ve Önemi

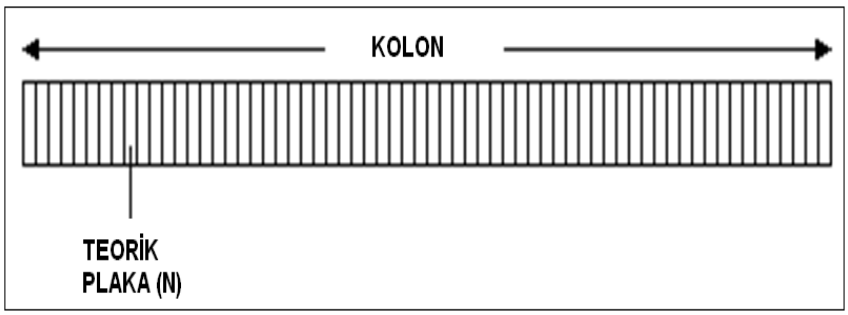
Her bir spesifik analit bandı, molekül yapısına göre farklı hızlarda analitik kolon içinde ilerleyerek kolonu farklı zamanlarda terk etmekte ve detektör tarafından elektrik

sinyali olarak tespit edilmekte olup elde edilen veri kromatogram adını almaktadır. Her bir bant numune içindeki farklı bir moleküldür ve ayrılma kolon içinde gerçekleşir.

Analit dedektöre ulaşmadan önce kromatografik sistemdeki farklı aşamalardan geçmekte ve bu da dedektör tarafından tespit edilme ve analite ait kromatogram bandının oluşmasını etkilemektedir. Analit bandının geniş olması kromatografik pikin genişliğinin artmasına sebep olmaktadır. Geniş bantlar ise pik yüksekliğinin azalmasına ayrıca duyarlılık ve ayrışmanın azalmasına sebep olmaktadır. Eğer bant genişliği en az seviyede olursa, dar ve keskin pikler elde edilir ve bu da duyarlılığı ve ayrışmayı arttırıcı etki gösterir[77].

2.2.9.2.5.2 Kolon Uzunluğu, Parçacık Boyutu ve Teorik Plaka Sayısının Etkisi

Küçük parçacık boyutu belirgin derecede HETP (Yükseklik Eşdeğer Teorik Plaka) azalışına neden olur ve bu da yüksek verimlilik sağlar. Teorik plaka (N) , kromatografik kolondaki teorik tabakalar olarak düşünülebilir. Numunenin ayrımı, hareketli ve sabit faz arasında, bu teorik plakalar üzerinde gerçekleştiği düşünülebilir. Analit, hareketli faz ile bir tabakadan diğerine taşınarak kolonda ilerler. Teorik olarak; bir plakadan diğerine geçen molekül ne kadar çok ve sık plaka varsa o derecede bir plakadan diğerine kolayca geçecek ve böylece teorik plakaya eş yükseklik olan HETP değeri de en düşük değerde olacaktır. Şekil 2.11 teorik plaka teriminin teorik olarak gösterimidir.



Şekil 2. 15 Teorik plakanın (N) teorik gösterimi

HETP = L / N eşitliği ile hesaplanmakta olup, ” L” kolon uzunluğunu , “N” teorik plaka sayısını ifade etmektedir. Teorik plaka değeri (N) büyüdükçe, HETP değeri azalacak ve etkinlik artacaktır. Teorik plaka sayının (N) hesaplanmasında, pik genişliği önemli bir etkendir.

Yüksek ayırım ve verimlilik analiz hızını etkilemekte olup verimlilik kolon uzunluğu ile orantılı, parçacık boyutu (dp) ile ters orantılıdır.

$$N \alpha \frac{L}{dp}$$

Bu nedenlerle en iyi ayırımı sağlayabilmek için, analitik kolon uzunluğu az, aynı sebepler ile de kolon parçacık çapı küçük olmak zorundadır [77].

2.2.9.2.5.3 Küçük Parçacık Boyutunun Ayrışmaya Etkisi

Küçük parçacık boyutu sadece verimliliği değil aynı zamanda ayrılmayı ve analiz hızını arttırmaktadır[78]. HPLC sistemlerinde ayrılma 3 önemli faktöre bağlıdır[79]:

- “α” seçicilik faktörü,
- “k” alıkonma faktörü,
- "N" teorik plaka sayısı

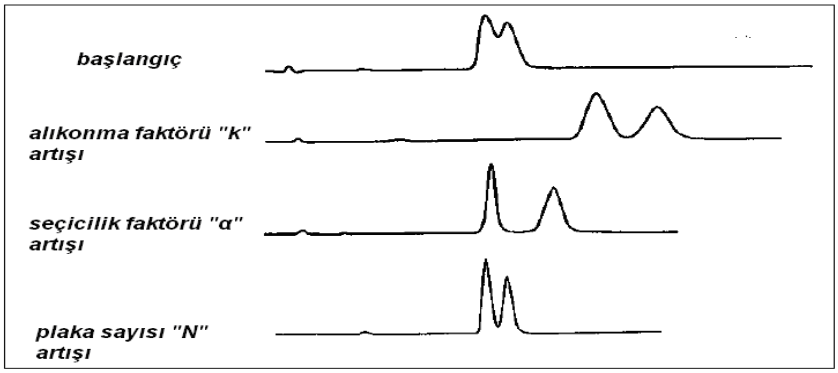
Parçacık büyüklüğü azaltılırsa ayrılma da artmış olacaktır. Dar ve keskin pikler teorik plaka sayısının artışını sağlar ve buna bağlı olarak da ayrışma (Rs) değerini arttırır[79]. Alıkonma faktörü “k” arttırıldığında da ayrışma değerinde artış gözlenebilmektedir. Fakat “k” değerinin artışı analiz süresinin uzamasına buna bağlı olarak ta geniş ve keskin olmayan piklerin oluşmasına sebep olmaktadır[77]. Alıkonma değeri $2<k<10$ olmalıdır. Diğer faktör “α” seçicilik faktörü artışı ise daha iyi ayrılma sağlamaktadır, fakat seçicilik faktörünün arttırılması yüksek ayrılma sağlayacağı için dedekte edilen analitlerin sıralamasında düzensizlik meydana getirmektedir.

Seçicilik faktörünü etkileyen parametreler:

- Analitin sabit faz ile etkileşimi,
- Analitin hareketli faz ile etkileşimi,
- Hareketli fazın sabit faz ile etkileşimi,
- Hareketli faz pH derecesi, sıcaklık ve hareketli fazı oluşturan katkılardır.

Birçok etkene bağlı olduğu için seçicilik faktörünün uygun bir değere getirilmesi uzun denemeler gerektiren bir çalışma ile belirlenebilmektedir[77]. Sistem uygunluk değeri α>1,2 olmalıdır.

Seçicilik (α) ve alıkonma (k) faktörleri kimyasal etkenlerin değiştirilmesi ile sağlanmaktadır. Şekil 2. 16'de bu faktörlerin ayrışmaya etkisi görülmektedir."N" değeri kolon dolgu malzemesinin parçacık boyutu ile değişmekte ve parçacık boyutu küçüldükçe daha dar, yüksek ve keskin pikler elde edilmektedir ve bu da kromatografik sistemde ihtiyaç duyulan ayrışmayı ve duyarlılığı sağlamaktadır[77].



Şekil 2. 16 Alıkonma, seçicilik ve plaka sayısı değişimlerinin ayrışmaya etkileri

2.2.9.2.5.4 Ayrışma, Etkinlik ve Parçacık Boyutu Arasındaki İlişki

Ayrışma teorik plaka sayısının "N" karekökü ile doğru orantılıdır.

$$Rs \propto \sqrt{N}$$

Ek olarak plaka sayısı "N" parçacık boyutu ile ters orantılıdır. Eğer, kolon dolgu maddesinin parçacık boyutu azaltılırsa ayırma etkinliği artacaktır. Örnek olarak, parçacık boyutu (dp) 3 kat azaltılırsa teorik plaka sayısı (N) 3 kat artacak buna bağlı olarak ta ayrışma (Rs) 3'ün karekök değeri olan 1,7 oranında artacaktır[77]. (√3 = 1,7)

$$N \propto \frac{1}{dp} \qquad dp \downarrow 3x \quad N \uparrow 3x \quad Rs \uparrow 1{,}7x$$

Küçük parçacık boyutu kullanıldığında, optimum akış hızı için de farklı değer oluşmaktadır. Optimum akış hızı parçacık boyutu ile ters orantılıdır. Parçacık boyutu 3

katı azaltıldığında optimum akış hızı (Fopt) da 3 katı artış gösterecektir ve bu da analiz süresinin (T) 3 kat azalmasına sebep olmaktadır[77].

$$Fopt \propto \frac{1}{dp} \qquad dp \downarrow 3x \quad Rs \uparrow 1{,}7x \quad T \downarrow 3x$$

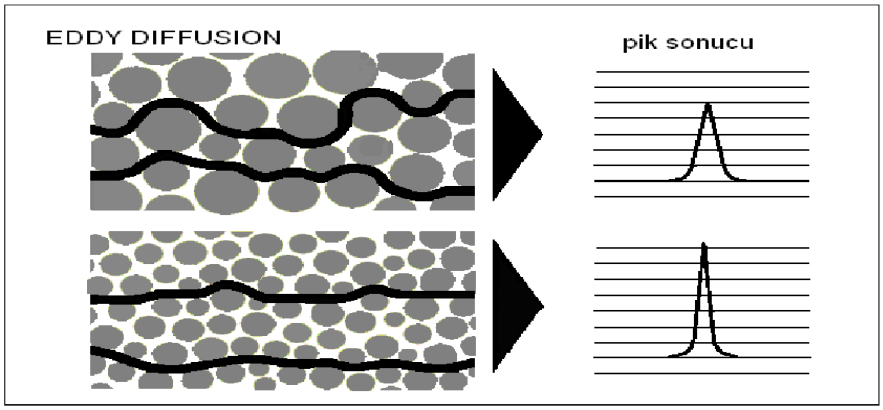
Bu durumda akış hızının arttırılması analiz süresini azaltmakta ve analit bandının genişlemesini engelleyip dar, yüksek ve keskin pikler elde edilmesini sağlamaktadır. Bu şekilde elde edilen dar ve keskin piklerin yüksekliği de fazla olmaktadır ve bu sayede elde edilen pikin gürültü piklerinden ayrımı kolaylaşmakta olup bu da yüksek hassaslık elde edilmesini sağlamaktadır. Bu verilere göre de teorik plaka sayısının (N) pik genişliği (w) ile ters orantılı olduğu, pik yüksekliği ile de doğru orantılı olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Teorik plaka sayısı 3 kat arttırıldığında pik genişliği 1,7 kat pik yüksekliği de 1,7 kat artış göstermektedir[77].

$$N \propto \frac{1}{w^2} \qquad N \uparrow 3x \quad w \downarrow 1{,}7x \quad pik\ yüksekliği \uparrow 1{,}7x$$

2.2.9.2.6 Van Deemter Eğrileri

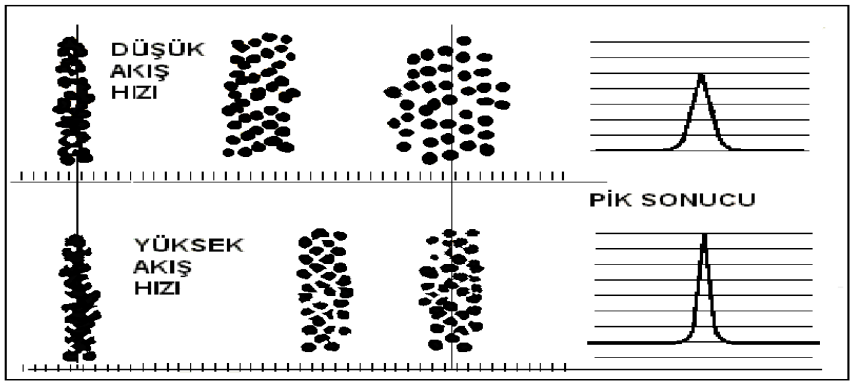
Kolon içindeki molekül hareketli faz ve kolon dolgu materyali ile etkileşim içinde, hareketli faz akış yönü doğrultusunda yol almaktadır. Analitin molekülünün ilerleyişi sırasında kolon içinde farklı şekillerde transfer olmaktadır. Bunlar;

- **Eddy Difüzyon**: Analit molekülünün kolon parçacıklarının etrafından veya yüzeyinden ilerlemesi olarak tanımlanır. Kolon dolgu maddesinin parçacık yapısına bağlı olarak hareketli fazın hızı bu parçacıkların sahip olduğu kanallar tarafından farklılaşmakta buna bağlı olarak ta hareketli faz ile taşınan analit molekülü de farklı yollardan ve farklı hızlarla kolonda ilerlemektedir. Bu durumda analitin ilerleyişini etkileyen faktörler analitik kolonun yapısı ve hareketli fazın lineer hızıdır. Parçacık boyutunun azaltılması ile analit moleküllerinin kolon içinde alacağı yol eşitlenebilmekte ve bu sayede dar analit bantı ve pikleri elde edilebilmektedir[77].



Şekil 2. 17 Eddy Difüzyon

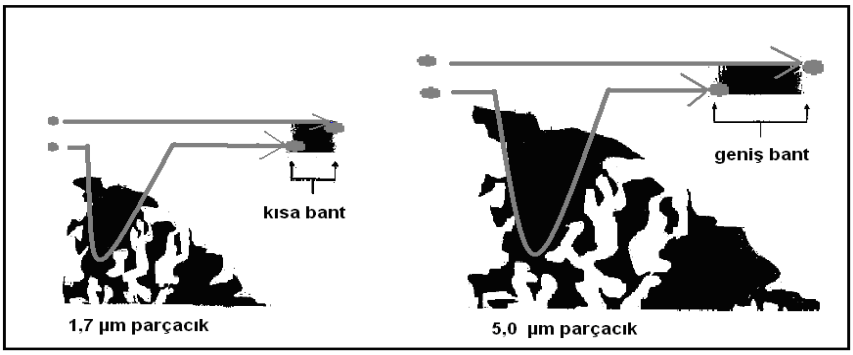
- **Longitudinal Difüzyon**: Analit molekülünün hareketli faz tarafından doğrudan taşınmasıdır. Kolon dolgu maddesinin gözeneklerine girmeyen hareketli faz ile taşınan molekülün ilerleme şeklidir. Bu şekilde taşınma hareketli fazın difüzyon kat sayısından ve hareketli fazın akış hızından etkilenir. Düşük akış hızları ile pik bant genişliğinde artışlar meydana gelmektedir. Bu şekilde taşımanın etkilerini en aza indirmek için akış hızının arttırılması gerekmektedir. Akış hızı arttırıldığında bu şekilde taşınan analit molekülleri kolonu daha kısa sürede terk edecek ve böylece dar analit bantı ve piki elde edilmesini sağlayacaktır[77].



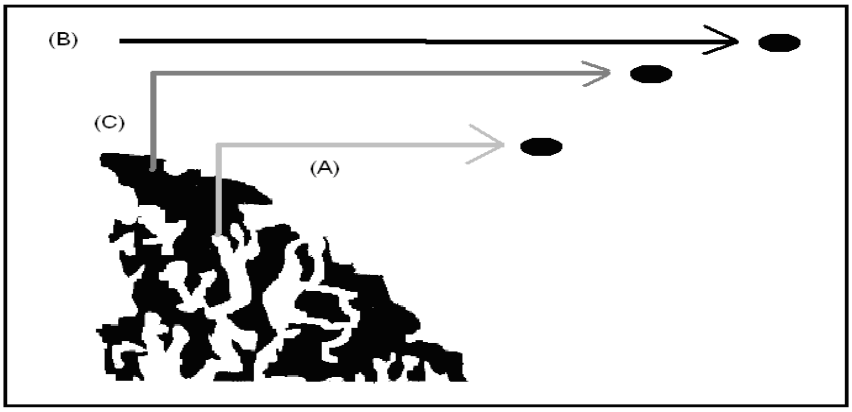
Şekil 2. 18 Longitudinal Difüzyon

- **Kütle Difüzyon**: Analit molekülünün kolon gözeneklerinin içinde ilerlemesidir. Kolon parçacıklarının içine giren ve bu gözeneklerin direnci ile karşılaşan molekülün ilerleme şekli olup, bant genişliğinin en önemli etkeni analitin bu şekilde ilerlemesidir. Bu şekilde taşınma büyük ölçüde hareketli fazın lineer hızından etkilenir, yüksek akış hızı ayrılma ve taşınma kalitesini arttırır. Bu şekilde taşınmayı etkileyen diğer önemli faktör de kolon dolgu maddesinin

parçacık boyutudur. Kolonun parçacık gözenekleri büyük boyutta olursa analit bu büyük gözeneklere girip-çıkarak kolonda yavaş ilerleyecek ve bu sebep ile de bant genişlemesine neden olacaktır. Analit molekülü ile kolon dolgu maddesinin (C_{18}, C_8, vb.) etkileşime girdiği taşınma şekli olan kütle transfer ile analit molekülü kolon dolgu maddesi ve hareketli faz arasında transfer olarak sürüklenmektedir. Küçük boyutlu parçacıkların kullanılması analit molekülünün kolon gözeneklerine çabuk ulaşıp etkileşime girmesini ve kolayca ayrılıp yeniden hareketli faz ile taşınmasını sağlamaktadır. Bu sayede analit molekülünün kolon içindeki difüzyonu hızlanmış olup dar bantlar ve pikler elde edilir[77].



Şekil 2. 19 Bant genişliğinde, kütle transfer ve parçacık boyutu ilişkisi



Şekil 2. 20 Analit molekülünün kolon içinde ilerleme tipleri

Van Deemter eşitliğinde en önemli faktör sabit fazın parçacık büyüklüğüdür. Kolonun uzunluğu bilindiği takdirde teorik plaka sayısı (N) değeri parçacık boyutu ile değişmektedir. Küçük parçacıklar yüksek derecede teorik plaka sayısı değeri elde edilmesini ve böylece de ayrışmanın en iyi seviyede olmasını sağlar. Teorik plaka sayısı aynı zamanda hareketli faz akış oranına da bağlı olmakta ve belirlenen optimum akış ile

en yüksek plaka sayısı (N) değerine ve buna bağlı olarak da en düşük HETP değerine ulaşılmaktadır. Düşük akış oranı "N" değerini azaltacağı için HETP değeri de orantılı olarak yükselecektir[80]. Bu faktörlere bağlı olarak kolon performansının ölçüm değeri olan HETP denklemi aşağıdaki Van Deemter eşitliği ile düzenlenmektedir.

$$HETP = A + \frac{B}{u} + Cxu$$

A: eddy diffusion, B: longitudinal difüzyon, u: lineer hız, C: kütle transfer

2.2.9.2.7 Performansın Arttırılması

2.2.9.2.7.1 Sistem Basıncı

Analitik kolonlarda küçük boyutlu parçacıklar kullanılması analit pikinin bant genişliğini azaltmaktadır. Basınç, hareketli fazın geçtiği tüm parçaların (bağlantı boruları, kolon özellikleri, detektör hücresi) gösterdiği direnç sebebiyle oluşmaktadır. Yani, basınç oluşumu kolon ve cihaz aparatlarının ortak etkisi ile oluşmaktadır. Hareketli fazın akış hızı arttırıldığında basınç artışı meydana gelmektedir. Kolon parçacık boyutu azaltıldığında basınç artışı meydana gelir, bunun sebebi basınç ile kolon parçacık çapının ters orantılı oluşudur. Aynı anda, optimum hareketli faz akış hızı (lineer hız), parçacık çapının azalması ile artmakta olup ters orantılıdır. Böylece, optimum lineer akış hızındaki basınç, parçacık çapı ile artmakta olup parçacık çapının küp değeri ile ters orantılı olmaktadır[77]. Mevcut HPLC sistemlerindeki desteklenen basınç limitleri 350–400 bar (5000- 6000 psi) arasındadır.

2.2.9.2.7.2 Sıcaklığın Yükseltilmesi

Genel bir görüş olarak, küçük parçacıklı kolon kullanımı sürtünme sebebiyle kolonda sıcaklık artışına sebep olmakta bu da plaka sayısında azalışa neden olmaktadır. Kolon sıcaklığı arttırılırsa hareketli fazın viskozitesi azalır ve bu da basıncın düşmesini sağlar. Ancak, böyle bir durumda analit molekülünün de kolon gözeneklerinden geçişi (difüzyonu) artacaktır. Bu durumda akış hızının arttırılması sistem performansını olumlu yönde etkileyecektir. Kolon sıcaklığının arttırılması sonucu alıkonma zamanı ve seçicilik parametrelerinde değişiklikler gözlenmektedir. Kolon sıcaklığı 30°C den

90°C'ye arttırıldığında akış hızının da arttırılması sistem etkinliğini korumak için gereklidir[77].

2.2.9.2.7.3 Kolon Parçacık Boyutu ve Uzunluğu Oranı (L/dp)

Kromatografik ayırım sırasında temel amaç, numunenin kolon içinde bileşenlerine ayrılması ve tüm bu bileşenlerin tespit edilebilmesidir. Kolonun gösterdiği bu ayırımın gücü L/dp oranı ile belirlenmektedir. Kolon uzunluğu parçacık boyutuna bölündüğünde elde dilen değer maksimum ayırım gücünü vermektedir.

Boyutları, 4.6x150mm, 5µm olan tipik bir HPLC kolonu için bu değer;

L=150 mm = 150000 µm ve dp=5 µm değerlerinin bölünmesi ile elde edilir.

L/dp = 150000/5 = 30000

Bu oran, kullanılan metodun farklı bir parçacık boyutu ile denenebilmesi için de kullanılmaktadır. Buna göre, parçacık boyutu azaltıldığında kolon uzunluğu da azaltılmak zorunda kalınacak fakat L/dp oranı sabit kalmış olacaktır.

