T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GAZLI İÇECEKLERDEKİ GIDA KATKI MADDELERİNİN UHPLC İLE EŞ ZAMANLI TAYİNİ İÇİN METOT GELİŞTİRİLMESİ VE VALİDASYON ÇALIŞMALARI

MUHAMMED ZAHİD KASAPOĞLU

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

GAZLI İÇECEKLERDEKİ GIDA KATKI MADDELERİNİN UHPLC İLE EŞ ZAMANLI TAYİNİ İÇİN METOT GELİŞTİRİLMESİ VE VALİDASYON ÇALIŞMALARI

MUHAMMED ZAHİD KASAPOĞLU

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

GAZLI İÇECEKLERDEKİ GIDA KATKI MADDELERİNİN UHPLC İLE EŞ ZAMANLI TAYİNİ İÇİN METOT GELİŞTİRİLMESİ VE VALİDASYON ÇALIŞMALARI

Muhammed Zahid KASAPOĞLU tarafından hazırlanan tez çalışması 16.06.2015 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Mahmure ÜSTÜN ÖZGÜR

Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Mahmure ÜSTÜN ÖZGÜR

Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Doç. Dr. Fatma TURAK

Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Doç. Dr. Ayşe ERÇAĞ

İstanbul Üniversitesi _____

Bu çalışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nün 2012-01-02-KAP07 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana her konuda yardımcı olan, bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren ve birlikte çalışma imkanı sunan değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Mahmure ÜSTÜN ÖZGÜR'e,

Tez konusu deneysel çalışmalarımın yürütülmesi esnasında bana Polifarma İlaç Araştırma ve Geliştirme Laboratuvarında çalışma imkanı sunan, bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen Polifarma İlaç Genel Müdürü Kim. Yük. Müh. Vildan KUMRULU'ya,

Çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşım Hürmüs GÜRSU'ya desteklerinden ötürü teşekkür ederim…

Haziran, 2015

Muhammed Zahid KASAPOĞLU

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGE LİSTESİ viii
KISALTMA LİSTESİ ix
ŞEKİL LİSTESİ x
ÇİZELGE LİSTESİ xii
ÖZET xiv
ABSTRACT xvi
BÖLÜM 1
GİRİŞ 1
1.1 Literatür Özeti 1
1.2 Tezin Amacı 2
1.3 Hipotez 2
BÖLÜM 2
GENEL BİLGİLER 4
2.1 Genel Bölüm 4
2.2 Gıda Katkı Maddeleri 4
2.2.1 Gıda Katkı Maddelerinin Kullanım Amaçları 5
2.2.2 Gıda Katkı Maddeleri E Kodları 6
2.3 Tatlandırıcılar 7
2.3.1 Tatlandırıcılar ile ilgili gelişmeler 10
2.3.2 Tatlandırıcı Çeşitleri ve Kullanım Alanları 11
2.3.2.1 Aspartam 11
2.3.2.2 Asesulfam K 14
2.3.2.3 Kafein 16
2.3.2.4 Sodyum Benzoat 17
2.4 Literatürde Yapılan Çalışmalar 18
2.5 Kromatografik Yöntemler 25
2.5.1 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi 26
2.5.1.1 HPLC Sistemleri 26
2.5.1.2 HPLC Kullanım Alanları 28
2.5.2 UHPLC (Ultra Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi) 28
2.5.3 UHPLC ve HPLC Sistemlerinin Karşılaştırılması 30

2.5.3.1 Van Deemter Eğrileri 38
2.5.3.2 Performansın Arttırılması 43
2.6 Validasyon (Yöntem Doğrulaması) 49
2.6.1 Özgünlük 50
2.6.2 Doğrusallık 50
2.6.3 Konsantrasyon Aralığı 50
2.6.4 Doğruluk 51
2.6.4.1 Standart ile karşılaştırma 51
2.6.4.2 Geri kazanım 51
2.6.4.3 Standart katma yöntemi 51
2.6.5 Kesinlik 52
2.6.6 Dedeksiyon Limiti 52
2.6.7 Kantitatif Tayin Limiti 52
2.6.8 Standart Katma Yöntemi (SK) 54