Buna göre, yukarıda boyutları verilen kolon için parçacık boyutu 1,7 µm'a indirilirse kolon uzunluğu da orantı olarak azalacaktır.

L/dp = 50000 / 1,7 = 29412

L/dp oranı değişmeden kolon uzunluğunun azalması optimum akış hızının artmasını böylece de analiz süresinin kısalmasını sağlamaktadır[77].

2.2.10 Validasyon

Kullanılan yöntemin doğru ve kesin olarak sürekli bir şekilde bekleneni gerçekleştirdiğinin kanıtlanması için yapılması gereken işlemleri kapsar.

Analitik yöntem parametreleri:

- Özgünlük
- Doğrusallık
- Konsantrasyon aralığı
- Doğruluk

- Kesinlik
    - Gün içinde tekrarlanabilirlik
    - Günler arası tekrarlanabilirlik
    - Laboratuvarlar arası tekrarlanabilirlik
- Deteksiyon limiti(LOD)
- Kantitatif tayin limiti(LOQ)
- Sağlamlık
- Sistem uygunluk testi

2.2.10.1 Özgünlük

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

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

2.2.10.2 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.

2.2.10.3 Konsantrasyon Aralığı

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

yöntemin kullanımına göre değişir.

2.2.10.4 Doğruluk

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

2.2.10.4.1 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 konsantrasyondaki çözeltilerden 3 defa ölçüm yapılır, çıkan sonuçlar başka bir yöntemle elde edilen sonuçlar ile kıyaslanır ve rapor edilir.

2.2.10.4.2 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.

2.2.10.4.3 Standart katma yöntemi

Analiz edilecek madde karışık bir matriks içinde ise ve matriks hazırlamak imkansız ya da çok zorsa bu yöntem tercih edilir.

2.2.10.5 Kesinlik

- **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.

- **Günler arası tekrarlanabilirlik:** Yöntemin farklı analizciyle, farklı cihazda, farklı günlerde uygulanmasıdır.
- **Laboratuvarlar arası tekrarlanabilirlik:** Farklı laboratuvarda yöntemin uygulanmasıdır.

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

2.2.10.6 Dedeksiyon Limiti

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

- **Görsel değerlendirmeye dayanan yöntem:** Genellikle enstrümantel olmayan miktar tayini yönteminde kullanılır. Örneğin bilinen konsantrasyonları hazırlanır ve güvenilir bir şekilde ölçülebileceği minimum konsantrasyon bulunur.
- **Sinyal/Gürültü oranına dayanan yöntem:** Düşük konsantrasyonda hazırlanan örnek çözeltisi ile elde edilen sinyalin baseline gürültüsüne oranı 3/1 olmalıdır.
- Kalibrasyon eğrisinden yararalanılarak istatistiksel hesaplamalara dayanan yöntemdir.

2.2.10.7 Kantitatif Tayin Limiti

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

- **Görsel değerlendirmeye dayanan yöntem:** Genellikle enstrümantel olmayan miktar tayini yönteminde kullanılır. Örneğin bilinen konsantrasyonları hazırlanır ve doğru ve kesin olarak tayin edilebildiği minimum konsantrasyon hesaplanır.
- **Sinyal/Gürültü oranına dayanan yöntem:** Düşük konsantrasyonda hazırlanan örnek çözeltisi ile elde edilen sinyalin base line gürültüsüne oranı 10/1 olmalıdır.
- Kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak istatistiksel hesaplamalara dayanan yöntemdir.

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

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

Kantitatif analiz için ilk şart, tayini yapılacak maddeyi bilmektir. Bundan sonra bir takım işlemler yapmak gerekir. Bunları şöyle özetlemek mümkündür[81].

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

2.2.10.8 Standart Katma Yöntemi (SK)

Kalibrasyon eğrileri içeriği bilinen standartlarla analitin kütle, hacim veya konsantrasyonunun grafiğidir. Gelen sinyaller neticesinde absorbans, elektromanyetik ışımanın emisyon 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 ekleme yöntemi adı verilir. Genel olarak kalibrasyon eğrisi yönteminde örneğe muhtelif standart ilavesi ile oluşturulan eğride en düzgün doğru elde edilir. X-ekseni ilave edilen standardın konsantrasyonu ise (Spike konsantrasyonu) Beer Kanununa göre eğrinin lineer olması gerekir[81].

BÖLÜM 3

DENEYSEL BÖLÜM

3.1 Bulutlanma Noktası Ekstraksiyonu Yöntemi

3.1.1 Maddeler ve Çözücüler

Distile su, Aseton, Triton X-100, CTAB(Setiltrimetil amonyum bromür), Sodyum klorür, Sitrik asit, Sodyum hidroksit, Hidroklorik asit, Eritrosin (E), İndigotin (IC), Kinolin Sarısı (QY). Kullanılan maddeler analitik saflıktadır. Numune olarak Ferro Sanol Duedonal Kapsül (E, IC, QY içeren), Emedur Film Kaplı Tablet (IC, QY içeren), Aleve Film Kaplı Tablet (IC içeren), TheraFlu Forte Tablet (QY içeren) ve Alfoxil Forte Şurup (E İçeren) kullanılmıştır.

3.1.2 Çözeltiler

Eritrosin stok çözeltisi: Eritrosin'in distile suda 100 µg/mL konsantrasyondaki çözeltisi hazırlandı.

İndigotin stok çözeltisi: İndigotin'in distile suda 100 µg/mL konsantrasyondaki çözeltisi hazırlandı.

Kinolin Sarısı stok çözeltisi: Kinolin Sarısı'nın distile suda 100 µg/mL konsantrasyondaki çözeltisi hazırlandı.

0,5 M Triton X-100: 80,86 g Triton X-100 distile suda çözülerek hacim 250 mL'ye tamamlandı.

0,01 M CTAB: 0,3645 g CTAB distile suda çözülerek hacim 100 mL'ye tamamlandı.

4 M NaCl: 23,36 g NaCl distile suda çözülerek hacim 100 mL'ye tamamlandı.

1 M NaOH: 4 g NaOH distile suda çözülerek hacim 100 mL'ye tamamlandı.

1 M HCl: 8,33 mL derişik HCl distile suyla 100 mL'ye tamamlandı.

pH 2,5 sitrat tamponu: 2,1014 g sitrik asit 20 mL 1 M NaOH'de çözündükten sonra distile suyla hacmi 100 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan çözeltinin 1 M HCl ile pH'ı 2,5 a ayarlandı.

3.1.3 Gereçler

Spektrofotometre (Shimadzu UV-1800 UV-VIS Spectrophotometer), santrifüj cihazı (Centurion Scientific C2 Series 6000rpm), otomatik pipet (Brand Transferpette®S 1000µl), analitik terazi (Kern ABJ 0,1 mg'a kadar duyarlı), çalkalamalı su banyosu (Memmert), kuvars küvetler, cam ve plastik malzemeler.

3.1.4 Çalışma Yöntemi

4 mL 0,5 M Triton X-100, 1 mL 0,01 M CTAB, 1,2 mL 4 M NaCl, 1,5 mL pH 2,5 sitrat tamponu ve boya çözeltisi 10 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve hacim distile suyla tamamlandı. 70˚C'de 30 dk su banyosunda bekletildi ve sonra soğutuldu. Üstten su fazı dekante edildi ve kalan sürfaktan fazı yarı yarıya asetonla seyreltildi. Aynı şekilde hazırlanan boya içermeyen blank çözeltisine karşı 330-700 nm dalga boyu aralığında absorbsiyon spektrumları alındı.

3.1.5 Çalışma Koşullarının Belirlenmesi

Bulutlanma noktası ekstraksiyonunda sıcaklık ve inhibüsyon süresi, sürfaktan maddelerin konsantrasyonları, tuz cinsi ve konsantrasyonu, tampon cinsi ve miktarı gibi parametreler önemli rol oynamaktadır. Başlangıç olarak 5 mL 0,5 M Triton X-100, 0,5 mL 0,01 M CTAB, 2 mL 2M NaCl, 1 mL pH=2,5 sitrat tamponu ve 100µg/mL stok boya çözeltisinden bir miktar ilave edip hacim 10 mL'ye distile suyla tamamlandı. Hazırlanan karışım, 70˚C'de 20 dk su banyosunda bekletildi ve sonra soğutuldu. Üstten su fazı dekante edildi ve kalan sürfaktan fazı yarı yarıya asetonla seyreltildi. Aynı şekilde

hazırlanan boya içermeyen blank çözeltisine karşı 330-700 nm dalga boyu aralığında absorbsiyon spektrumları alındı. Daha sonra her bir boya için parametrelerin optimum düzeyleri araştırıldı.

3.1.5.1 Tuz Cinsi ve Konsantrasyonu Parametrelerinin Belirlenmesi

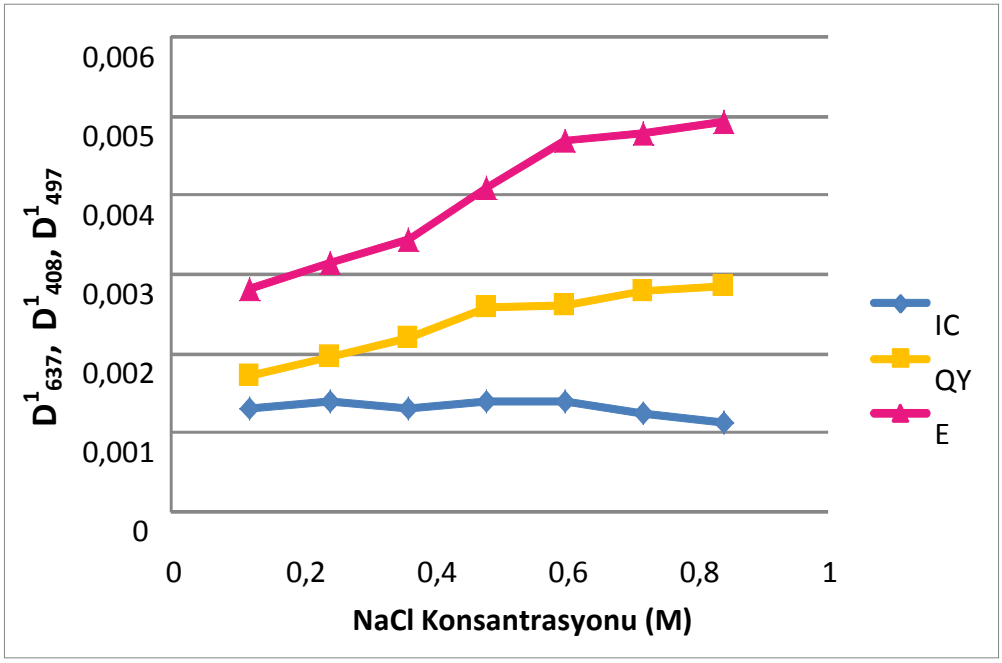
Na_2SO_4, $(NH_4)_2SO_4$, Na_2CO_3, $CaCl_2$, NaCl, KCl ve KNO_3 tuzlarının 2M çözeltileri hazırlanıp CPE yöntemi uygulandı ve en verimli sonuç NaCl tuzu kullanıldığında alındı. Daha sonra tuz konsantrasyonunun etkisini saptamak için 4M NaCl çözeltisi hazırlandı ve 0,3-0,6-0,9-1,2-1,5-1,8-2,1 mL tuz çözeltisi kullanılarak CPE yöntemine tuz konsantrasyonunun etkisi araştırıldı. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.1'de belirtilmiş olup Şekil 3.1'de grafiği oluşturulmuştur.

Şekil 3.1'de görüldüğü üzere E ve QY için tuz konsantrasyonunun artması CPE yönteminde sürfaktan fazına daha fazla boya alındığını göstermesine rağmen IC için doğrusal bir grafik elde edilememiştir. Ayrıca 0,60 M ve üzeri konsantrasyonlarında sürfaktan fazının çok katı bir hal alması ve çözünmesi için tekrardan bir ısıl işleme tabi tutulması gerektiğinden(bu da renklendiricilerin yapısını bir miktar değiştirmektedir) 0,48 M NaCl'nin yeterli olduğu saptandı ve yöntemin uygulamasında 1,2 mL 4M NaCl kullanıldı.

Çizelge 3. 1 IC, QY ve E'nin CPE ile kantitatif tayininde NaCl konsantrasyonunun etkisi

NaCl Konsantrasyonu (M)	IC (λ=638 nm)	QY (λ=408 nm)	E (λ=497 nm)
0,12	0,00129	0,00172	0,00282
0,24	0,00139	0,00195	0,00315
0,36	0,00131	0,00220	0,00345
0,48	0,00138	0,00258	0,00410
0,60	0,00141	0,00261	0,00470
0,72	0,00125	0,00278	0,00479
0,84	0,00113	0,00286	0,00492

*3 paralel çalışmanın ortalaması alınmıştır.



Şekil 3. 1 IC, QY ve E'nin CPE ile kantitatif tayininde NaCl konsantrasyonunun etkisi

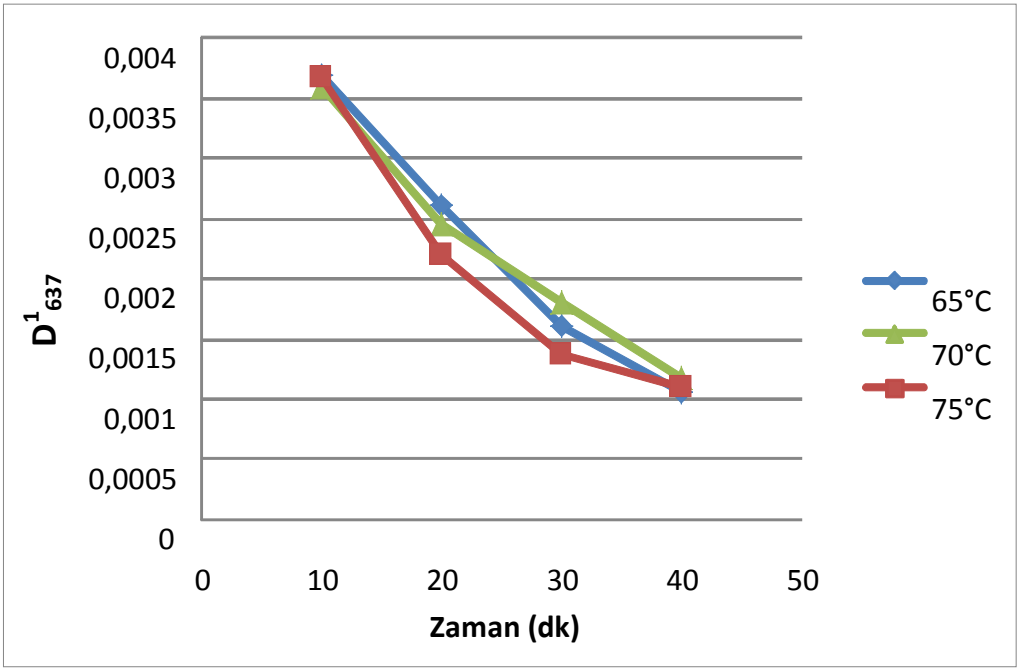
3.1.5.2 Sıcaklık ve Zaman Parametrelerinin Belirlenmesi

Bulutlanma noktası ekstraksiyonu yönteminde belirlenmesi gereken en önemli koşullardan biri yöntemin uygulanması sırasında belirli sıcaklıkta karışımın bir süre bekletilmesidir. Bu nedenle bulutlanma noktası sıcaklığının alt ve üst sıcaklıklarında, 65-70-75 °C'de, hazırlanan karışım 10-20-30-40 dk bekletilerek en yüksek verimin elde edildiği sıcaklık ve zaman değerleri araştırıldı. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.2'de özetlenmiş olup çalışılan üç boya için sıcaklık-zaman-absorbans grafikleri Şekil 3.2, 3.3, 3.4'te gösterildi. Sonuçları değerlendirecek olursak IC için bekletme süresi arttıkça absorbans değeri düşüş göstermesine rağmen QY ve E için bu durum tam tersidir. Sonuç olarak; 3 boyayı birlikte değerlendirecek olursak 70°C 'de 30 dk bekletilmesinin uygun olduğu saptandı.

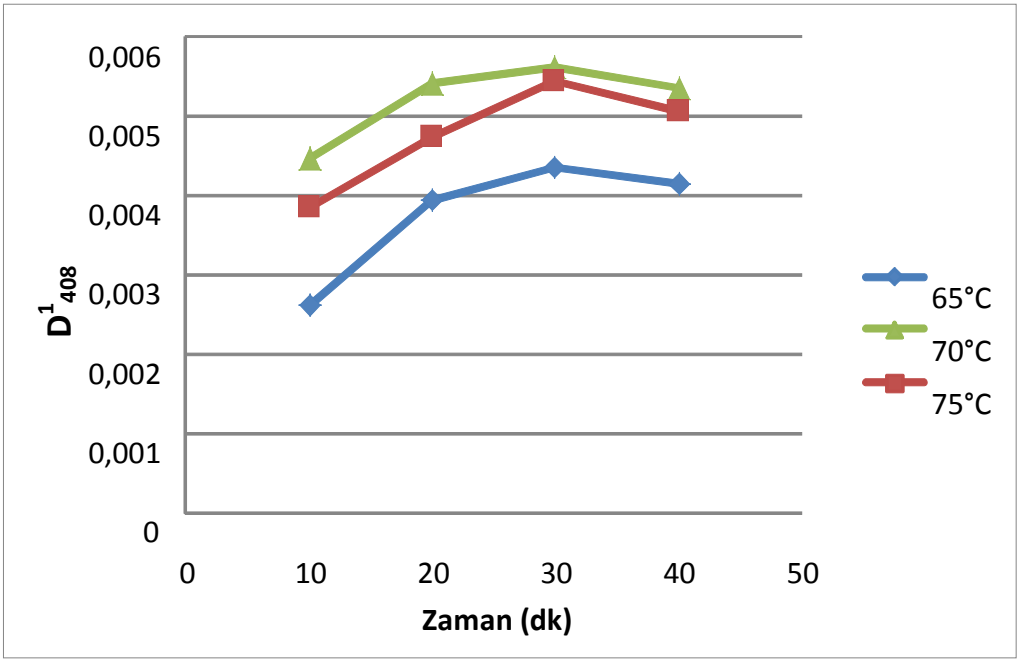
Çizelge 3. 2 IC, QY ve E'nin CPE ile kantitatif tayininde farklı sıcaklık ve inhibüsyon süresinin etkisi

	SICAKLIK								
	65°C			70 °C			75 °C		
ZAMAN	IC (λ=638 nm)	QY (λ=408 nm)	E (λ=497 nm)	IC (λ=638 nm)	QY (λ=408 nm)	E (λ=497 nm)	IC (λ=638 nm)	QY (λ=408 nm)	E (λ=497 nm)
10dk	0,00370	0,00261	0,00215	0,00359	0,00446	0,00303	0,00366	0,00386	0,00236
20dk	0,00261	0,00396	0,00268	0,00246	0,00543	0,00400	0,00220	0,00473	0,00285
30dk	0,00161	0,00437	0,00283	0,00180	0,00561	0,00499	0,00136	0,00546	0,00317
40dk	0,00106	0,00416	0,00275	0,00118	0,00535	0,00435	0,00111	0,00506	0,00306

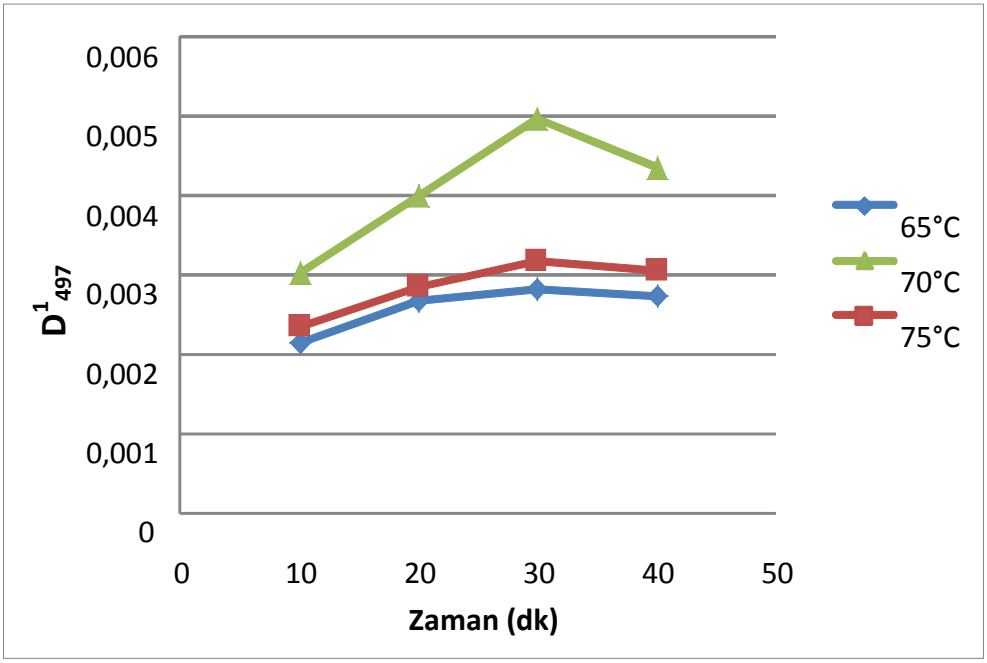
*3 paralel çalışmanın ortalaması alınmıştır.