BÖLÜM 3

DENEYSEL BÖLÜM 56

3.1 Araştırma Araçları ve Kimyasalları 56
3.1.1 Reaktifler ve Standartlar 56
3.1.2 Kullanılan Cihaz ve Ekipmanlar 57
3.2 Yapılan Deneysel Çalışmalar 58
3.2.1 Piyasada Bulunan Ürünlerde Tayin Edilecek Bileşenler ve Miktarları 58
3.2.2 Analitik Yöntem Validasyonu 59
3.2.2.1 Miktar Tayini Metodu 59
3.2.3 Miktar Tayini Metot Validasyonu 61
3.2.3.1 Miktar Tayini Metot Validasyon Parametreleri 62
3.2.4 Yöntemin Farklı Marka Gazlı İçeceklere Uygulanması 92

BÖLÜM 4

SONUÇ VE ÖNERİLER 94

KAYNAKLAR 104

EK-A

SPESİFİKLİK KROMATOGRAMLARI 109

EK-B

DOĞRULUK KROMATOGRAMLARI 115

EK-C

KESİNLİK KROMATOGRAMLARI 117

EK-D

DOĞRUSALLIK VE LİNEERLİK KROMATOGRAMLARI 119

EK-E

GÜVENİLİRLİLİK KROMATOGRAMLARI 122

EK-F

KARŞILAŞTIRMA KROMATOGRAMLARI 129
ÖZGEÇMİŞ 131

SİMGE LİSTESİ

α	Seçicilik faktörü
dp	Parçacık boyutu
Fopt	Optimum akış hızı
H	Pik yüksekliği
k	Alıkonma faktörü
L	Kolon uzunluğu
N	Teorik plaka sayısı
P	Basınç
pH	Asitlik veya bazlık derecesi
RS	Ayrılma
T	Analiz süresi
to	İlk pikin alıkonma zamanı
tr	Ana pikin alıkonma zamanı
W	Pik genişliği
ΔPopt	Optimum lineer akış hızındaki basınç

KISALTMA LİSTESİ

HETP	Teorik Plakaya Eş Yükseklik (High Equivalent to a Theoretical Plate)
HPLC	Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography)
UPLC	Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi (Ultra Performance Liquid Chromatography)
UFLC	Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi (Ultra Fast Liquid Chromatography)

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2. 1	Aspartamın molekül formülü	11
Şekil 2. 2	Aspartamın sudaki çözünürlüğü-sıcaklık ilişkisi	12
Şekil 2. 3	Asesulfam K'nın kimyasal yapısı molekül formülü	15
Şekil 2. 4	Kafeinın kimyasal yapısı	17
Şekil 2. 5	Sodyum benzoatın kimyasal yapısı	17
Şekil 2. 6	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi sisteminin gösterimi	27
Şekil 2. 7	HPLC / UPLC sistemlerinin genel tasarımı	32
Şekil 2. 8	Analitin kolon içinde bantlara ayrılması	32
Şekil 2. 9	Analit bandındaki analit moleküllerinin konsantrasyon profili[58]	33
Şekil 2. 10	HPLC / UPLC sistemlerinin pik şekline etkisi	33
Şekil 2. 11	Teorik plakanın (N) teorik gösterimi	34
Şekil 2. 12	Kolon parçacık boyutu ve uzunluğunun bant genişliğine etkisi	34
Şekil 2. 13	Alıkonma, seçicilik ve plaka sayısı değişimlerinin ayrışmaya etkileri	37
Şekil 2. 14	Aynı özelliklerde farklı parçacık boyutuna sahip analitik kolonların sisteminde elde edilen kromatogramlarının karşılaştırılması	38
Şekil 2. 15	Eddy Difüzyon	39
Şekil 2. 16	Longitudinal Difüzyon	40
Şekil 2. 17	Bant genişliğinde, kütle transfer ve parçacık boyutu ilişkisi	41
Şekil 2. 18	Analit molekülünün kolon içinde ilerleme tipleri	41
Şekil 2. 19	Transfer terimlerinin van Deemter eşitliğindeki yerleri ve van Deemter eğrisi grafiği	42
Şekil 2. 20	Parçacık boyutu etkilerinin van Deemter eğrileri ile gösterimi	42
Şekil 2. 21	Parçacık boyutu ve optimum akış hızı değişiminin HPLC ve UPLC sistemlerinde basınç değerine etkisi	44
Şekil 2. 22	Parçacık boyutu, kolon uzunluğu ve akış hızının kolon basıncına ve analiz süresine etkisi	44
Şekil 2. 23	Kolon sıcaklığının etkinliğe etkisi [58]	45
Şekil 2. 24	L/dp oranı sabit tutularak elde edilen verim [58]	46
Şekil 2. 25	UPLC ve HPLC sistemlerinin karşılaştırılması	47
Şekil 2. 26	UPLC sisteminin ve HPLC kolonu ile kullanımı ile elde edilen kromatogramlar	48
Şekil 2. 27	Bir kalibrasyon eğrisi grafiği; cihaz responsu-kalibrasyon değişimi	51
Şekil 2. 28	Standart ekleme eğrisi	55
Şekil 3. 1	Asesülfam K için doğrusallık ve lineerlik grafiği	81