Şekil 3. 2 IC'nin CPE ile kantitatif tayininde farklı sıcaklık ve inhibüsyon süresinin etkisi



Şekil 3. 3 QY'nin CPE ile kantitatif tayininde farklı sıcaklık ve inhibüsyon süresinin etkisi



Şekil 3. 4 E'nin CPE ile kantitatif tayininde farklı sıcaklık ve inhibüsyon süresinin etkisi

3.1.5.3 Triton X-100 Konsantrasyonu Parametresinin Belirlenmesi

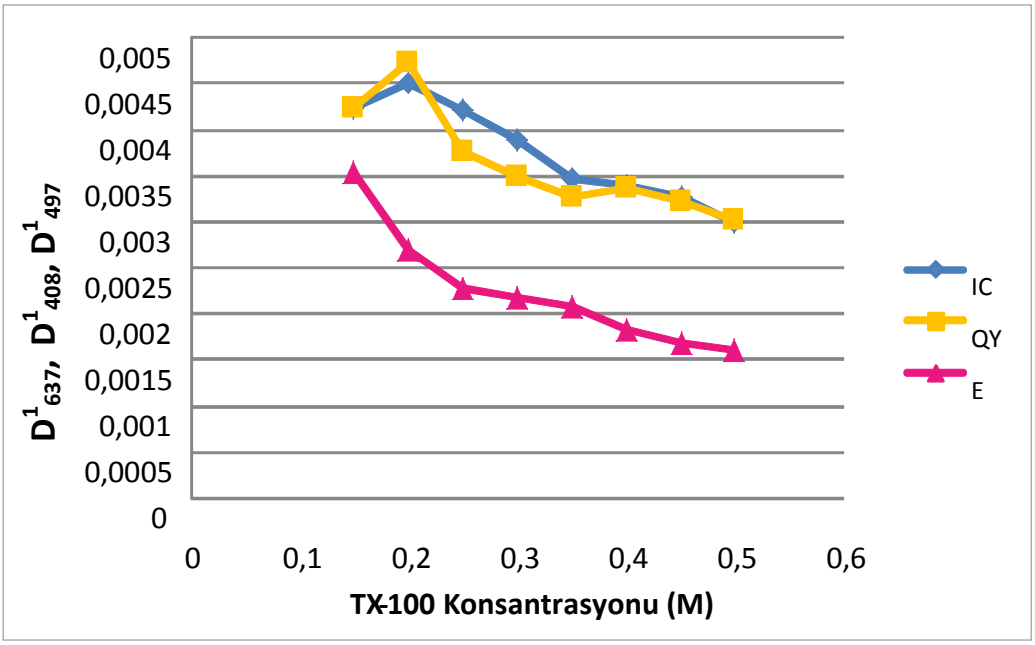
0,5 M Triton X-100 hazırlanarak 3;4;5 mL, 1 M Triton X-100 hazırlanarak 3;3,5;4;4,5;5 mL için ayrı ayrı CPE yöntemi uygulandı. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.3'te ve bu değerler ile elde edilen grafik Şekil 3.5'te verildi. Her üç boya için en uygun

konsantrasyon olarak 0,20 M Triton X-100 seçildi ve yöntemin uygulanmasında 4 mL 0,5 M Triton X-100 olarak kullanıldı.

Çizelge 3. 3 IC, QY ve E'nin CPE ile kantitatif tayininde Triton X-100 konsantrasyonunun etkisi

Triton X-100 Konsantrasyonu (M)	IC (λ=638 nm)	QY (λ=408 nm)	E (λ=497 nm)
0,15	0,00425	0,00424	0,00354
0,20	0,00451	0,00475	0,00271
0,25	0,00421	0,00377	0,00227
0,30	0,00388	0,00349	0,00218
0,35	0,00347	0,00328	0,00207
0,40	0,00340	0,00337	0,00182
0,45	0,00327	0,00323	0,00169
0,50	0,00299	0,00302	0,00161

*3 paralel çalışmanın ortalaması alınmıştır.



Şekil 3. 5 IC, QY ve E'nin CPE ile kantitatif tayininde Triton X-100 konsantrasyonunun etkisi

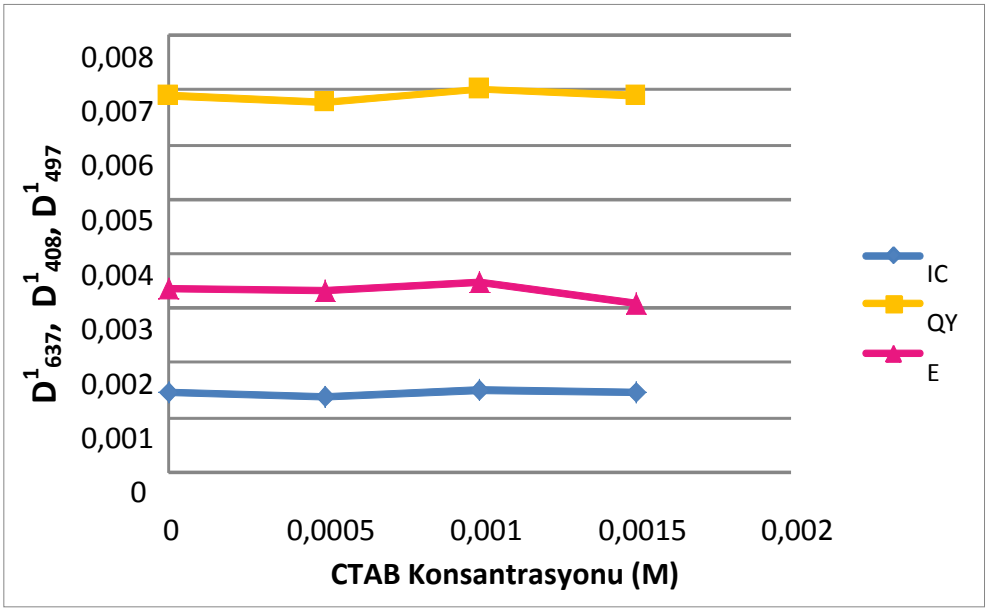
3.1.5.4 CTAB Konsantrasyonu Parametresinin Belirlenmesi

Katyonik sürfaktan olan CTAB, CPE yönteminde sürfaktan ve sulu fazın ayrımını kolaylaştırmasından dolayı önemli bir rol oynamaktadır. Bu nedenle CTAB miktarının CPE yöntemine etkisi araştırıldı. Elde edilen sonuçlara göre çok büyük bir katkı sağlamamasına rağmen 10^{-2}M CTAB'tan 1 mL eklenilmesine karar verildi. Sonuçlar Çizelge 3.4 ve Şekil 3.6'da gösterildi.

Çizelge 3. 4 IC, QY ve E'nin CPE ile kantitatif tayininde CTAB konsantrasyonunun etkisi

CTAB Konsantrasyonu (M)	IC (λ=638 nm)	QY (λ=408 nm)	E (λ=497 nm)
0	0,00145	0,00689	0,00339
0,0005	0,00139	0,00679	0,00334
0,001	0,00151	0,00701	0,00348
0,0015	0,00148	0,00691	0,00310

*3 paralel çalışmanın ortalaması alınmıştır.



Şekil 3. 6 IC, QY ve E'nin CPE ile kantitatif tayininde CTAB konsantrasyonunun etkisi

3.1.5.5 pH Değerinin Belirlenmesi

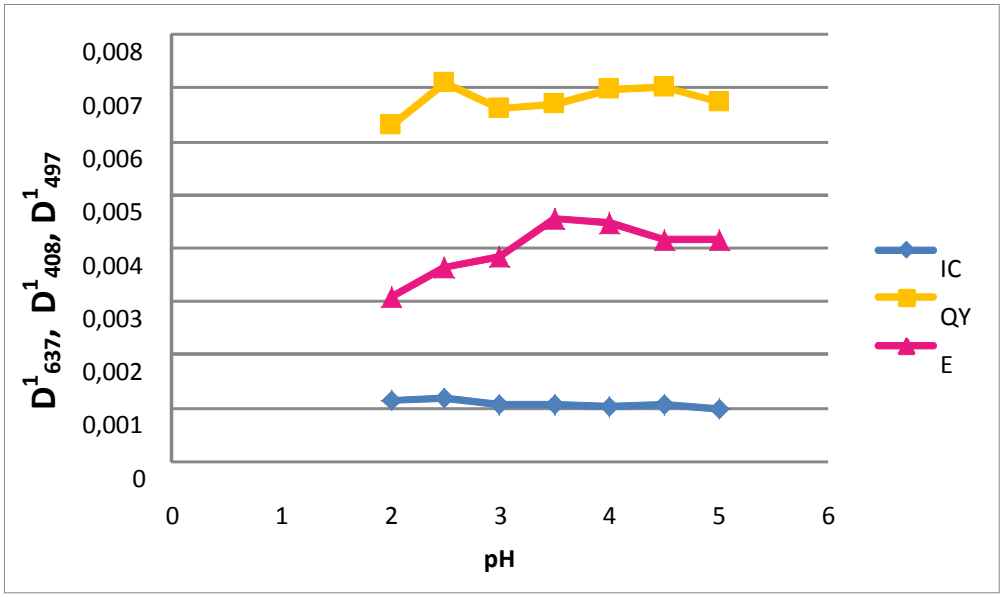
2,1014 g sitrik asit 20 mL 1 M NaOH'de çözündükten sonra distile suyla 100 mL'ye tamamlandı ve hazırlanan çözelti 1 M HCl ile pH 2;2,5;3;3,5;4;4,5;5'e ayrı ayrı

ayarlandı. Hazırlanan tampon çözeltilere CPE yöntemi uygulanarak boyaların ekstraksiyonuna pH etkisi araştırıldı. Boyaların farklı pH değerlerinde daha etkin ekstrakte edildiği gözlemlendi, örneğin; E pH 3,5 sitrat tamponunda en yüksek absorbans değerini verirken QY pH 2,5'ta en yüksek absorbans değerini vermektedir. Bu nedenle, her üç boyayı göz önünde bulundurarak pH 2,5 sitrat tamponunun yöntem için uygun olduğu belirlendi. Çizelge 3.5 ve Şekil 3.7 'de sonuçlar özetlenmiştir.

Çizelge 3. 5 IC, QY ve E'nin CPE ile kantitatif tayininde farklı pH (sitrat tamponu) değerlerinin etkisi

pH	IC (λ=638 nm)	QY (λ=408 nm)	E (λ=497 nm)
2	0,00113	0,00631	0,00311
2,5	0,00117	0,00710	0,00363
3	0,00105	0,00662	0,00386
3,5	0,00106	0,00671	0,00454
4	0,00104	0,00698	0,00447
4,5	0,00107	0,00702	0,00415
5	0,00100	0,00674	0,00418

*3 paralel çalışmanın ortalaması alınmıştır.



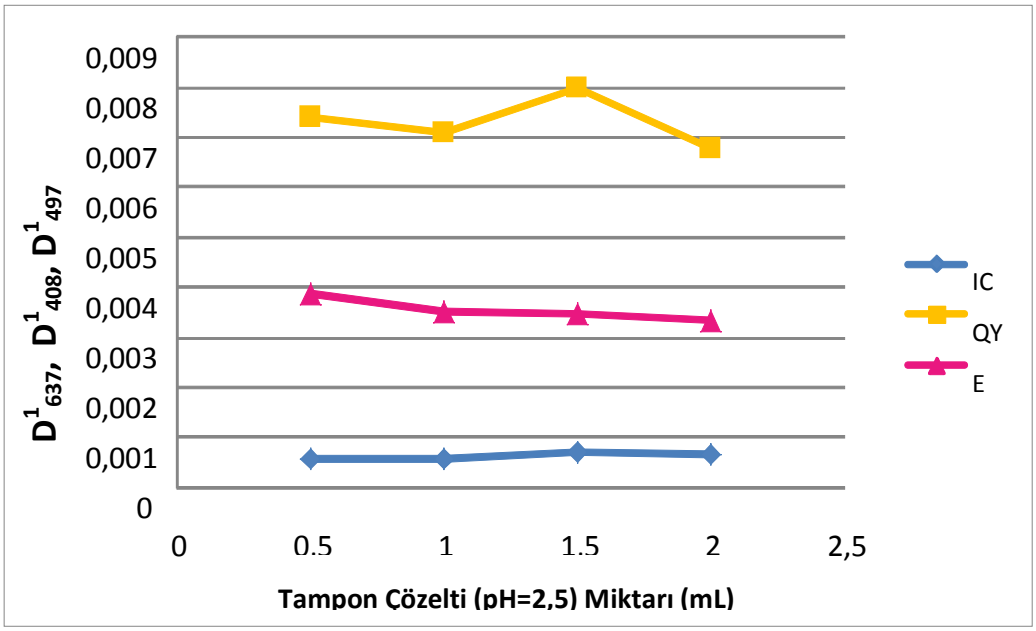
Şekil 3. 7 IC, QY ve E'nin CPE ile kantitatif tayininde farklı pH (sitrat tamponu) değerlerinin etkisi

pH 2,5 sitrat tamponu çalışılacak pH ortamı olarak seçildikten sonra belirlenmesi gereken bir diğer parametre ise CPE yönteminin uygulanmasında ilave edilecek tampon çözelti miktarıdır. Çizelge 3.6 ve Şekil 3.8 'de belirtilen sonuçlar ışığında pH 2,5 sitrat tamponundan 1,5 mL ilave edilmesine karar verildi.

Çizelge 3. 6 IC, QY ve E'nin CPE ile kantitatif tayininde tampon çözeltinin (pH=2,5 sitrat tamponu) miktarının belirlenmesi

Tampon Çözelti Miktarı(mL)	IC (λ=638 nm)	QY (λ=408 nm)	E (λ=497 nm)
0,5	0,00057	0,00740	0,00390
1	0,00057	0,00709	0,00353
1,5	0,00069	0,00797	0,00347
2	0,00065	0,00680	0,00332

*3 paralel çalışmanın ortalaması alınmıştır.



Şekil 3. 8 IC, QY ve E'nin CPE ile kantitatif tayininde tampon çözeltinin (pH=2,5 sitrat tamponu) miktarının etkisi

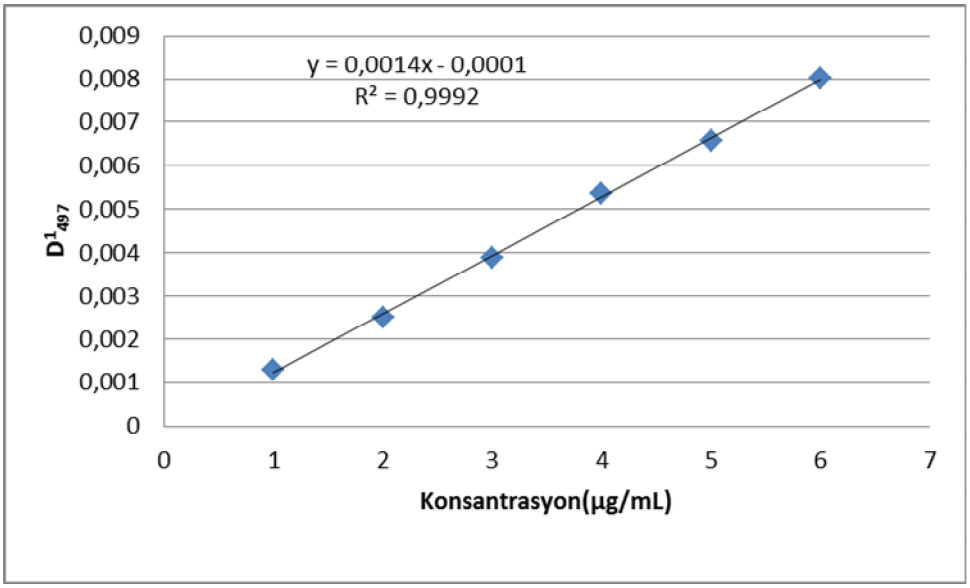
3.1.6 Ölçü Eğrilerinin Oluşturulması

- 100 µg/mL konsantrasyondaki Eritrosin stok çözeltisinden 0,1;0,2;0,3;0,4;0,5;0,6 mL alınarak CPE metodu uygulandı. Sürfaktan fazının ½ oranında seyreltilmesiyle hazırlanan çözeltilerin birinci türev absorpsiyon spektrumları alınarak 497 nm dalga boyunda birinci türev absorbans (D^1_{497})

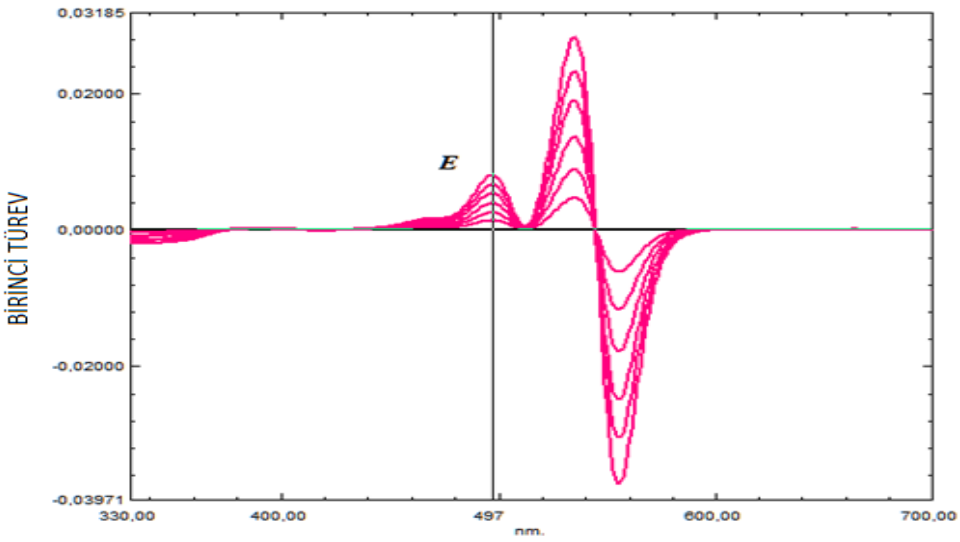
değerleri saptandı. Bu değerler ve karşılık gelen Eritrosin konsantrasyonları arasında ölçü grafiği oluşturuldu.

Çizelge 3. 7 Eritrosinin CPE yöntemi ile ekstraksiyonunda elde edilen birinci türev absorbans (D^1_{497}) ve bağıl standart sapma değerleri

C (µg/mL)	1.seri	2.seri	3.seri	Ortalama	S	%RSD
1	0,00127	0,00132	0,00132	0,00130	$2,88x10^{-5}$	2,21
2	0,00248	0,0025	0,00250	0,00249	$1,15 x10^{-5}$	0,46
3	0,00374	0,00401	0,00387	0,00387	$1,35 x10^{-4}$	3,48
4	0,00539	0,00535	0,00534	0,00536	$2,64 x10^{-5}$	0,49
5	0,00648	0,00666	0,00661	0,00658	$9,29 x10^{-5}$	1,41
6	0,00802	0,00798	0,00805	0,00802	$3,51 x10^{-5}$	0,43



Şekil 3. 9 CPE yönteminde Eritrosin'e ait ölçü eğrisi

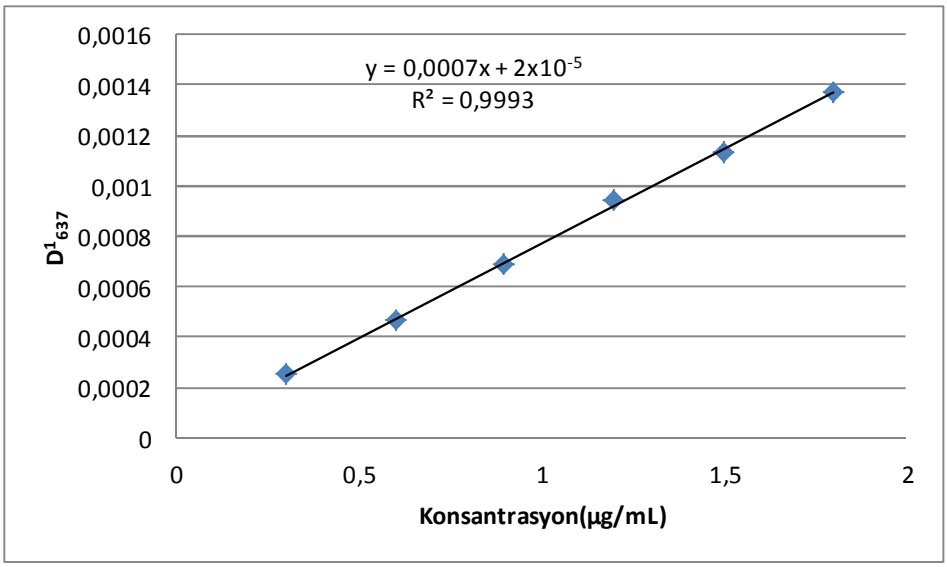


Şekil 3. 10 Eritrosin'in 1-6 µg/mL konsantrasyonlarında alınan birinci türev absorpsiyon spektrumları

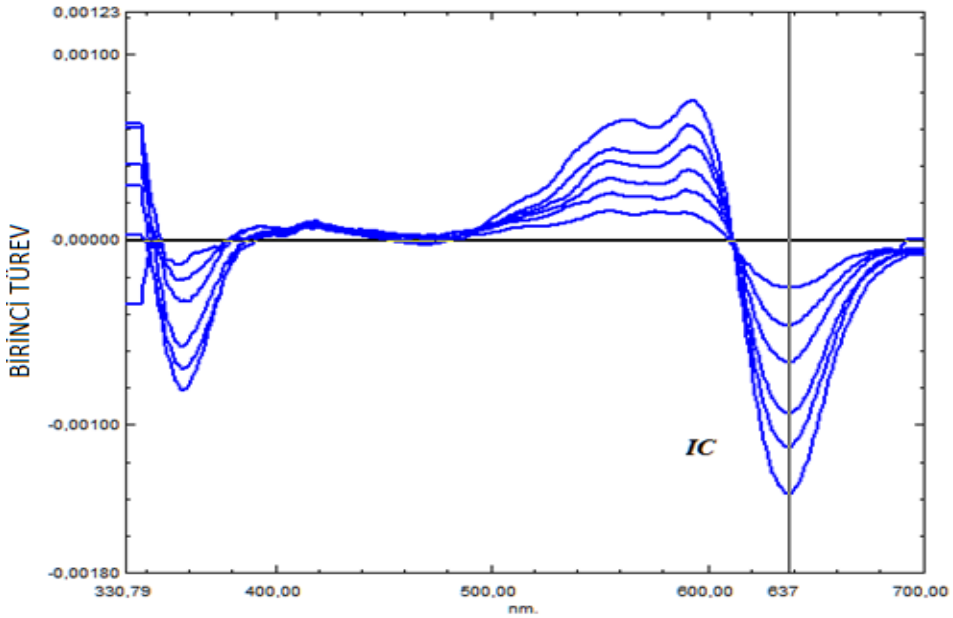
- 100 µg/mL konsantrasyondaki İndigotin stok çözeltisinden 10 mL alınarak 100 mL'ye distile suyla tamamlandı ve 10 µg/mL konsantrasyonunda yeni bir stok çözeltisi hazırlandı. 10 µg/mL konsantrasyondaki İndigotin stok çözeltisinden 0,3;0,6;0,9;1,2;1,5;1,8 mL alınarak CPE metodu uygulandı. Sürfaktan fazının ½ oranında seyreltilmesiyle hazırlanan çözeltilerin birinci türev absorpsiyon spektrumları alınarak 637 nm dalga boyunda (D^1_{637}) absorbans değerleri saptandı. Bu değerler ve karşılık gelen İndigotin konsantrasyonları arasında ölçü grafiği oluşturuldu.

Çizelge 3. 8 İndigotinin CPE yöntemi ile ekstraksiyonunda elde edilen birinci türev absorbans (D^1_{637}) ve bağıl standart sapma değerleri

C(µg/mL)	1.seri	2.seri	3.seri	Ortalama	S	%RSD
0,3	0,00026	0,00026	0,00023	0,00025	$1,73x10^{-5}$	6,92
0,6	0,00048	0,00046	0,00047	0,00047	$1x10^{-5}$	2,12
0,9	0,00067	0,00072	0,00068	0,00069	$2,64x10^{-5}$	3,83
1,2	0,00092	0,00094	0,00096	0,00094	$2x10^{-5}$	2,12
1,5	0,00111	0,00112	0,00117	0,00113	$3,21x10^{-5}$	2,83
1,8	0,00139	0,00138	0,00136	0,00138	$1,52x10^{-5}$	1,10



Şekil 3. 11 CPE yönteminde İndigotin'e ait ölçü eğrisi

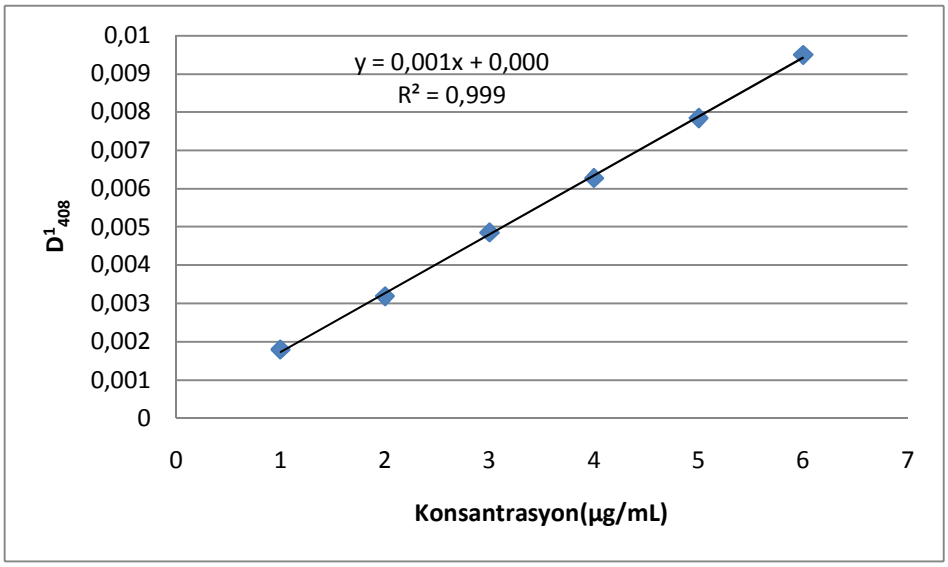


Şekil 3. 12 İndigotin'in 0,3-1,8 µg/mL konsantrasyonlarında alınan birinci türev absorpsiyon spektrumları

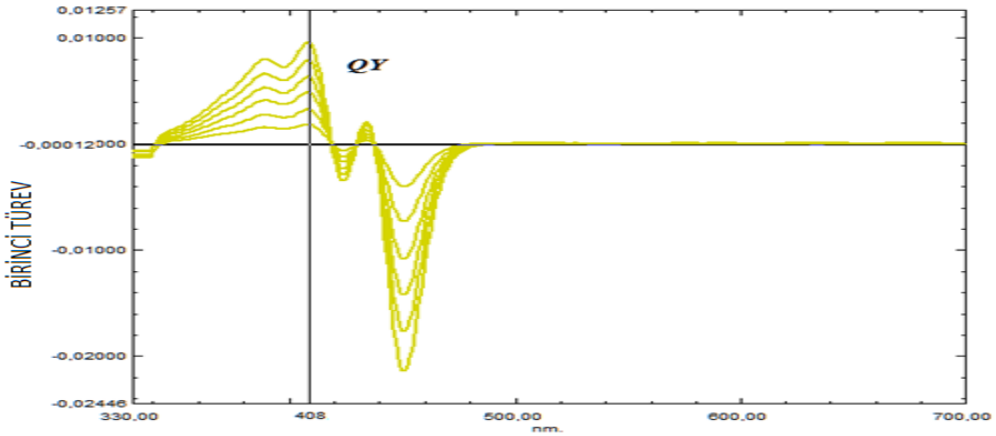
- 100 µg/mL konsantrasyondaki Kinolin Sarısı stok çözeltisinden 0,1;0,2;0,3;0,4;0,5;0,6 mL alınarak CPE metodu uygulandı. Sürfaktan fazının ½ oranında seyreltilmesiyle hazırlanan çözeltilerin birinci türev absorpsiyon spektrumları alınarak 408 nm dalga boyunda (D^1_{408}) absorbans değerleri saptandı. Bu değerler ve karşılık gelen Kinolin sarısı konsantrasyonları arasında ölçü grafiği oluşturuldu.

Çizelge 3. 9 Kinolin Sarısının CPE yöntemi ile ekstraksiyonunda elde edilen birinci türev absorbans (D^1_{408}) ve bağıl standart sapma değerleri

C (µg/mL)	1.seri	2.seri	3.seri	Ortalama	S	%RSD
1	0,00179	0,00179	0,00182	0,00180	$1,73 \times 10^{-5}$	0,96
2	0,00322	0,00314	0,00322	0,00319	$4,61 \times 10^{-5}$	1,44
3	0,00495	0,00484	0,00477	0,00485	$9,07 \times 10^{-5}$	1,86
4	0,00622	0,00632	0,00629	0,00628	$5,13 \times 10^{-5}$	0,81
5	0,00785	0,00784	0,00783	0,00784	1×10^{-5}	0,12
6	0,00957	0,00942	0,00949	0,00949	$7,50 \times 10^{-5}$	0,79



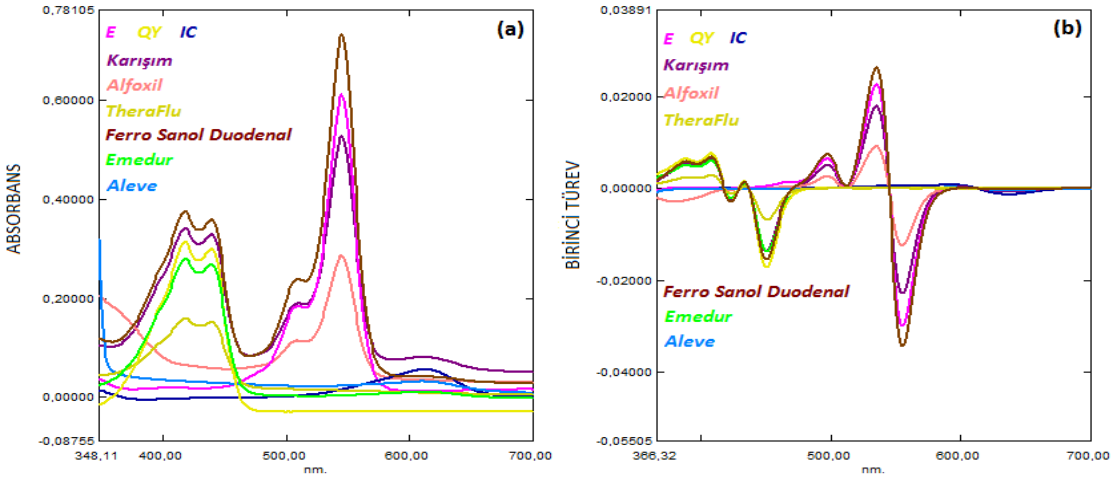
Şekil 3. 13 CPE yönteminde Kinolin Sarısı'na ait ölçü eğrisi



Şekil 3. 14 Kinolin Sarısı'nın 1-6 µg/mL konsantrasyonlarında alınan birinci türev absorpsiyon spektrumları

3.1.7 Yöntemin Numunelere Uygulanması

Film kaplı tabletler, kapsül ve şurup olmak üzere 5 farklı numuneyle çalışıldı. Boyaların (E, QY, IC), boya karışımının (E+QY+IC) ve numunelerin absorpsiyon ve 1. derece türev spektrumları alındı. Üst üste alınan 1. derece türev spektrumları göz önüne alınarak Eritrosin, Kinolin Sarısı ve İndigotin için sırasıyla 497, 408 ve 637 nm dalga boylarının kantitatif tayin için uygun olduğu saptandı ve bu dalga boylarında okunan birinci türev absorbans değerlerinden ve ilgili ölçü grafiklerinden yararlanılarak boya miktarları hesaplandı.

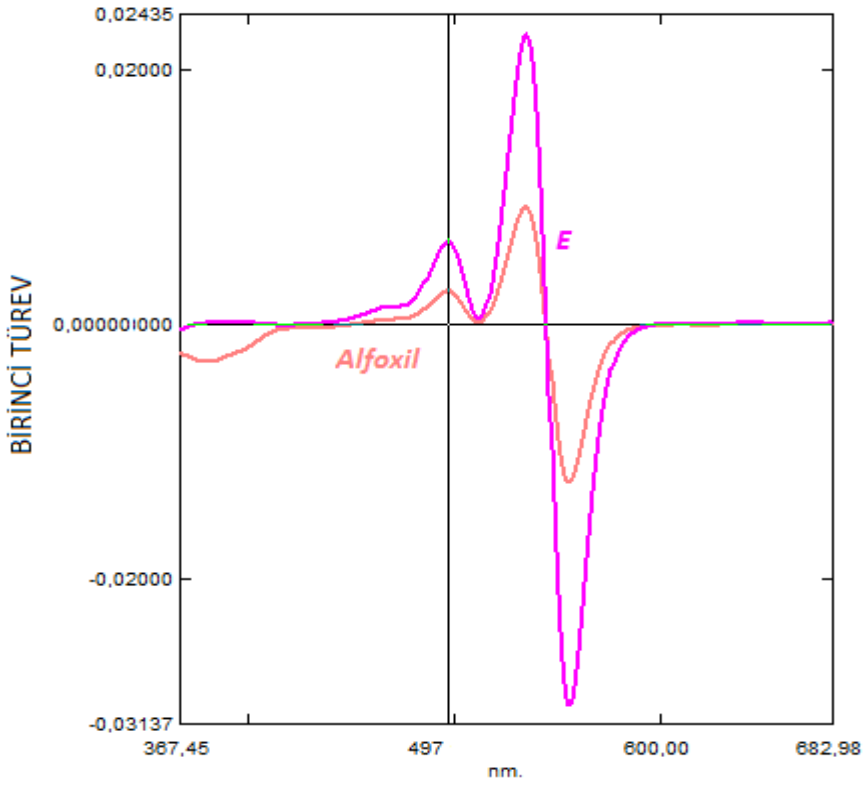


Şekil 3. 15(a) E'nin(4µg/mL), QY'nin(3µg/mL), IC'nin(1,2µg/mL), boya karışımının(3 µg/mL E+4µg/mL QY+1,8µg/mL IC) ve numunelerin absorpsiyon spektrumları (b) E'nin(4µg/mL), QY'nin(3µg/mL), IC'nin(1,2µg/mL), boya karışımının(3µg/mL E+4µg/mL QY+1,8µg/mL IC) ve numunelerin birinci türev absorpsiyon spektrumları

- **Alfoxil Forte 250 mg/5 mL Oral Süspansiyon için Kuru Toz:** 33 g toz içeriğine sahip ilaç prospektüste belirtildiği gibi distile suda çözülerek 100 mL'ye tamamlandı. Daha sonra ilaçtan 2 mL alınarak distile suyla 10 mL 'ye tamamlandı. Hazırlanan çözeltinin 1 mL'sine CPE yöntemi uygulandı ve E için 497 nm 'de birinci türev absorbans değeri kaydedildi. Çalışma 3 kez tekrar edildi ve sonuçlar Çizelge 3.10'da özetlenmiştir. İlaç prospektüsünde şişe içerisinde ~0,002 g boya olduğu belirtilmektedir, başka bir deyişle 60,606 mg/kg E içermektedir. Elde edilen sonuçlara göre ilaç içerisindeki boya miktarı CPE yöntemi ile ~90% verimle saptanmaktadır.

Çizelge 3. 10 Alfoxil şurupta E'nin CPE yöntemine göre kantitatif analiz sonuçları

	E			
	Num. Mik.(mL)	*Ort. D^1_{497}*	*C(µg/mL)*	*Miktar(mg/kg)*
N-1	2	0,00241	1,79	54,24
N-2	2	0,00236	1,76	53,33
N-3	2	0,00247	1,83	55,45
Ort±S(RSD)				54,34±1,06(1,96)

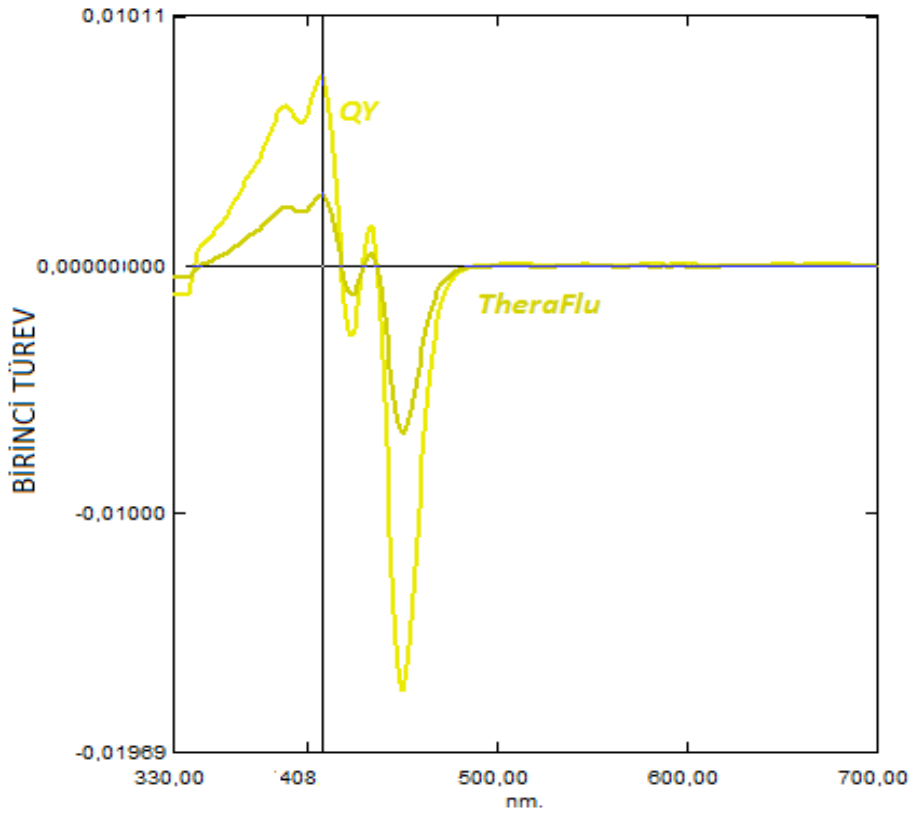


Şekil 3. 16 Eritrosin (4µg/mL) ve Alfoxil'e ait birinci türev absorpsiyon spektrumları

- **TheraFlu Forte Film Tablet:** Numune hazırlığı için öncelikle 20 adet tablet ayrı ayrı tartılıp ortalama tablet ağırlığı (0,8725 g) bulundu. QY içeren film tabletlerden 3 tanesinin ağırlığı alınarak ezildi ve distile suya alındı. Gerekli santrifüj işlemiyle birilikte içerdikleri boya distile suya aktarıldıktan sonra hacim 20 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan çözeltinin 2 mL'sine CPE yöntemi uygulandı ve QY için 408 nm 'de birinci türev absorbans değeri kaydedildi. 9 farklı tabletle çalışılarak 3 farklı numune çözeltisi hazırlandı ve bu çözeltilerin her birine ayrı ayrı üçer kez CPE yöntemi uygulandı. Sonuçlar Çizelge 3.11'de özetlenmiştir.

Çizelge 3. 11 TheraFlu Forte tablette QY'nin CPE yöntemine göre kantitatif analiz sonuçları

	QY			
	Num. Mik.(g)	*Ort.* D^1_{408}	*C(µg/mL)*	*Miktar(mg/kg)*
N-1	2,6155	0,00287	1,78	27,22
N-2	2,6198	0,00289	1,79	27,34
N-3	2,6172	0,00285	1,77	27,05
Ort±S(RSD)				27,20±0,14(0,53)

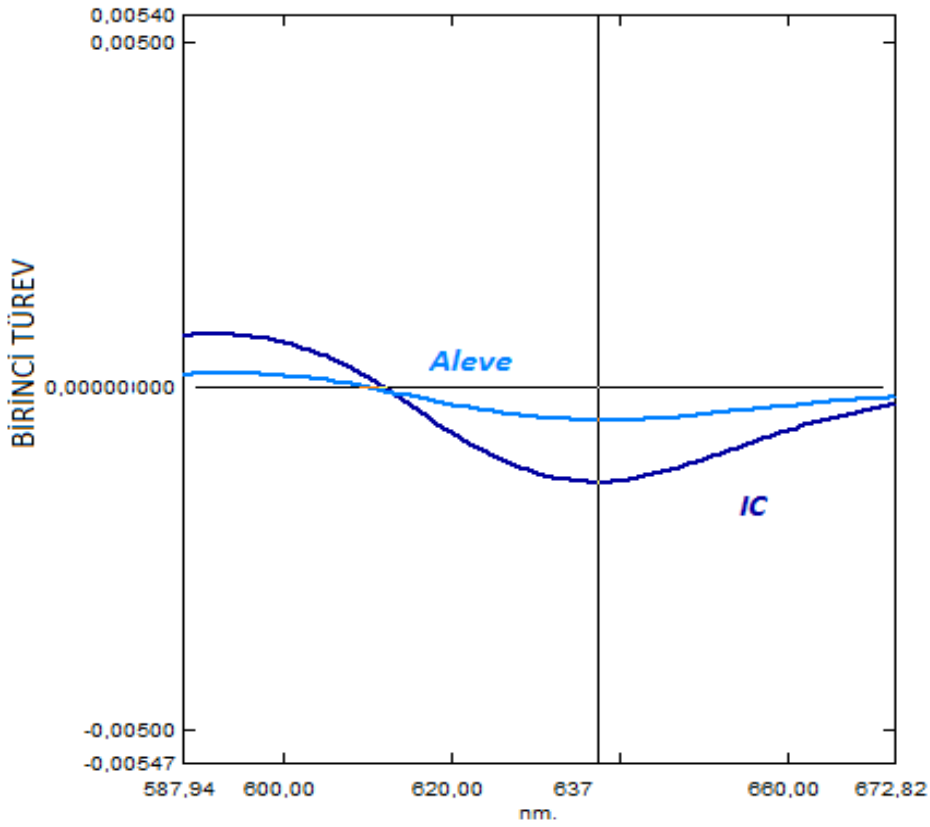


Şekil 3. 17 Kinolin Sarısı (4µg/mL) ve TheraFlu'a ait birinci türev absorpsiyon spektrumları

- **Aleve 220mg Film Kaplı Tablet:** Numune hazırlığı için öncelikle 20 adet tablet ayrı ayrı tartılıp ortalama tablet ağırlığı (0,3125 g) bulundu. IC içeren film kaplı tabletlerden 3 tanesinin ağırlığı alınarak distile suya alındı ve gerekli santrifüj işlemiyle birlikte içerdikleri boya distile suya aktarıldıktan sonra hacim 10 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan çözeltinin 1 mL'sine CPE yöntemi uygulandı ve IC için 637 nm'de birinci türev absorbans değeri kaydedildi. 9 farklı tabletle çalışılarak 3 farklı numune çözeltisi hazırlandı ve bu çözeltilerin her birine ayrı ayrı üçer kez CPE yöntemi uygulandı. Sonuçlar Çizelge 3.12'de özetlenmiştir.