Şekil 3. 2	Aspartam için doğrusallık ve lineerlik grafiği	82
Şekil 3. 3	Kafein için doğrusallık ve lineerlik grafiği	83
Şekil 3. 4	Sodyum Benzoat için doğrusallık ve lineerlik grafiği	84
Şekil 4. 1	Sudaki impürite pikleri	95
Şekil 4. 2	Asetonitril ve metanolün absorbansa etkisi	95
Şekil 4. 3	Mobil faz oranının kolon basıncına etkisi	96
Şekil 4. 4	Mobil faz oranının kafeinin alıkonma zamanına etkisi	96
Şekil 4. 5	olon sıcaklılığının seçiciliğe etkisi	97
Şekil 4. 6	Kolon sıcaklığının pik şekline etkisi	98
Şekil EK- A. 1	Çözücü (hareketli faz) kromatogramı	109
Şekil EK- A. 2	Asesülfam K için plasebo çözeltisi kromatogramı	110
Şekil EK- A. 3	Aspartam için plasebo çözeltisi kromatogramı	110
Şekil EK- A. 5	Sodyum benzoat için plasebo çözeltisi kromatogramı	111
Şekil EK- A. 6	Asesülfam K standart çözeltisi kromotogramı	112
Şekil EK- A. 7	Kafein standart çözeltisi kromotogramı	112
Şekil EK- A. 8	Aspartam standart çözeltisi kromotogramı	113
Şekil EK- A. 9	Sodyum benzoat standart çözeltisi kromotogramı	113
Şekil EK- A. 10	Miktar tayinindeki numune çözelti kromotogramı	114
Şekil EK- A. 11	Miktar tayinindeki standart çözelti kromotogramı	114
Şekil EK- B. 1	% 80'lik numune çözeltisi kromatogramı	115
Şekil EK- B. 2	%100'lük numune çözeltisi kromatogramı	116
Şekil EK- B. 3	%120'lik numune çözeltisi kromatogramı	116
Şekil EK- C. 1	Miktar tayinindeki cihaz kesinliği kromatogramı	117
Şekil EK- C. 2	Miktar tayinindeki metot kesinliği kromatogramı	118
Şekil EK- C. 3	Miktar tayinindeki ara kesinlik kromatogramı	118
Şekil EK- D. 1	Miktar tayinindeki doğrusallık kromatogramı (%60'lık çözelti)	119
Şekil EK- D. 2	Miktar tayinindeki doğrusallık kromatogramı (%80'lık çözelti)	120
Şekil EK- D. 3	Miktar tayinindeki doğrusallık kromatogramı (%100'lık çözelti)	120
Şekil EK- D. 4	Miktar tayinindeki doğrusallık kromatogramı (%120'lık çözelti)	121
Şekil EK- D. 5	Miktar tayinindeki doğrusallık kromatogramı (%140'lık çözelti)	121
Şekil EK- E. 1	Standart çözeltisi başlangıç kromatogramı	122
Şekil EK- E. 2	Numune çözeltisi başlangıç kromatogramı	123
Şekil EK- E. 3	Standart çözeltisi oda koşullarında 48. saat kromatogramı	123
Şekil EK- E. 4	Numune çözeltisi oda koşulları 48. saat kromatogramı	124
Şekil EK- E. 5	Hareketli faz oranı (20:80 h/h)) ile elde edilen kromatogram	124
Şekil EK- E. 6	Hareketli faz oranı (22:78 h/h) olarak değiştirilmiş kromatogram	125
Şekil EK- E. 7	Hareketli faz oranı (18:82 h/h) olarak değiştirilmiş kromatogram	125
Şekil EK- E. 8	Metot koşuları (kolon sıcaklığı 40 ˚C iken) kromatogramı	126
Şekil EK- E. 9	Kolon sıcaklığı 38 ˚C'ye değiştirilmiş sistemin kromatogramı	126
Şekil EK- E. 10	Kolon sıcaklığı 42˚C'ye değiştirilmiş sistemin kromatogramı	127
Şekil EK- E. 11	Metot koşulları (kolon-1) ile elde edilen standart kromatogramı	127
Şekil EK- E. 12	Kolon-2 ile elde edilen standart kromatogramı	128
Şekil EK- F. 1	HPLC sistemi ile elde edilen kromatogram	129
Şekil EK- F. 2	UFLC sistemi ile elde edilen kromatogram	130