Çizelge 3. 12 Aleve tablette IC'nin CPE yöntemine göre kantitatif analiz sonuçları

	IC			
	Num. Mik.(g)	*Ort. D^1_{637}*	*C(µg/mL)*	*Miktar(mg/kg)*
N-1	0,9428	0,00053	0,72	15,34
N-2	0,9465	0,00055	0,75	15,89
N-3	0,9231	0,00051	0,69	15,03
Ort±S(RSD)				15,42±0,43(2,82)

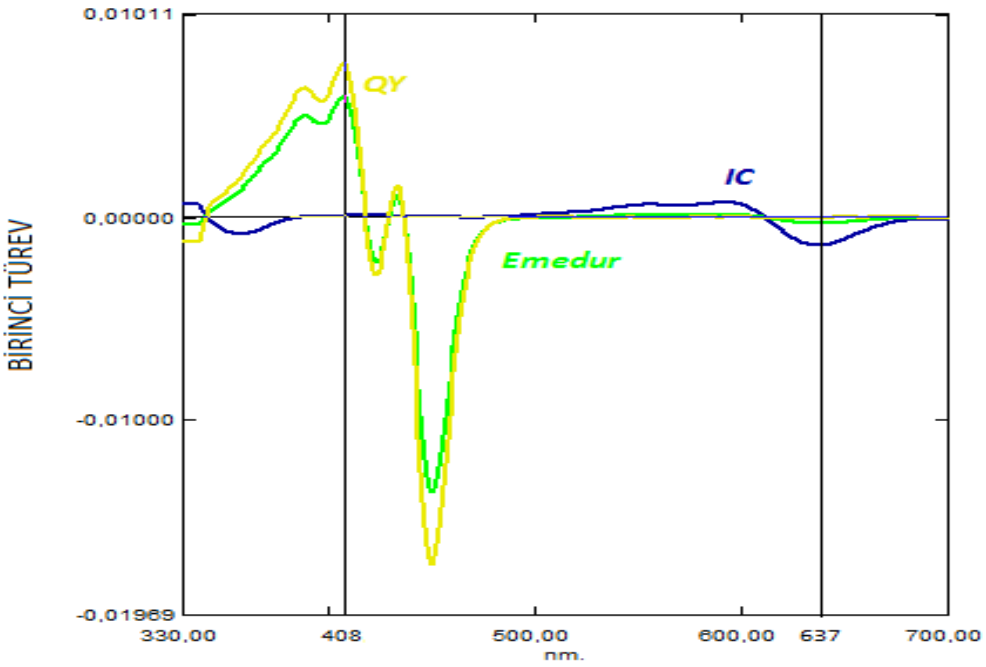


Şekil 3. 18 Indigotin (1,8µg/mL) ve Aleve'ye ait birinci türev absorpsiyon spektrumları

- **Emedur 200mg Film Kaplı Tablet:** Numune hazırlığı için öncelikle 20 adet tablet ayrı ayrı tartılıp ortalama tablet ağırlığı (0,2498 g) bulundu. QY ve IC içeren film kaplı tabletlerden 4 tanesinin ağırlığı alınarak distile suya alındı ve gerekli santrifüj işlemiyle birlikte içerdikleri boya distile suya aktarıldıktan sonra hacim 10 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan çözeltinin 0,5 mL'sine CPE yöntemi uygulandı ve QY için 408 nm'de, IC için 637 nm'de birinci türev absorbans değerleri kaydedildi. 12 farklı tabletle çalışılarak 3 farklı numune çözeltisi hazırlandı ve bu çözeltilerin her birine ayrı ayrı üçer kez CPE yöntemi uygulandı. Sonuçlar Çizelge 3.13'de özetlenmiştir.

Çizelge 3. 13 Emedur tablette QY ve IC'nin CPE yöntemine göre kantitatif analiz sonuçları

		QY			**IC**		
	Num.Mik. (g)	*Ort. D^1_{408}*	*C (µg/mL)*	*Miktar (mg/kg)*	*Ort. D^1_{637}*	*C (µg/mL)*	*Miktar (mg/kg)*
N-1	0,9988	0,00581	3,74	149,77	0,00029	0,381	15,26
N-2	0,9942	0,00573	3,68	148,05	0,00028	0,366	14,72
N-3	1,0043	0,00592	3,81	151,75	0,00029	0,385	15,33
Ort±S(RSD)		149,85±1,85(1,23)			15,1±0,33(2,21)		



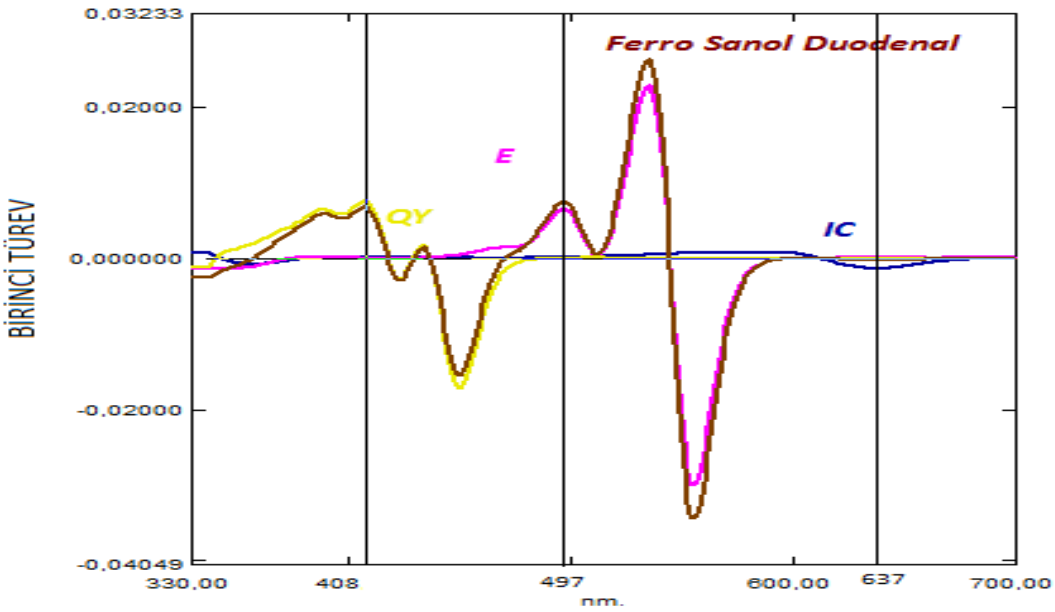
Şekil 3. 19 Kinolin Sarısı (4µg/mL), Indigotin (1,8µg/mL) ve Emedur'a ait birinci türev absorpsiyon spektrumları

- **Ferro Sanol Duodenal Kapsül:** Numune hazırlığı için öncelikle 20 adet kapsül ayrı ayrı tartılıp ortalama kapsül ağırlığı (0,7544 g) bulundu. E, QY ve IC içeren kapsüllerden 1 tanesinin ağırlığı alınıp kapsül içeriği boşaltıldıktan sonra distile suya alındı ve gerekli santrifüj işlemiyle birlikte içerdikleri boya distile suya aktarıldıktan sonra hacim 10 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan çözeltinin 1 mL'sine CPE yöntemi uygulandı ve E için 497 nm'de, QY için 408 nm'de, IC için 637 nm'de birinci türev absorbans değerleri kaydedildi. 3 farklı tabletle çalışılarak 3 farklı numune çözeltisi hazırlandı ve bu çözeltilerin her birine ayrı ayrı üçer kez CPE yöntemi uygulandı. Sonuçlar Çizelge 3. 14'te özetlenmiştir.

Çizelge 3. 14 Ferro Sanol Duodenal kapsülde E, QY ve IC'nin CPE yöntemine göre kantitatif analiz sonuçları

		E			**QY**			**IC**		
	Num. Mik. (g)	*Ort. D^1_{497}*	*C (µg/mL)*	*Miktar (mg/kg)*	*Ort. D^1_{408}*	*C (µg/mL)*	*Miktar (mg/kg)*	*Ort. D^1_{637}*	*C (µg/mL)*	*Miktar (mg/kg)*
N-1	0,7597	0,00735	5,32	140,09	0,00694	4,49	118,29	0,00029	0,39	10,27
N-2	0,7631	0,00741	5,36	140,53	0,00690	4,47	117,06	0,00030	0,40	10,48
N-3	0,7405	0,00718	5,20	140,51	0,00687	4,44	120,04	0,00028	0,38	10,26
Ort±S(RSD)		140,37±0,24(0,17)			118,46±1,49(1,26)			10,34±0,12(1,20)		

4



Şekil 3. 20 Kinolin Sarısı (5µg/mL), Indigotin (1,8µg/mL), Eritrosin(4µg/mL) ve Ferro Sanol Duodenal'a ait birinci türev absorpsiyon spektrumları

3.1.8 Validasyon Çalışmaları

3.1.8.1 Geri Kazanım Çalışmaları

Eritrosin, İndigotin ve Kinolin Sarısı stok çozeltilerinden farklı konsantrasyon oranlarında karıştırılarak hazırlanan farklı kombinasyonlardaki karışımlara CPE yöntemi uygulanarak geri kazanma çalışmaları yapıldı. Her bir konsantrasyon için % geri kazanım değerleri ölçü eğrilerinden yararlanarak ayrı ayrı hesaplandı. Sonuçlar Çizelge 3.15'te özetlendi.

Çizelge 3. 15 Karışım çözeltilerde Eritrosin, İndigotin ve Kinolin sarısına ait % geri kazanım değerleri

Eritrosin	İndigotin	Kinolin Sarısı	Eritrosin(E)			İndigotin(IC)			Kinolin Sarısı(QY)		
			$^1D_{497}$ (ort*)	X(µg/mL)	% Geri Kazanım	$^1D_{637}$ (ort*)	X(µg/mL)	% Geri Kazanım	$^1D_{408}$ (ort*)	X(µg/mL)	% Geri Kazanım
1	0,6	3	0,00132	1,01	101,14	0,00038	0,52	86,66	0,00453	2,88	96,15
1	1,5	4	0,00129	0,99	99,76	0,00114	1,60	106,66	0,00619	3,99	99,77
2	0,9	5	0,00249	1,84	94,40	0,00063	0,86	96,22	0,00741	4,81	96,17
2	1,2	5	0,00254	1,88	92,38	0,00086	1,19	99,58	0,00611	3,94	98,5
3	0,3	3	0,00385	2,82	94,12	0,00022	0,28	93,65	0,00472	3,01	100,37
3	1,2	1	0,00397	2,91	96,90	0,00084	1,16	97,22	0,00163	0,95	95,33
3	1,8	3	0,00392	2,87	95,79	0,00121	1,70	94,7	0,00474	3,03	100,88
4	1,2	2	0,00502	3,65	93,03	0,00076	1,05	87,66	0,00315	1,97	98,44
5	0,3	2	0,00623	4,52	90,42	0,00025	0,33	110,66	0,00308	1,92	96
6	1,8	6	0,00794	5,74	95,71	0,00116	1,62	90,21	0,00931	6,07	101,25
Ortalama±S(RSD)			95,36 ± 3,28 (3,44)			96,32 ± 7,74 (8,04)			98,29 ± 2,24(2,28)		

*3 paralel çalışmanın ortalaması alınmıştır.

3.1.8.2 Gün İçi ve Gün Aşırı Tekrarlanabilirlik

Boyaların yeni hazırlanan 100 µg/mL stok çözeltilerinden her bir boya için ayrı ayrı standart çözelti (1,2 µg/mL IC, 3 µg/mL QY, 3 µg/mL E) hazırlandı ve gün içi hemen, 1 sa

ve 2 sa sonra ayrı ayrı bu çözeltilere CPE yöntemi uygulandı. 3 tekrarla çalışılan standart çözeltilerden elde edilen sonuçlar Çizelge 3. 16'de belirtildi.

Çizelge 3. 16 Çalışılan boyalarda gün içi çalışmaları sonucunda elde edilen standart sapma ve bağıl standart sapma değerleri

Zaman (dk)	IC (637nm)			QY (408nm)			E (497nm)		
	C_{ort} µg/mL	S	%RSD	C_{ort} µg/mL	S	%RSD	C_{ort} µg/mL)	S	%RSD
0	1,21	0,019	1,61	2,97	0,056	1,90	3,04	0,016	0,52
60	1,24	0,007	0,58	3,04	0,030	0,98	3,09	0,049	1,59
120	1,28	0,007	0,57	3,08	0,048	1,56	3,02	0,025	0,82
Ort±SD(RSD)	1,24±0,035(2,82)			3,03±0,06(1,84)			3,05±0,04(1,18)		

*3 paralel çalışmanın ortalaması alınmıştır.

Gün aşırı deneyler içinse yukarıda hazırlanan çözeltilerin üç gün boyunca yine 3 kez çalışılarak elde edilen sonuçlar Çizelge 3.17'da belirtildi.

Çizelge 3. 17 Çalışılan boyalarda gün aşırı çalışmaları sonucunda elde edilen standart sapma ve bağıl standart sapma değerleri

Zaman (gün)	IC (637nm)			QY (408nm)			E (497nm)		
	C_{ort} µg/mL	S	%RSD	C_{ort} µg/mL	S	%RSD	C_{ort} µg/mL	S	%RSD
1.	1,21	0,019	1,61	2,97	0,056	1,90	3,04	0,016	0,52
2.	1,02	0,030	2,98	3,01	0,046	1,53	3,16	0,235	7,43
3.	1,06	0,018	1,75	3,03	0,025	0,84	2,93	0,071	2,27
Ort±SD(RSD)	1,10±0,10(9,13)			3,00±0,03(1,02)			3,04±0,11(3,78)		

*3 paralel çalışmanın ortalaması alınmıştır.

3.1.8.3 Tayin Limiti (LOD) ve Ölçüm Limiti (LOQ)

LOD ve LOQ çalışması için 10 kez hazırlanan blank çözeltinin IC, QY ve E için sırasıyla 637, 408 ve 497 nm'deki 1. türev absorbans değerleri kaydedildi. LOD değerleri standart sapmanın 3 katı, LOQ değerleri ise standart sapmanın 10 katı olarak hesaplandı. Çizelge 3.18'de belirtilmiştir.

Çizelge 3. 18 IC, QY ve E'ye ait LOD (tayin limiti) ve LOQ (ölçüm limiti) değerleri

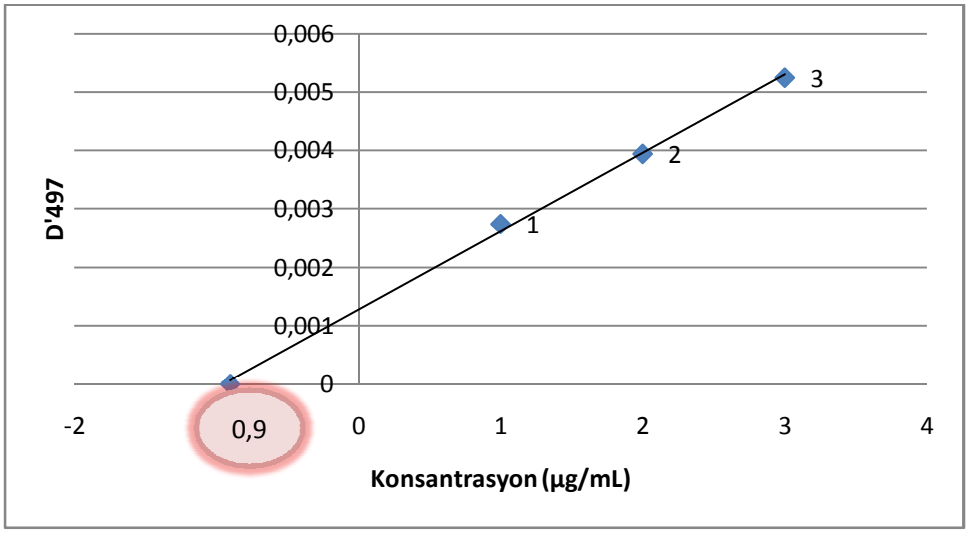
	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
IC (637nm)	0,048	0,160
QY (408nm)	0,057	0,190
E (497nm)	0,031	0,103

3.1.8.4 Standart Katma

İçeriği bilinen numuneye standart boya çözeltisi katılarak elde edilen sonucun olması gereken sonuç ile kıyaslanmasına dayanan validasyon yöntemidir. Her numune için ayrı ayrı denenip Çizelge 3.19, 3.20, 3.21, 3.22, 3.23'te sonuçlar belirtilmiştir.

Çizelge 3. 19 Yalnızca E içeren Alfoxil şuruba uygulanan standart katma çalışmaları sonunda elde edilen % verim değerleri

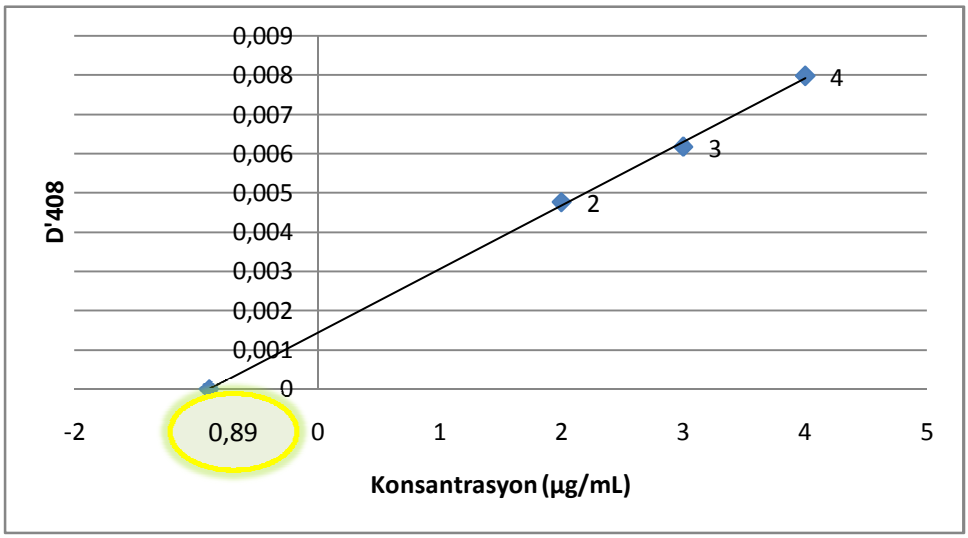
	E			
	Varolan (µg/mL)	*Konulan (µg/mL)*	*Bulunan (µg/mL)*	*% Verim*
N-1	0,90	1	2,03	106,84
N-2	0,88	2	2,89	100,35
N-3	0,92	3	3,82	97,45
Ort±S(RSD)				101,55±4,81(4,73)



Şekil 3. 21 Yalnızca E içeren Alfoxil şuruba uygulanan standart katma çalışmaları

Çizelge 3. 20 Yalnızca QY içeren TheraFlu tabletlere uygulanan standart katma çalışmaları sonucunda elde edilen % verim değerleri

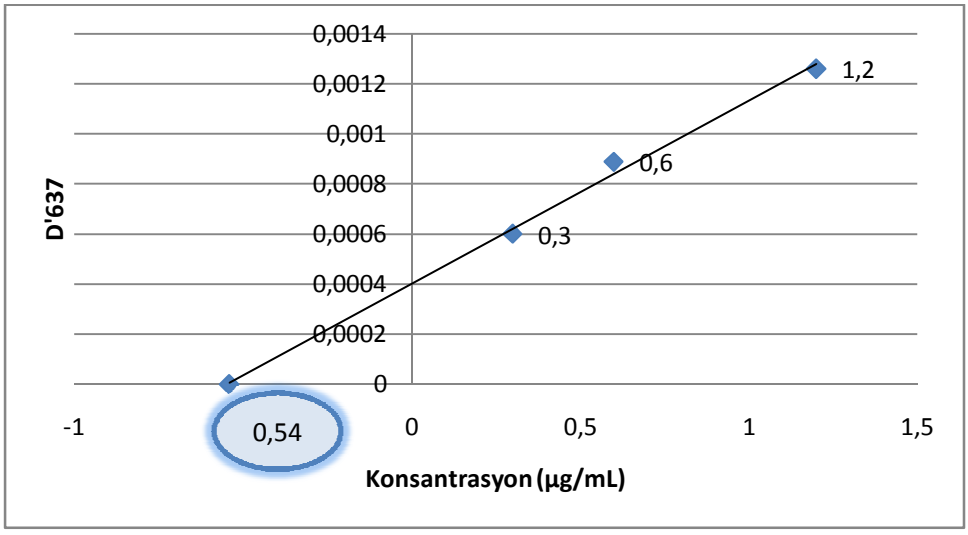
	QY			
	Varolan (µg/mL)	*Konulan (µg/mL)*	*Bulunan (µg/mL)*	*% Verim*
N-1	0,89	2	3,04	105,19
N-2	0,895	3	3,98	102,18
N-3	0,885	4	5,18	106,03
Ort±S(RSD)				104,47±2,02(1,94)



Şekil 3. 22 Yalnızca QY içeren TheraFlu tabletlere uygulanan standart katma çalışmaları

Çizelge 3. 21 Yalnızca IC içeren Aleve tabletlere uygulanan standart katma çalışmaları sonucunda elde edilen % verim değerleri

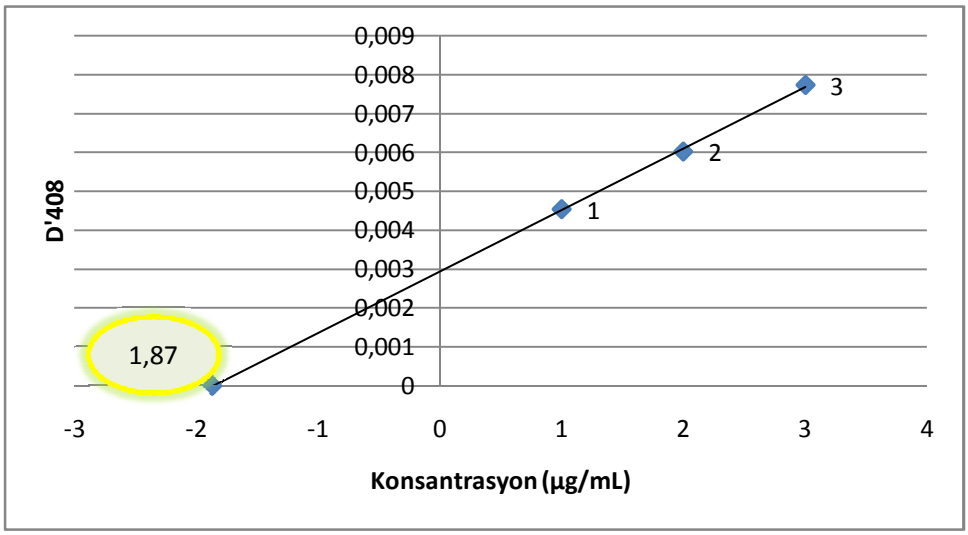
	IC			
	Varolan (µg/mL)	*Konulan (µg/mL)*	*Bulunan (µg/mL)*	*% Verim*
N-1	0,54	0,3	0,83	98,81
N-2	0,56	0,6	1,24	106,90
N-3	0,52	1,2	1,77	102,91
Ort±S(RSD)			102,87±4,06(3,93)	



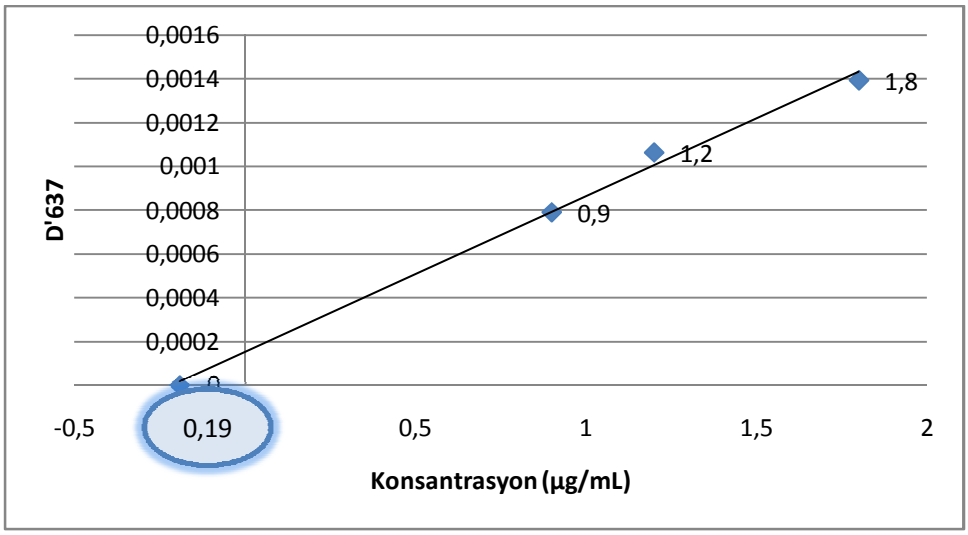
Şekil 3. 23 Yalnızca IC içeren Aleve tabletlere uygulanan standart katma çalışmaları

Çizelge 3. 22 QY ve IC içeren Emedur tabletlere uygulanan standart katma çalışmaları sonucunda elde edilen % verim değerleri

	QY				IC			
	Varolan (µg/mL)	*Konulan (µg/mL)*	*Bulunan (µg/mL)*	*% Verim*	*Varolan (µg/mL)*	*Konulan (µg/mL)*	*Bulunan (µg/mL)*	*% Verim*
N-1	1,87	1	2,89	100,70	0,19	0,9	1,10	100,92
N-2	1,84	2	3,88	101,04	0,18	1,2	1,49	107,97
N-3	1,90	3	5,02	102,44	0,19	1,8	1,96	98,49
Ort±S(RSD)	101,39±0,92(0,91)				102,49±4,92(4,80)			



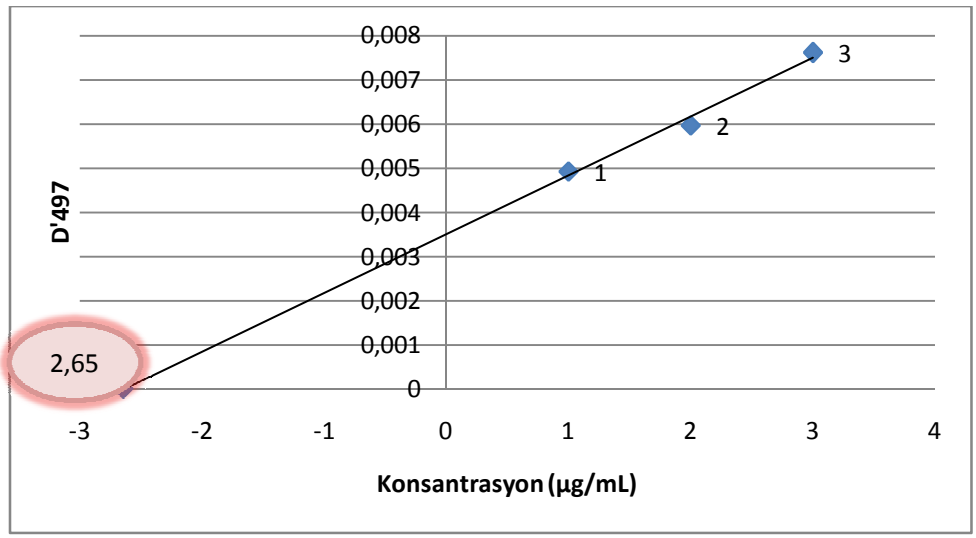
Şekil 3. 24 QY ve IC içeren Emedur tabletlere QY katılarak uygulanan standart katma çalışmaları



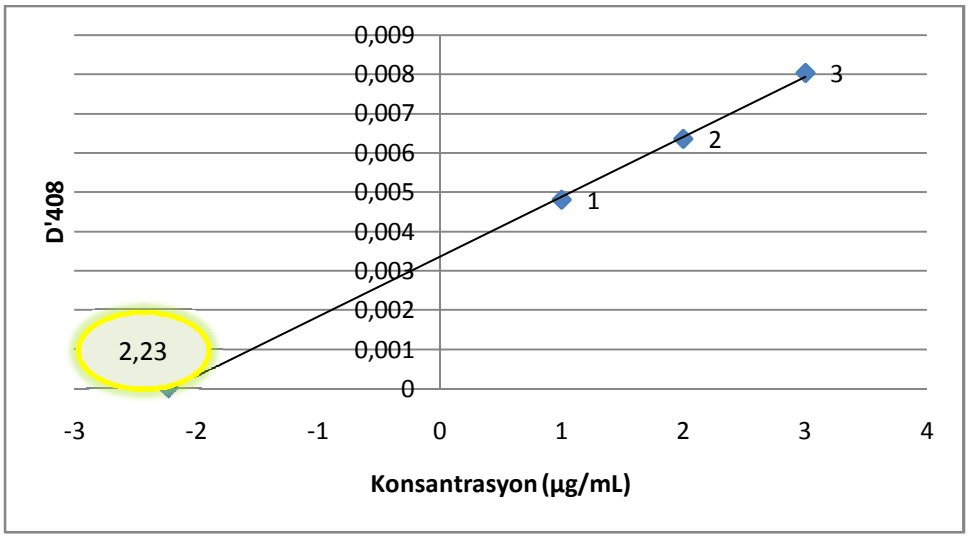
Şekil 3. 25 QY ve IC içeren Emedur tabletlere IC katılarak uygulanan standart katma çalışmaları

Çizelge 3. 23 E, QY ve IC içeren Ferro Sanol Duodenal kapsüllere uygulanan standart katma çalışmaları sonucunda elde edilen % verim değerleri

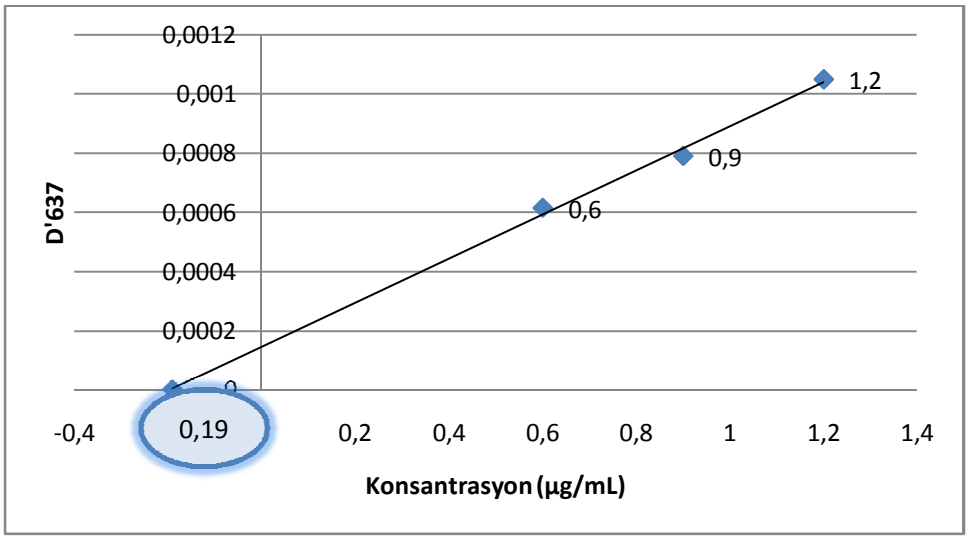
	E				QY				IC			
	Varolan (µg/mL)	*Konulan (µg/mL)*	*Bulunan (µg/mL)*	*% Verim*	*Varolan (µg/mL)*	*Konulan (µg/mL)*	*Bulunan (µg/mL)*	*% Verim*	*Varolan (µg/mL)*	*Konulan (µg/mL)*	*Bulunan (µg/mL)*	*% Verim*
1	2,66	1	3,59	98,09	2,25	1	3,07	94,46	0,19	0,6	0,85	107,59
2	2,68	2	4,34	92,73	2,23	2	4,11	97,16	0,21	0,9	1,10	99,10
3	2,60	3	5,51	98,39	2,22	3	5,22	100,00	0,17	1,2	1,47	107,30
	Ort±S(RSD) =		96,40±3,18(3,30)		*Ort±S(RSD) =*		97,21±2,77(2,85)		*Ort±S(RSD) =*		104,66±4,82(4,60)	



Şekil 3. 26 E, QY ve IC içeren Ferro Sanol Duodenal kapsüllere E katılarak uygulanan standart katma çalışmaları



Şekil 3. 27 E, QY ve IC içeren Ferro Sanol Duodenal kapsüllere QY katılarak uygulanan standart katma çalışmaları



Şekil 3. 28 E, QY ve IC içeren Ferro Sanol Duodenal kapsüllere IC katılarak uygulanan standart katma çalışmaları

3.2 HPLC Yöntemi

3.2.1 Maddeler ve Çözücüler

MilliQ su, Metanol, Asetonitril, Amonyum Asetat, Asetik Asit, Etanol, Amonyak, Eritrosin (E), İndigotin (IC), Kinolin Sarısı (QY). Kullanılan maddeler analitik saflıktadır ve çözücüler HPLC için uygundur. Numune olarak Ferro Sanol Duedonal Kapsül (E, IC, QY içeren), Emedur Film Kaplı Tablet (IC, QY içeren), Aleve Film Kaplı Tablet (IC içeren), TheraFlu Forte Tablet (QY içeren) ve Alfoxil Forte Şurup (E İçeren) kullanılmıştır.

3.2.2 Çözeltiler

Eritrosin stok çözeltisi: Eritrosin'in milliQ suda 1000 µg/mL konsantrasyondaki çözeltisi hazırlandı.

İndigotin stok çözeltisi: İndigotin'in milliQ suda 1000 µg/mL konsantrasyondaki çözeltisi hazırlandı.

Kinolin Sarısı stok çözeltisi: Kinolin Sarısı'nın milliQ suda 1000 µg/mL konsantrasyondaki çözeltisi hazırlandı.

0,1 M Amonyum Asetat Çözeltisi (pH=7): 7,703 g amonyum asetat milliQ suyla 100 mL hacme tamamlandı.

Metanol/Asetonitril: 1:1 oranında karıştırılarak hazırlandı.

%1 Asetik Asit Çözeltisi: 1 mL asetik asit milliQ suyla 100 mL hacme tamamlandı.

%6 Asetik asit Çözeltisi: 6 mL asetik asit milliQ suyla 100 mL hacme tamamlandı.

%1 Amonyak/Etanol Çözeltisi: 1 mL amonyak milliQ suyla 100 mL hacme tamamlandı. Daha sonra %1 amonyak çözeltisi ve etanol 1:1 oranında karıştırıldı.

Metanol/Su: 1:1 oranında karıştırılarak hazırlandı.

3.2.3 Gereçler

HPLC (Shimadzu Prominence), santrifüj cihazı (Centurion Scientific C2 Series 6000rpm), otomatik pipet (Brand Transferpette®S 1000µl), analitik terazi (Kern ABJ 0,1 mg'a kadar duyarlı), Rotary Evaporatör (HeidolphLaborota 4001 efficient), filtre kağıdı (Millipore HVLP 0,45µm), steril şırınga filtresi (Millipore PTFE 0,45µm), cam ve plastik malzemeler.

3.2.4 Çalışma Yöntemi

Mobil Faz A: 0,1 M Amonyum Asetat Çözeltisi (pH=7)

Mobil Faz B: Metanol/Asetonitril (1:1, v/v)

Akış Hızı: 1,5 mL/dk

Kolon Tipi: C_{18}

Kolon Sıcaklığı: 50°C

Enjeksiyon Hacmi: 20µl

λ: 350-800 nm

Çizelge 3. 24 Gradient sistem için zamana bağlı çözücü oranları

Zaman (dk)	A(%)	B(%)
0	97	3
18	40	60
20	40	60
30	97	3

HPLC ile yapılan miktar tayini çalışmasında literatür araştırılması sonucunda seçilen metod modifiye edilerek uygulanmıştır[39].

QY, E ve IC stok çözetilerinden, milliQ suyla seyreltilerek hazırlanan standart çözeltiler (2,5-12,5 µg/mL E; 0,2-1 µg/mL IC; 2,5-12,5 µg/mL QY) viallere alınıp sisteme oto-sampler aracılığıyla enjekte edildi.

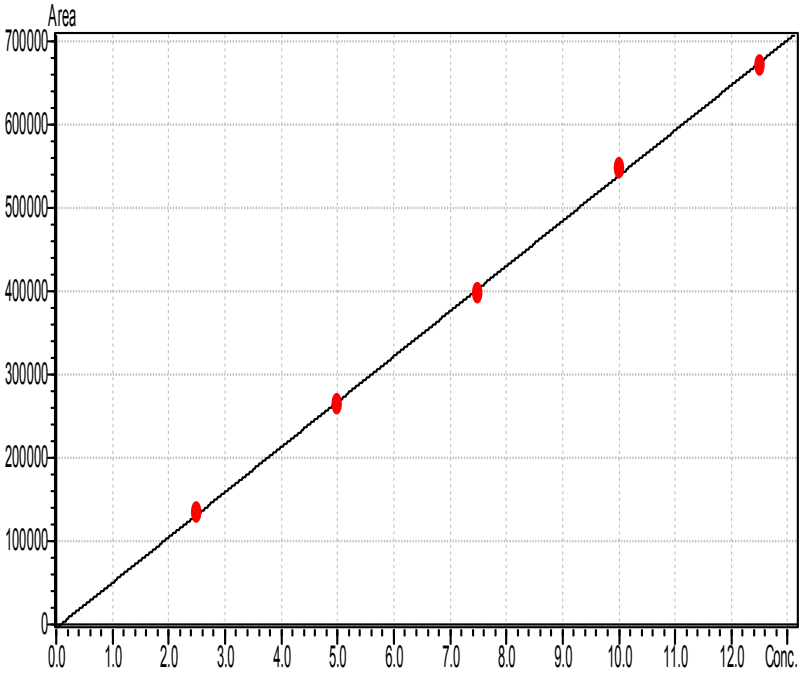
Numuneler için oluşturulan çalışma yönteminde ise; numuneler milli Q suda çözüldü ve gerekli olduğu taktirde santrifüj işlemi uygulandı. Daha sonra 0,45µm şırınga filtresi önce %1 asetik asitle şartlandırıldı, ardından numune filtreden geçirildi ve filtre milliQ suyla yıkandı. Şırınga filtresi %1 amonyak/etanol (1:1, v/v) çözeltisiyle yıkandıktan sonra süzüntü % 6 asetik asit çözeltisiyle nötralize edildi ve boya içerikli süzüntü rotary evaporatör yardımıyla çözücülerinden arındırıldı. Rotary balonunda kalan boya kalıntıları metanol/su (1:1, v/v) çözeltisiyle seyreltilerek HPLC'ye enjekte edildi.

3.2.5 Ölçü Eğrilerinin Oluşturulması

- 1000 µg/mL konsantrasyondaki Eritrosin stok çözeltisinden 2,5;5;7,5;10;12,5 µg/mL konsantrasyonlarında standart çözeltiler hazırlanıp HPLC'ye enjekte edildi. Daha sonra 530 nm'de 20,490. dk'da çıkan kromatogram alanlarından faydalanarak alana bağlı konsantrasyon grafiği oluşturulmuştur.

Çizelge 3. 25 HPLC yönteminde E'ye ait 20,490. dk 'da çıkan pik alanları ve bağıl standart sapma değerleri

C (µg/mL)	Alan 1	Alan 2	Alan 3	Ort. Alan	S	%RSD
2,5	134757	134362	135020	134713	331,22	0,25
5	264620	264330	260635	263195	2221,67	0,84
7,5	397202	395063	396611	396292	1104,58	0,28
10	547276	548670	545834	547260	1418,17	0,26
12,5	670116	671206	669314	670212	949,65	0,14



Y = aX + b

a = 54202,57

b = -4184,824

R^2 = 0,9991307

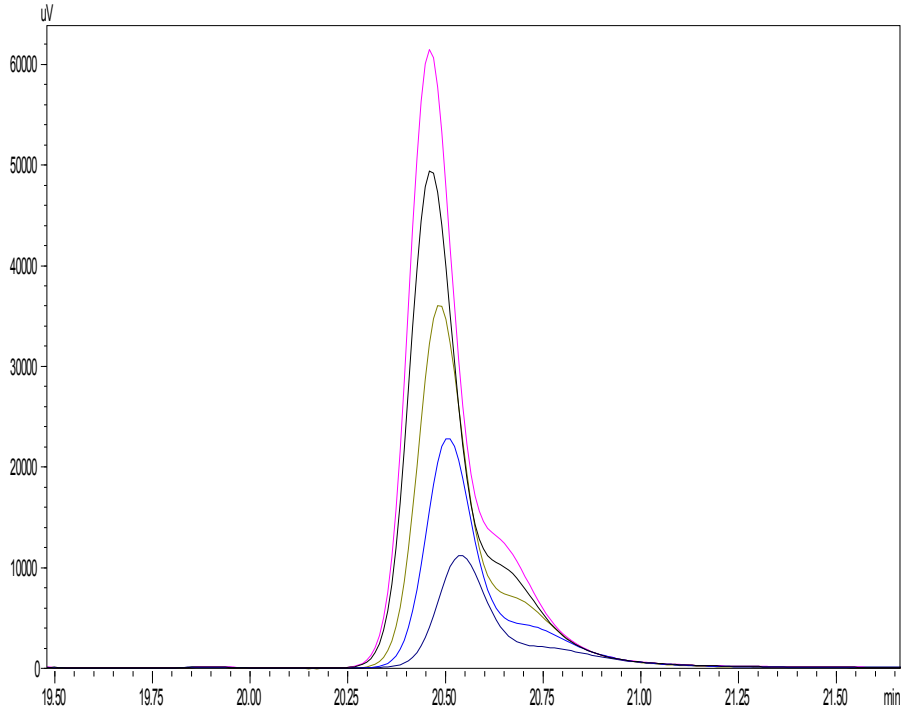
R = 0,9995653

Mean RF: 53541,20

RF S: 803,1058

RF %RSD: 1,499977

Şekil 3. 29 HPLC yönteminde 2,5-12,5 µg/mL konsantrasyon aralığında E'ye ait kalibrasyon grafiği

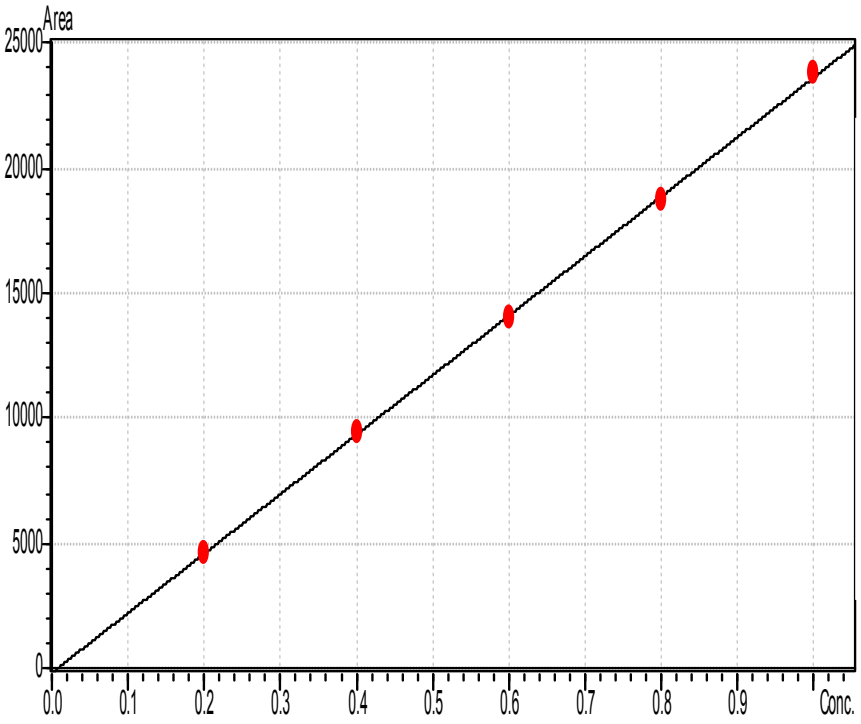


Şekil 3. 30 E'nin 2,5-12,5 µg/mL konsantrasyonları için alınan HPLC kromatogramları

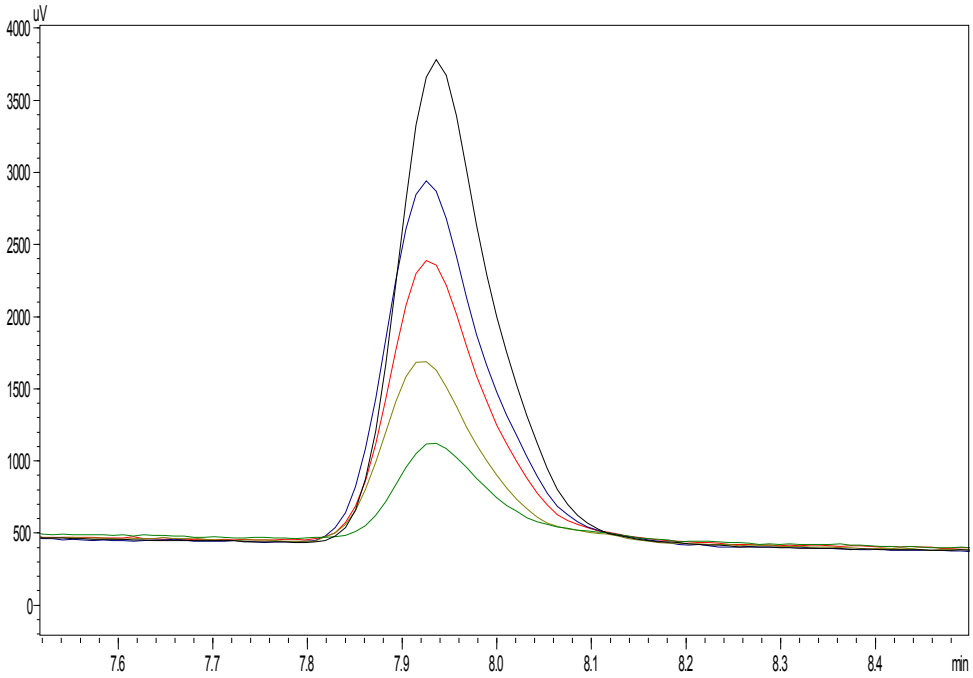
- 1000 µg/mL konsantrasyondaki Indigotin stok çözeltisinden 0,2;0,4;0,6;0,8;1 µg/mL konsantrasyonlarında standart çözeltiler hazırlanıp HPLC'ye enjekte edildi. Daha sonra 608 nm'de 7,933. dk'da çıkan kromatogram alanlarından faydalanarak alana bağlı konsantrasyon grafiği oluşturulmuştur.