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2. 1 Gıda katkı maddeleri ve E kodları 6
Çizelge 2. 2 Besin değeri olan ve besin değeri olmayan tatlandırıcılar 8
Çizelge 2. 3 Doğal ve yapay tatlandırıcılar ve tatlılık düzeyleri [18] 9
Çizelge 2. 4 Kromofor gruplar 53
Çizelge 3. 1 Kullanılan reaktifler 56
Çizelge 3. 2 Kullanılan standartlar 57
Çizelge 3. 3 Kullanılan cihazlar 57
Çizelge 3. 4 Kullanılan kolon özellikleri 57
Çizelge 3. 5 Coca Cola Light'da tayin edilecek bileşenler ve miktarları 58
Çizelge 3. 6 Pepsi Light'da tayin edilecek bileşenler ve miktarları 58
Çizelge 3. 7 Cola Cola Zero' da tayin edilecek bileşenler ve miktarları 59
Çizelge 3. 8 Çözeltilerin alıkonma ve bağıl alıkonma zamanları 65
Çizelge 3. 8 (devam) 66
Çizelge 3. 9 Asesülfam K için % geri kazanım değerleri 67
Çizelge 3. 10 Aspartam için % geri kazanım değerleri 68
Çizelge 3. 11 Kafein için % geri kazanım değerleri 68
Çizelge 3. 11 (devam) 69
Çizelge 3. 12 Sodyum Benzoat için % geri kazanım değerleri 69
Çizelge 3. 13 Asesülfam K için test sonuçları 70
Çizelge 3. 14 Aspartam için test sonuçları 70
Çizelge 3. 15 Kafein için test sonuçları 71
Çizelge 3. 16 Sodyum Benzoat için test sonuçları 71
Çizelge 3. 17 Metot kesinliği test sonuçları 72
Çizelge 3. 18 Ara kesinlik test sonuçları analist I 73
Çizelge 3. 18 (devam) 74
Çizelge 3. 19 Ara kesinlik test sonuçları analist II 74
Çizelge 3. 20 Ara kesinlik 12 analiz sonucu 75
Çizelge 3. 21 Asesülfam K için doğruluk ve çalışma aralığı 81
Çizelge 3. 22 Aspartam için doğruluk ve çalışma aralığı 82
Çizelge 3. 23 Kafein için doğruluk ve çalışma aralığı 83
Çizelge 3. 24 Sodyum Benzoat için doğruluk ve çalışma aralığı 84
Çizelge 3. 25 Doğrusallık ve lineerlik 100% Standat Çözelti Alanları 85
Çizelge 3. 26 Hesaplanan LOD ve LOQ Değerleri 86
Çizelge 3. 27 Asesülfam K için çözelti stabilitesi 87