Çizelge 3. 26 HPLC yönteminde IC'ye ait 7,933. dk'da çıkan pik alanları ve bağıl standart sapma değerleri

C (µg/mL)	Alan 1	Alan 2	Alan 3	Ort. Alan	S	%RSD
0,2	4572	4566	4603	4580	19,83	0,43
0,4	9467	9474	9482	9475	7,49	0,08
0,6	13964	14084	13942	13997	76,48	0,55
0,8	18622	18769	18627	18673	83,17	0,44
1	23894	23824	23674	23797	112,45	0,47



Şekil 3. 31 HPLC yönteminde 0,2-1 µg/mL konsantrasyon aralığında IC'ye ait kalibrasyon grafiği

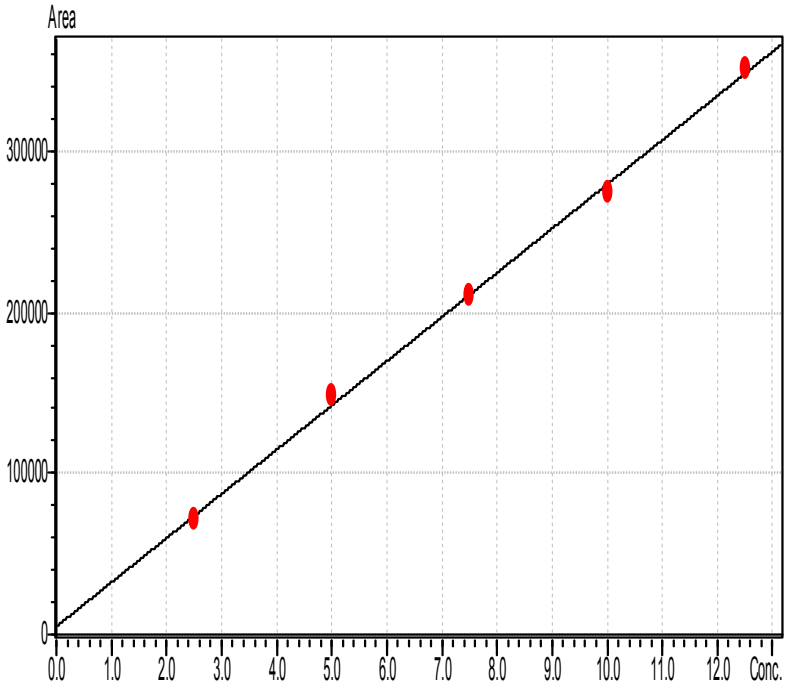


Şekil 3. 32 IC'nin 0,2-1 µg/mL konsantrasyonları için alınan HPLC kromatogramları

- 1000 µg/mL konsantrasyondaki Kinolin Sarısı stok çözeltisinden 2,5;5;7,5;10;12,5 µg/mL konsantrasyonlarında standart çözeltiler hazırlanıp HPLC'ye enjekte edildi. Daha sonra 413 nm'de 9,864. dk'da çıkan kromatogram alanlarından faydalanarak alana bağlı konsantrasyon grafiği oluşturulmuştur.

Çizelge 3. 27 HPLC yönteminde QY'ye ait 9,864. dk'da çıkan pik alanları ve bağıl standart sapma değerleri

C (µg/mL)	Alan 1	Alan 2	Alan 3	Ort. Alan	S	%RSD
2,5	70996	71140	71062	71066	71,83	0,10
5	146770	146824	148331	147308	885,94	0,60
7,5	210877	211295	211220	211131	222,79	0,10
10	274112	274478	273418	274003	538,80	0,20
12,5	350580	351321	351010	350970	372,28	0,11



Y = aX + b

a = 27460,12

b = 4944,723

R^2 = 0,9985062

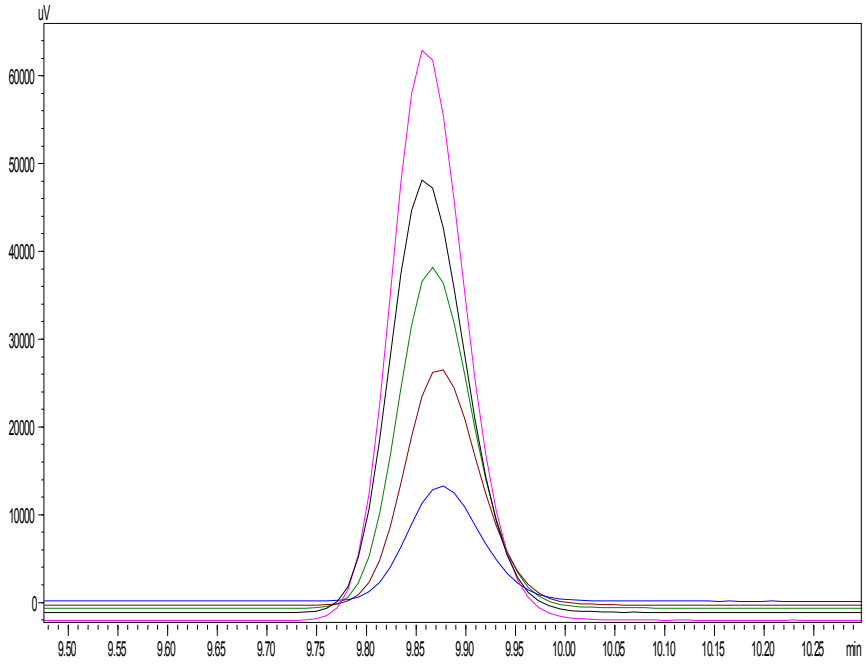
R = 0,9992528

Mean RF: 28303,35

RF S: 697,6302

RF %RSD: 2,464833

Şekil 3. 33 HPLC yönteminde 2,5-12,5 µg/mL konsantrasyon aralığında QY'ye ait kalibrasyon grafiği



Şekil 3. 34 QY'nin 2,5-12,5 µg/mL konsantrasyonları için alınan HPLC kromatogramları

3.2.6 Yöntemin Numunelere Uygulanması

Film kaplı tabletler, kapsül ve şurup olmak üzere 5 farklı numuneyle çalışılmıştır. HPLC'de diode array dedektörü kullanarak Eritrosin, Kinolin Sarısı ve İndigotin için sırasıyla 530, 413 ve 608 nm dalga boyunda oluşan kromatogramların alanları yardımıyla boya miktarları hesaplandı.

- **Alfoxil Forte 250 mg/5 mL Oral Süspansiyon için Kuru Toz:** 33 g toz içeriğine sahip ilaç prospektüste belirtildiği gibi 100 mL milliQ su ile hazırlandı. Şırınga filtresi 4 mL %1 asetik asit çözeltisi ile şartlandırıldı. Ardından numune çözeltisinden 4 mL filtreden geçirildi ve 4 mL suyla filtre yıkandı. 3 mL %1 amonyak/etanol (1:1, v/v) çözeltisiyle şırınga filtresinde kalan boya aşağı süzüntüye alındı. Süzüntü %6 asetik asit çözeltisiyle nötralize edildikten sonra rotary evaporatör yardımıyla çözücüleri uçuruldu. Çözücülerinden arındırılan boya kalıntısı 15 mL metanol/su (1:1, v/v) ile çözülerek HPLC'ye enjekte edildi. İlaç prospektüsünde şişe içerisinde ~0,002 g boya olduğu söylenmektedir, başka bir deyişle 60,606 mg/kg E içermektedir. Elde edilen sonuçlara göre ilaç içerisinde ki boya miktarı HPLC yöntemi ile ~99% verimle saptanmaktadır.

Çizelge 3. 28 Alfoxil şurupta E'nin HPLC yöntemine göre kantitatif analiz sonuçları

	E			
	Alan	*Yükseklik*	*C(µg/mL)*	*Miktar(mg/kg)*
N-1	285771	20528	5,28	60,00
N-2	288537	22160	5,40	61,36
N-3	279152	22078	5,23	59,43
Ort±S(RSD)				60,26±0,99(1,64)

- **TheraFlu Forte Film Tablet:** QY içeren film tabletten 3 tabletin ağırlığı alınarak iyice ezildi ve 20 mL milliQ suda çözdürülerek boya suya aktarıldı. Şırınga filtresi 4 mL %1 asetik asit çözeltisi ile şartlandırıldı. Ardından numune çözeltisi filtreden geçirildi ve 4 mL suyla filtre yıkandı. 3 mL %1 amonyak/etanol (1:1, v/v) çözeltisiyle şırınga filtresinde kalan boya aşağı süzüntüye alındı. Süzüntü %6 asetik asit çözeltisiyle nötralize edildikten sonra rotary evaporatör

yardımıyla çözücüleri uçuruldu. Çözücülerinden arındırılan boya kalıntısı 10 mL metanol/su (1:1, v/v) ile çözülerek HPLC'ye enjekte edildi.

Çizelge 3. 29 TheraFlu Forte tabletlerde QY'nin HPLC yöntemine göre kantitatif analiz sonuçları

	QY				
	Num. Mik.(g)	*Alan*	*Yükseklik*	*C(µg/mL)*	*Miktar(mg/kg)*
N-1	2,6274	316402	58096	11,34	43,16
N-2	2,6185	316409	58382	11,34	43,31
N-3	2,6292	316357	58310	11,35	43,13
Ort±S(RSD)			43,20±0,10(0,22)		

- **Aleve 220mg Film Kaplı Tablet:** IC içeren film kaplı tabletten 3'ünün ağırlığı alınarak distile suya alındı ve boya distile suya aktarıldıktan sonra 10 mL'ye tamamlandı. Şırınga filtresi 4 mL %1 asetik asit çözeltisi ile şartlandırıldı. Ardından numune çözeltisinden 4 mL filtreden geçirildi ve 4 mL suyla filtre yıkandı. 3 mL %1 amonyak/etanol (1:1, v/v) çözeltisiyle şırınga filtresinde kalan boya aşağı süzüntüye alındı. Süzüntü %6 asetik asit çözeltisiyle nötralize edildikten sonra rotary evaporatör yardımıyla çözücüleri uçuruldu. Çözücülerinden arındırılan boya kalıntısı 15 mL metanol/su (1:1, v/v) ile çözülerek HPLC'ye enjekte edildi.

Çizelge 3. 30 Aleve tabletlerde IC'nin HPLC yöntemine göre kantitatif analiz sonuçları

	IC				
	Num. Mik.(g)	*Alan*	*Yükseklik*	*C(µg/mL)*	*Miktar(mg/kg)*
N-1	0,9321	13845	2742	0,49	19,71
N-2	0,9394	14148	2733	0,50	19,96
N-3	0,9221	14027	2742	0,49	19,93
Ort±S(RSD)			19,87±0,14(0,68)		

- **Emedur 200mg Film Kaplı Tablet:** QY ve IC içeren film kaplı tabletten 4'ünün ağırlığı alınarak distile suya alındı ve boya distile suya aktarıldıktan sonra 10 mL'ye tamamlandı. Şırınga filtresi 4 mL %1 asetik asit çözeltisi ile şartlandırıldı. Ardından numune çözeltisinden 5 mL filtreden geçirildi ve 4 mL suyla filtre yıkandı. 3 mL %1 amonyak/etanol (1:1, v/v) çözeltisiyle şırınga filtresinde kalan

boya aşağı süzüntüye alındı. Süzüntü %6 asetik asit çözeltisiyle nötralize edildikten sonra rotary evaporatör yardımıyla çözücüleri uçuruldu. Çözücülerinden arındırılan boya kalıntısı 15 mL metanol/su (1:1, v/v) ile çözülerek HPLC'ye enjekte edildi.

Çizelge 3. 31 Emedur tabletlerde QY ve IC'nin HPLC yöntemine göre kantitatif analiz sonuçları

		QY				**IC**			
	Num. Mik. (g)	Alan	Yükseklik	C (µg/mL)	Miktar (mg/kg)	Alan	Yükseklik	C (µg/mL)	Miktar (mg/kg)
N-1	0,9975	154059	29259	5,54	166,62	15147	2951	0,64	19,25
N-2	0,9932	149150	28271	5,36	161,90	14678	2900	0,62	18,73
N-3	1,0005	155249	29567	5,58	167,32	15325	3013	0,65	19,49
Ort±S(RSD)		165,28±2,95(1,78)				19,16±0,39(2,03)			

- **Sanol Duodenal Kapsül:** Ortalama kapsül ağırlığı 0,7544 g olan ilacın içeriği çıkartılarak kapsül distile suda çözdürüldü ve 10 mL'ye tamamlandı. Şırınga filtresi 4 mL %1 asetik asit çözeltisi ile şartlandırıldı. Ardından numune çözeltisi filtreden geçirildi ve 4 mL suyla filtre yıkandı. 3 mL %1 amonyak/etanol (1:1, v/v) çözeltisiyle şırınga filtresinde kalan boya aşağı süzüntüye alındı. Süzüntü %6 asetik asit çözeltisiyle nötralize edildikten sonra rotary evaporatör yardımıyla çözücüleri uçuruldu. Çözücülerinden arındırılan boya kalıntısı 15 mL metanol/su (1:1, v/v) ile çözülerek HPLC'ye enjekte edildi.

Çizelge 3. 32 Ferro Sanol Duodenal kapsüllerde E, QY ve IC'nin HPLC yöntemine göre kantitatif analiz sonuçları

	E				**QY**				**IC**			
Num. Mik. (g)	Alan	Yüksek-lik	C (µg/mL)	Miktar (mg/kg)	Alan	Yüksek-lik	C (µg/mL)	Miktar (mg/kg)	Alan	Yüksek-lik	C (µg/mL)	Miktar (mg/kg)
0,7635	364581	36245	6,80	133,59	158025	31257	5,57	109,43	7699	1548	0,36	7,07
0,7485	357611	35552	6,67	133,67	155755	30808	5,49	110,02	7466	1501	0,35	7,01
0,7298	347342	34379	6,45	132,57	150715	30455	5,40	110,99	7409	1563	0,34	6,99
Ort±S(RSD)=				133,28±0,61(0,46)	*Ort±S(RSD)*=			110,15±0,79(0,71)	*Ort±S(RSD)*=			7,02±0,04(0,59)

BÖLÜM 4

SONUÇ VE ÖNERİLER

Geliştirilen yöntemde; CTAB ve Triton X-100'ün karışmış miselleri kullanılarak bulutlanma noktası ekstraksiyonuyla zenginleştirilen Eritrosin, İndigotin ve Kinolin sarısı renklendiricilerinin spektrofotometrik olarak kantitatif tayini gerçekleştirildi. Bulutlanma noktası ekstraksiyonu yönteminde renklendiricilerin kantitatif ekstraksiyonu üzerine; sürfaktanların (CTAB, Triton X-100) konsantrasyonları, tuz konsantrasyonu, pH, sıcaklık ve zaman gibi farklı parametrelerin etkisi araştırıldı ve optimum koşullar belirlendi. Boyaların ekstrakte edildiği sürfaktanca zengin fazın asetonla seyreltilmesinin ardından UV-Vis Spektrofotometresi yardımıyla absorpsiyon spektrumları alındı. Çalışılan renklendiricilerin doğrusal kalibrasyon eğrileri 1-6 µg/mL E, 1-6 µg/mL QY ve 0,3-1,8 µg/mL IC konsantrasyon aralığında sırasıyla 497, 408 ve 637 nm'de birinci türev absorbans değerleri okunarak çizildi. Geliştirilen yöntem; seçicilik, doğrusallık, duyarlık, kesinlik, belirleme ve ölçme limitleri (LOD ve LOQ) dikkate alınarak doğrulandı. Yöntemin doğruluğu hakkında bilgi verebilmek amacıyla; renklendirici karışımları hazırlanarak %geri kazanım değerleri E, QY ve IC için sırasıyla 95,36±3,28, 96,32±2,24 ve 96,32±7,74 arasında çeşitlilik gösterdi. Yöntemin kesinliğini belirlemek amacıyla; her bir renklendirici için gün içi ve gün aşırı tekrarlanabilirlik çalışmaları yapıldı. Ayrıca renklendiricilerin ayrı ayrı LOD ve LOQ değerleri; sırasıyla E için 0,031 µg/mL ve 0,103 µg/mL, QY için 0,057 µg/mL ve 0,190 µg/mL, IC için 0,048 µg/mL ve 0,160 µg/mL arasında çeşitlilik gösterdi.

Spektrofotometrik yöntemle elde edilen sonuçların karşılaştırılması amacıyla literatürde renklendiriciler ile ilgili HPLC yöntemlerinden yararlanılarak yeni HPLC yöntemi geliştirildi. Geliştirilen HPLC yönteminde sabit faz olarak C_{18} ve mobil fazlar

olarak ise asetonitril-metanol (1:1, v/v) karışımı ve pH 7'de ki 0,1 M amonyum asetat çözeltisi kullanıldı. 30 dk içerisinde gradient elüsyonla en uygun hale getirilerek karışımların başarılı ayrımı elde edildi. 350-800 nm arasında renklendiricileri izlemek için diode-array dedektörü kullanıldı.

Farmasötik preparatlarda bulunan E, QY ve IC renklendiricilerinin iki yöntem sonucunda elde edilen sonuçlar Çizelge 4. 1'de özetlenmiştir.

Çizelge 4. 1 Farmasötik preparatlarda bulunan renklendiricilerin CPE sonrası uygulanan türev spektrofotometrik ve HPLC yöntemleri ile kantitatif tayin sonuçları

NUMUNE SONUÇLARI		***CPE (mg/kg)***				***HPLC (mg/kg)***			
		N-1	***N-2***	***N-3***	***Ort±S (RSD)***	***N-1***	***N-2***	***N-3***	***Ort±S (RSD)***
Alfoxil	***E***	54,24	53,33	55,45	54,34±1,06(1,96)	60,00	61,36	59,43	60,26±0,99(1,64)
TheraFlu	***QY***	27,22	27,34	27,05	27,20±0,14(0,53)	43,16	43,31	43,13	43,20±0,10(0,22)
Aleve	***IC***	15,34	15,89	15,03	15,42±0,43(2,82)	19,71	19,96	19,93	19,87±0,14(0,68)
Emedur	***QY***	149,77	148,05	151,75	149,85±1,85(1,23)	166,62	161,90	167,32	165,28±2,95(1,78)
	IC	15,26	14,72	15,33	15,1±0,33(2,21)	19,25	18,73	19,49	19,16±0,39(2,03)
Ferro Sanol Duodenal	***E***	140,09	140,53	140,51	140,37±0,24(0,17)	133,59	133,67	132,57	133,28±0,61(0,46)
	QY	118,29	117,06	120,04	118,46±1,49(1,26)	109,43	110,02	110,99	110,15±0,79(0,71)
	IC	10,27	10,48	10,26	10,34±0,12(1,20)	7,07	7,01	6,99	7,02±0,04(0,59)

Yöntemlerden elde edilen bulgular doğruluk ve kesinlik yönünden t ve F testleri yardımıyla %95 güvenirlik düzeyinde istatiksel olarak karşılaştırıldı ve uygulanan yöntemler değerlendirildi. F değerleri ilgili güven düzeyi ve üç deneme için verilen tablo değerlerinden küçük bulunarak ilgili güven düzeyi için verilen tablolardaki sınır değerleri içerisinde olduğu görülmüştür. t değerleri ilgili güven düzeyi ve üç deneme için verilen tablo değerlerinden büyük bulunarak ilgili güven düzeyi için verilen tablolardaki sınır değerlerini aşmış olduğu görülmüştür. t-F testleriyle ilgili sonuçlar Çizelge 4. 2'de özetlenmiştir.