Çizelge 3. 28 Aspartam için çözelti stabilitesi 87
Çizelge 3. 29 Kafein için çözelti stabilitesi 88
Çizelge 3. 30 Sodyum Benzoat için çözelti stabilitesi 88
Çizelge 3. 31 Katkı maddeleri için metot dayanıklılık (hareketli faz % değişim) 89
Çizelge 3. 32 Katkı maddeleri için metot dayanıklılık (kolon sıcaklığı % değişim) 90
Çizelge 3. 33 Katkı maddeleri için metot dayanıklılık (farklı kolon % değişim) 91
Çizelge 3. 34 Lighh Coca Cola örneğinin analizi 92
Çizelge 3. 35 Light pepsi örneğinin analizi 92
Çizelge 3. 36 Coca Cola Zero örneğinin analizi 93
Çizelge 4. 1 HPLC ve UFLC sistemlerinin kromatografi şartları 101
Çizelge 4. 2 HPLC ve UFLC sistemi ile elde edilen sonuçların karşılaştırılması 102

ÖZET

GAZLI İÇECEKLERDEKİ GIDA KATKI MADDELERİNİN UHPLC İLE EŞ ZAMANLI TAYİNİ İÇİN METOT GELİŞTİRİLMESİ VE VALİDASYON ÇALIŞMALARI

Muhammed Zahid KASAPOĞLU

Anorganik Kimya Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mahmure ÜSTÜN ÖZGÜR

Gıda katkı maddeleri gıdaların fiziksel yapısını, tadını, kokusunu belirlemek, besleyici değerlerini korumak ve dayanıklılıklarını artırmak amacıyla gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Kimyasal yöntemler ile sentezlenen çeşitli yapay gıda katkı maddelerinin yiyecek ve içeceklerde bulunması tüketicilerde güvensizliğe sebep olmaktadır. Gıda katkı maddelerinin zararları düşünüldüğünde; gıdalarda bulunan katkı maddelerinin izinli bulunma değerleri (WHO ve Türk Gıda Kodeksi tarafından müsaade edilen miktar) tüketici sağlığı açısından önem teşkil etmektedir. Bu katkı maddelerinin tanımlanması ve miktar tayini için analitik metodlara ihtiyaç vardır ve bu ihtiyaç gelişen teknolji ile eş zamanlı olarak artmaktadır. Bu kapsamda gıdalarda bulunan katkı maddelerinin miktarlarının belirlenmesi için endüstride çeşitli yöntemler kullanılmaktadır ve bu yönde yapılan çalışmalar gün geçtikçe artmaktadır. Kullanılan yöntemin doğruluğu, seçiciliği, süresi ve maliyeti tüketici ve endüstri açısından düşünüldüğünde oldukça önem arz etmektedir.

Bu tez çalışması kapsamında, gazlı içeceklerde bulunan Asesülfam K, Aspartam, Kafein, Sodyum Benzoat katkı maddelerinin eş zamanlı tayini için basit, kısa analiz süreli, güvenilir ve geçerli bir UFLC yöntemi geliştirildi. Geliştirilen bu yöntemin validasyon

çalışmaları yapılarak tüm gazlı içeceklerin analizinde uygulanabilirliği gösterildi. Ayrıca yöntemin herhangi bir ön ayırma veya türevlendirme işlemine gerek duymaması, minimum hazırlık basamağı ve süresi içermesi, minimum kimyasal malzeme (reaktif) sarfiyatına sebep olması açısından önemli olduğu açıklandı. Geliştirilen ve valide edilen UFLC metodu piyasadaki diğer gazlı içeceklere uygulandı ve elde edilen sonuçlar metodun başarısını doğruladı.