Çizelge 4. 2 Farmasötik preparatlarda bulunan renklendiricilerin CPE sonrası uygulanan türev spektrofotometrik ve HPLC yöntemleri ile kantitatif tayinlerine uygulanan t ve F testi değerleri

	Alfoxil	**Thera Flu**	**Aleve**	**Emedur**		**Ferro Sanol Duedonal**		
	E	*QY*	*IC*	*QY*	*IC*	*E*	*QY*	*IC*
t	8,62	190,14	17,68	14,43	21,03	49,49	9,62	46,19
F	1,15	2,28	10,18	2,53	1,35	6,09	3,61	8,90
$n_1=n_2=3$			$P= 0,05$		$t_{tablo}= 4,3$		$F_{tablo}=19$	

Çizelge 4. 1'de bulunan sonuçlar ışığında renklendiricilerin ADI miktarları ile ilgili bir çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada, farmasötik preparatların prospektüslerinde belirtilen maksimum kullanım miktarları göz önüne alınarak ve yetişkin bir insanın minimum 50 kg olabileceği düşünülerek; kullanılan E, QY ve IC renklendiricilerinin ADI değerleri içerisinde olup olmadığı incelendi. Sonuç olarak; Çizelge 4. 3'te de gösterildiği gibi farmasötik preparatlarda kullanılan renklendiriciler, ADI değerleri içerisindedir.

Çizelge 4. 3 Farmasötik preparatlarda bulunan renklendiricilerin CPE sonrası uygulanan türev spektrofotometrik ve HPLC yöntemleri ile kantitatif tayinlerine uygulanan ADI miktarı değerleri

ADI MİKTARLARI		***ADI Miktarı (mg/kg)***	***ADI Miktarı mg/50kg)***	***Max. Kullanım***	***Ortalama tek doz miktarı***	***CPE (mg)***	***HPLC (mg)***
Alfoxil	***E***	0,1	50	8 saatte 1 ölçek	5 mL	8,15	9,06
TheraFlu	***QY***	10	500	6 tablet	0,8725 g	0,14	0,23
Aleve	***IC***	5	250	3 tablet	0,3125 g	0,01	0,02
Emedur	***QY***	10	500	5 tablet	0,2498 g	0,19	0,21
	IC	5	250			0,02	0,02
Ferro Sanol Duodenal	***E***	0,1	50	3 kapsül	0,7544 g	0,312	0,30
	QY	10	500			0,27	0,25
	IC	5	250			0,02	0,02

KAYNAKLAR

[1] Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, (2013). "Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği", Resmi Gazete, Sayı: 28693.

[2] Türker, S., (2011). "Gıda katkı maddelerinin gıdalardaki kullanım miktarları", 1. Ulusal Helal ve Sağlıklı Gıda Kongresi, Ankara.

[3] Vieira, E. R., (1996). "Elementary Food Science", Fourth Ed., Chapman - Hall, New York, 204–205.

[4] Sağlık Bakanlığı, (2005). "Beşeri ve Veteriner Tıbbi Ürünlerde Kullanılan Renklendiricilerle İlgili Tebliğ", Resmi Gazete, Sayı: 25704.

[5] Saldamlı, İ., (1998). ‘‘Gıda Kimyası’’, Hacettepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği, Ankara, 489-495.

[6] Özcan, M., ve Akgül, A., (1995). ‘‘Gıdalar için doğal renk maddeleri’’, 20(4): 365-369.

[7] Keskin, H., (1999). ‘‘Gıda Kimyası’’, İstanbul Üniversitesi Yayınları, Kimya Fakültesi, İstanbul, 1525.

[8] Lin, A., Jian D., ve Liang Z., (2010). ‘‘Simultaneous spectrophotometric determination of trace amount of Malachite Green and Crystal Violet in water after cloud point extraction using partial least squares regression’’, Journal of Hazardous Materials, 175: 883-888.

[9] Pourreza, N., (2011). ‘‘Simultaneous cloud point extraction and spectrophotometric determination of carmoisine and brilliant blue FCF in food samples’’, Talanta, 84(1): 240-243.

[10] Huang, H. Y., Shih, Y. C., ve Chen, Y. C., (2002). ‘‘Determining eight colorants in milk beverages by Capillary Electrophoresis’’, Journal of Chromatography, 959 (1-2):317-325.

[11] Ekşi, A., (1996). "Ankara piyasasından sağlanan pasta süsleri ve bazı şekerlemelerde sentetik boya miktarlarının araştırılması", Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

[12] Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, (2002). "Türk Gıda Kodeksi Gıda Maddelerinde Kullanılan Renklendiricilerin Saflık Kriterleri Tebliği", 24722.

[13] Socaciu, C., (2008). "Analysis of synthetic food colorants", Taylor & Francis Group, 20:533-551.

[14] Pourreza, N., Rastegarzadeh, S., ve Larki, A., (2011)."Determination of Allura Red in food samples after cloud point extraction using mixed micelles", Food Chemistry, 126:1465-1469.

[15] Ni,Y. N., ve Gong, X. F., (1997). "Simultaneous spectrophotometric determination of mixtures of food colorants". Analytica Chimica Acta, 354:163-171.

[16] Altınöz, S., ve Toptan, S.; (2003). "Simultaneous determination of Indigotin and Ponceau-4R in food samples by using Vierordt's method, ratio spectra first order derivative and derivative UV spectrophotometry", Journal of Food Composition and Analysis, 16:517-530.

[17] Nevado, J. J. B., Flores, J. R., Cabonnillas, C. G., Llerena, M. J. V., ve Salcedo, A. C., (1998). "Resolution of ternary mixtures of Tartrazine, Sunset yellow and Ponceau 4R by derivative spectrophotometric ratio spectrum-zero crossing method in commercial foods", Talanta 46:933-942.

[18] Jonnalagadda, P. R., Rao, P., Bhat, R. V., ve Nadidu, A. N., (2004). " Type, extent and use of colours in ready-to-eat (RTE) foods prepared in the non-industrial sector – a case study from Hyderabad, India", International Journal of Food Science and Technology, 39(2):125-131.

[19] Altıniğne, N., (1999). "Bazı şekerlemeler ve yapay toz içeceklerdeki diazo boyar madde olan Sunset Yellow FCF ile Tartrazin miktar tayinlerinin voltametrik ve spektrofotometrik metod karşılaştırması", Gıda, 24(2),:139-143.

[20] Özdemir, Y., ve Akkan, A., (1999). "Determination of Patent Blue V and Carmoisin in gelatie desserts by derivative spectrophotometry", Turk J Chem, 23:221-229.

[21] Lau, O., Poon, M. M. K., Siu-Cheung, M., ve Wong, F. M. Y., (1996). "Spectrophotometric determination of single synthetic food colour in soft drinks, using ion-pair formation and extraction", International Journal of Food Science and Technology, 30(6):793-798.

[22] Pourreza, N., ve Zareian, M., (2009). "Determination of Orange 2 in food samples after cloud point extraction using mixed micelles", Journal of Hazardous Materials 165:1124-1127.

[23] Pourreza, N., ve Elhami, S., (2009). "Cloud point extraction and spectrophotometric determination of Amaranth in food samples using nonionic surfactant Triton X-100 and Tetrabutylammonium Hydrojen Sulfate", Journal of the Iranian Chemical Society, 4(6):784-788.

[24] El-Shahavi, M. S., Hamza, A., Al-Sibaai, A. A., Bashammakh, A. S., ve Al-Saidi, H. M., (2013). "A new method for analysis of Sunset Yellow in food samples based on cloud point extraction prior to spectrophotometric determination", Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 19:529-535.

[25] Purkait, M. K., Banerjee, S., Mewara, S., DasGupta, S., ve De, S., (2005), "Cloud point extraction of toxic eosin dye using Triton X-100 as nonionic surfactant", Water Research, 39:3885-3890.

[26] Abedi, S., ve Nekouei, F., (2011). "Removal of Direct Yellow 12 from water samples by cloud point extraction using Triton X-100 as nonionic surfactant", E- Journal of Chemistry, 8(4):1588-1595

[27] Mousavi, R., ve Nekouei, F., (2011). "Cloud point extraction of Toxic Reactive Black 5 Dye from water samples using Triton X-100 as nonionic surfactant", E-Journal of Chemistry, 8(4):1606-1613.

[28] Tavallali, H., ve Ostovar, M., (2009)."Trace spectrophotometric determination of Brillant Green in fish farming water samples", International Journal of ChemTech Research, 1:199-203.

[29] Purkait, M. K., DasGupta, S., ve De, S., (2006). "Determination of thermodynamic parameters for the cloud point extraction of different dyes using TX-100 and TX-114", Journal of Hazardous Materials, 244:130-138.

[30] Alpdoğan, G., ve Üstün Özgür, M., (2005). ‘‘Determination of ternary mixtures of food dyes by zero-crossing derivative spectrophotometry’’, Chemia Analityczna, 50:593-603.

[31] Ni, Y., Wang, Y., ve Kokot, S., (2009). ‘‘Simultaneous kinetic spectrophotometric analysis of five synthetic food colorants with the aid of chemometrics’’, Talanta, 78:432-441.

[32] Yentür, G., Ekşi, A., ve Bayhan, A., (1996). ‘‘Ankara piyasasında aağlanan pasta süsleri ve bazı şekerlerde sentetik boya miktarlarının araştırılması’’, Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg., 4(3):479-484.

[33] Zalacain, A., Ordoudi, S., Blazoquez, I., Dıaz-Plaza, E. M., Carmona, M., Tsimidou, M. Z., ve Alonso, G. L., (2005). ‘‘Screening method for the detection of artificial colours in Saffron using derivative UV-Vıs spectrometry after precipitation of Crocetin’’ Food Additives and Contaminants, 22(7):607-615.

[34] Aktaş, H. A., Dinç, E., Pekcan, G., Üstündağ, Ö., ve Taş, A., (2007).’’Wavelet transform for the simultaneous prediction of the colorants in food product’’, Mathematical Methods in Engineering, 257-264.

[35] Nantachit, K., Putiyanan, S., ve Phooviang, P., (2008). ‘‘Identification and determination of synthetic dyes in grape juice in closed package’’ CMU. J. Nat. Sci., 7(2):231.

[36] Oveisi, M. R., Hajimahmoodi, M., ve Davamı, F., (2003). ‘‘Simultaneous spectrophotometric determination of mixtures of food colorants’’, DARU 11:1.

[37] Coelho, T. M., Vidotti, E. C., Rollenberg, M. C., Medina, A. N., Baesco, M. L., Cella, N., ve Bento, A. C., (2010). ‘‘Photoacoustic spectroscopy as a tool for determination of food dyes: comparison with first derivative spectrophotomery’’, Talanta, 81:202-207.

[38] Khanavi, M., Hajmahmaadi, M., Ranjban, A. M., Oveisi, M. R., Ardekoni, M. R. S., ve Magaddam, G., (2012). "Development of a green chromatographic method for simultaneous determination of food colorants", Food Anal. Methods, 5:408-415

[39] Yoshioka, N., ve Ichihoshi, K., (2008). " Determination of 40 synthetic food colors in drinks and candies by high-performance liquid chromatography using a short column with photodiode array detection", Talanta 74:1408-1413.

[40] Minioti, K. S., Sakelloriou, C. F., ve Thomoidis, N. S., (2007). " Determination of 13 synthetic food colorants in water-soluble foods by reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled with diode-array detector", Analytica Chimica Acta, 583:103-110.

[41] Gennaro, M. C., Gioannini, E., Angelina, S., Aigotti, R., ve Giacosa, D., (1997). "Identification and determination of red dyes in confectionery by ion-interaction high-performance liquid chromatography", Journal of Chromatography A, 767:87-92.

[42] Vidotti, E. C., Costa W. F., ve Oliveira C. C., (2006). "Development of a green chromatographic method for determination of colorants in food samples", Talanta 68:516-521.

[43] Garcia-Falcon, M. S., ve Simal-Gandara, J., (2005). " Determination of food dyes in soft drinks containing natural pigments by liquid chromatography with minimal clean-up ", Food Control, 16:293-297.

[44] Kucharska, M., ve Grabka, J., (2010). ‘‘ A review of chromotographic methods for determination of synthetic food dyes’’, Talanta, 80:1045-1051.

[45] Zatar, N. A., (2007). ‘‘Simultaneous determination of seven synthetic water-soluable food colorants by ion-pair Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography’’ Journal of Food Technology 5(3):220-224.

[46] Vachırapatama, N., Mahajaroensırı, J., ve Vısessanguan, W., (2008). ‘‘Identification and determination of seven synthetic dyes in foodsuffs and soft drinks on monolithic C18 column by High Performance Liquid Chromatography’’ Journal of food and drug analysis, 16(5):77-82.

[47] Kiseleva, M. A., Pimenova, V. V., ve Eller, K. I., (2004). ‘‘Optimization of conditions for the HPLC determination of synthetic dye in food’’ J. Anal. Chem., 58:685-690.

[48] Chanlon, S., Joly-Pottuz, L., Chatelut, M., Vittori, O., ve Cretier, J. L., (2005). "Determination of Carmoisine, Allura red and Ponceau 4R in sweets and soft drinks by Differential Pulse Polarography", Journal of Food Composition and Analysis, 18:503-515.

[49] Ma, M., Luo, X., Chen, B., Su, S., ve Yao, S., (2006). ‘‘Simultaneous determination of water-soluble and fat-soluble synthetic colorants in foodstuff by high-performance liquid choromotography-diode array detection-electrospray mass spectrometry’’ Choromatogr. A, 1103(1):170-176.

[50] Frazier, R., Inns, E., Dossi, N., Ames, J., ve Nursten, H., (2000). ‘‘Development of a Capillary Electrophoresis method for the simultaneous analysis of artificial sweenteners, preservatives and colours In soft drinks’’, Journal of Chromatography A, 876:213-220.

[51] Doka, O., Bicanic, D., Ajtony, Z., ve Koehorst, R., (2005). ‘‘Determination of Sunset Yellow in multi-vitamin tablets by Photoacoustic Spectroscopy and a comparison with alternative methods’’ Food Additives and Contaminants’’ 22(6):503-507.

[52] Wade L. G. Jr., (2002). "Organic Chemistry", *Whitman College,* New Jersey, 1168-1169.

[53] Willie L. H., ve Pramauro E.,(1993). "A Critical Review of Surfactant – Mediated Phase Separations (Cloud-Point Extractions) : Theory and Applications", *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 24(2):133 -177.

[54] Peter C. K., ve Neil E. S.,(2004). "Organic Chemistry " *W.K.Freeman And Company*, New York, 842-843

[55] Bezerra, M. A., Arruda, M. A. Z., ve Ferreira, S. L. C., (2005). "Cloud point extraction as a procedure of separation ans pre-concentration for metal determination using spectroanalytical techniques", Applied Spectroscopy, 40:269-299

[56] Efeçınar, M., (2009). "Atomik Absorpsiyon Spektrometresi ile metal iyonlarının tayini için bulutlanma noktası ekstraksiyonu", Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.

[57] Evangelos, K. P., Dimosthenis L. G., ve Miltiades I. K., (2005). "Micelle-mediated seperation and cloud-point extraction", Trens in Analytical Chemistry, 24:426-436.

[58] Atılgan, S.,(2011). "Atomik absorpsiyon spektrometresinde bazı eser elementlerin tayin öncesi bulutlanma noktası ekstraksiyonu yöntemi ile zenginleştirilmesi." Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul.

[59] Çıtak, D.,(2010). "Katı faz ekstraksiyonu, birlikte çöktürme ve bulutlanma noktası ekstraksiyonu ile bazı metallerin zenginleştirilmesi ve türlemesi", Doktora Tezi, Gazi Osman Paşa Üniversitesi, Tokat.

[60] Constantine D. S.,(2002). "Micelle–mediated extraction as a tool for seperation and preconcentration in metal analysis ", Trends in Analytical Chemistry, 21:343-355.

[61] Ferrera, Z. S., Sanz, C. P., Santana, C. M., ve Rodriguez, J. J. S.,(2004). "The use of micellar systems in the extraction and pre-concentration of organic pollutants in environmental samples", Trends in Analytical Chemistry, 23:469-479.

[62] Ohashi, A., Hashimoto, T., Imura, H., ve Ohashi, K., (2007). "Cloud point extraction equilibrium of lanthanum(III), eurpium(III) and lutetium(III) using di(2 ethylhexyl)phosphoric acid and Triton X-100", Talanta, 73:893-898.

[63] Silva, M. A. M., Frescura, V. L. A., Aguilera, F. J. N., ve Curtius, A. J., (1998). "Determination of Ag and Au in geological samples by flame atomic absorption spectrometry after cloud point extraction", Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 13:1369-1373.

[64] Farajzadeh, M. A., ve Fallahi, M. R., (2006). "Simultaneous cloud-point extraction of nine cations from water samples and their determination by flame atomic absorption spectrometry", Analytical Sciences, 22:635-639.

[65] Sun, Z., Liang, P., Ding, Q., ve Cao, J., (2006). "Cloud point extraction preconcentration of Manganese(II) from natural water samples using 1-Phenyl-3-methyl-4-benzoyl-5 pyrazolone and Triton X-100 and determination by Flame Atomic Absorption Spectrometry", Analytical Sciences, 22:911-913.

[66] Stalikas, C. D., (2002). "Micelle-mediated extraction as a tool for separation and preconcentration in metal analysis", Trends in Analytical Chemistry, 21(1):343-350.

[67] Yıldız, D., (2011). "Bazı metal iyonlarının bulutlanma noktası ekstraksiyonu ile zenginleştirerek AAS ile tayini ve analiz koşullarının deneysel tasarım ile optimizasyonu", Doktora Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Aydın.

[68] Ulusoy H. İ.,(2012). "Eser düzeydeki inorganik arsenik türlerinin tayini için bulutlanma noktası ekstraksiyonu/ AAS yöntemi geliştirilmesi", Doktora tezi, Cumhuriyet Üniversitesi, Sivas.

[69] Ege S. N.,(2003). "Organic Chemistry Structure and reactıvıty", Hounghton Mifflin Company Boston, New York, 640-641.

[70] Tanga, A., Ding, G., ve Yan, X, (2005). "Cloud point extraction for the determination of As(III) in water samples by electrothermal atomic absorption spectrometry", Talanta, 67(5):942-946.

[71] Greenfield A. B., (2005). "A Perfect Red: Empire, Espionage, and the Quest for the Color of Desire", New York: Harper Collins Press, 53236:26.

[72] Delgado-Vargas, F., ve Paredes-Lopez, O., (2003). "Natural Colorants for Food and Nutraceutical Uses", CRC Pres, USA, 327.

[73] Lucas, C. D., Hallagan, J. B., ve Taylor, S. L., (2001). "The role of natural color additives in food allergy", Advances in Food and Nutrition Research, 43:195-215.

[74] Çelebi, B., (2010). "Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi için immobilize enzim reaktörlerinin geliştirilmesi ve kinetik karakterizasyonu", Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

[75] Skoog-Holler–Nieman. (1998). "Principles of Instrumental Analysis", 5th Ed., Brooks/Cole Thompson Learning, Amerika Birleşik Devletleri.

[76] Dibek, H., (2014). "Analitik Laboratuvarlarda HPLC Kolonu Seçimi", TurkChem.

[77] Yang, Y., ve Hodges, C., (2009). "Beginners Guide to UPLC – Ultra Performance Liquid Chromatography", Waters Corporation, USA.

[78] Swartz, M., E., (2005). "Ultra Performance LC Separation Science Redefined, Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC): An Introduction", Waters Corporation, USA.

[79] Yamashita, T., Dohta, Y., Nakamura, T., ve Fukami, T,. (2008). ‘‘High-speed solubility assay using ultra-performance liquid chromatography/Mass spectrometry in drug discovery’’, Journal of Chromatography A, 1182: 72-76

[80] Chen, S., ve Kord, A., (2009). ‘‘Theoretical and experimental comparison of mobile phase consumption between ultra high performance liquid chhromatography and high performance liquid chromatography’’, Journal of Chromatograhy A, 1216:6204-6209.

[81] Ertaş, Ö., ve Kayalı, A., (2005). ‘‘Analitik yöntem geçerliliğine genel bir bakış’’, Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi, 34 (1): 41-57.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Merve DELMİDAN

Doğum Tarihi ve Yeri : 07/09/1989 İSTANBUL

Yabancı Dili : İngilizce

E-posta : mervedelmidan@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	**Alan**	**Okul/Üniversite**	**Mezuniyet Yılı**
Y. Lisans	Anorganik Kimya	Yıldız Teknik Üniversitesi	2015
Lisans	Kimya	Yıldız Teknik Üniversitesi	2012
Lise	Fen	Beyoğlu Fındıklı Lisesi	2007

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	**Firma/Kurum**	**Görevi**
12.2014 08.2015	May Group	AR-GE Uzmanı
09.2012 11.2014	Yıldız Teknik Üniversitesi	Asistan Öğrenci

YAYINLARI

Bildiri

1. Delmidan M., Turak F., Özgür M. (2013). “Cloud Point Extraction and Spectrophotometric Determination of Synthetic Colors in Tablets Using Nonionic Surfactants”, 6th Black Sea Basin Conference On Analytical Chemistry, Trabzon.

2. Delmidan M., Turak F., Özgür M. (2013). "Simultaneous Analysis of Binary Mixtures of Allura Red (E 129) and Carmin (E 120) by Using First Derivative Spectrophotometry", 6th Black Sea Basin Conference On Analytical Chemistry, Trabzon.

Proje

1. 2013-01-02-YL03, “Farmasötik Preparatlarda Zenginleştirme Yöntemi Uygulayarak Gıda Boyalarının Spektrofotometrik ve Hplc Yöntemleri ile Analizleri” (BAP), Yüksek Lisans Öğrencisi Araştırmacı.