Geliştirilen ve valide edilen UFLC metodu HPLC sistemine uygulanarak her iki sistem için elde edilen sonuçlar karşılaştırıldı. UFLC sisteminin daha avantajlı olduğu ve sistem seçiminin uygunluğu belirlendi. UFLC yönteminin en önemli avantajı kısa analiz süresi içermesi ve buna bağlı olarak daha az çözücüye gerek duymasıdır. Literatürde yapılan araştırmalar sonucunda çözücü tüketiminin %80'e kadar azaldığı belirlenmiştir. Analiz süresinin ve buna bağlı olarak çözücü tüketiminin azalması birçok laboratuvar için düşük maliyet açısından önemlidir. Ayrıca, literatürde UFLC ile metot geliştirme amaçlı yapılan birçok çalışmada analizler kısa sürede gerçekleştirilmiş ve HPLC yöntemine göre daha az çözücü ve zaman gerektirdiği ifade edilmiş olup olumsuz durum olarak sadece UFLC sistemindeki yüksek basıncın kolon ömrünü azaltıcı yönde etki edebileceği şeklinde açıklanmıştır.

Bu tez çalışması ile çeşitli gazlı içeceklerde bulunan gıda katkı maddelerinin eş zamanlı tayini için basit, düşük maliyetli, kısa analiz süreli, düşük analit sarfiyatlı, yüksek seçicilikte güvenilir bir UFLC analiz metodu geliştirildi ve yöntemin kantitatif analiz için uygunluğu öngörüldü.

Validasyon çalışmalarında elde edilen ortalama geri kazanım değerleri Asesülfam K, Aspartam, Kafein ve Sodyum Benzoat için sırasıyla %98,88, %98,99, %99,36, %98,93'dir. Doğrusallık çalışmalarında elde edilen korelasyon katsayısı (r^2) Asesülfam K, Aspartam, Kafein ve Sodyum Benzoat için sırasıyla 0,9999, 0,9996, 0,9994, 0,9998'dir. Hesaplanan LOD değeri Asesülfam K, Aspartam, Kafein ve Sodyum Benzoat için sırasıyla 1,6 µg/mL, 4,3 µg/mL, 3,9 µg/mL, 4,1 µg/mL'dir. Hesaplanan LOQ değeri Asesülfam K, Aspartam, Kafein ve Sodyum Benzoat için sırasıyla 5,2 µg/mL, 14,4 µg/mL, 12,9 µg/mL, 13,7 µg/mL'dir.

Anahtar Kelimeler: Gazlı içecekler, Asesülfam K, Aspartam, Kafein, Sodyum Benzoat, UFLC yöntemi

ABSTRACT

METHOD DEVELOPMENT AND VALIDATION STUDIES FOR THE SIMULTANEOUSLY DETERMINATION OF THE FOOD ADDITIVES IN CARBONATED BEVERAGES BY UHPLC

Muhammed Zahid KASAPOĞLU

Department of Inorganic Chemistry

MSc. Thesis

Prof. Dr. Mahmure ÜSTÜN ÖZGÜR

Food additives are commonly used in the food industry for improving the durability, protecting the nutritional value, determining the physical structure, flavor, odor of the foods. The presence of several artificial food additives synthesized by chemical methods in foods and beverages causes insecurity in consumers. Considering losses of food additives; amount of food additives in foods (WHO and the amount of permitted by the Turkish Food Codex) constitute importance for the consumer's health. Analytical methods are required for the identification and quantification of these additives. These requirements are increasing simultaneously with the developing technology. In this context, various methods are used in the industry to determine the amount of additives in foods and the studies in this direction are increasing day by day. The accuracy, selectivity, time and cost are very important for the used method when considered in terms of consumer and industry.

In this thesis work, UHPLC method (simple, short term analysis, valid and reliable) developed for the simultaneously determination of acesulfame K, aspartame, caffeine, sodium benzoate additives found in sodas. Validation studies of developed method the were performed and applicability of the analysis was shown for the all the sodas. Also, method was announced because it does'nt need any pre-separation or derivatization process, includes a minimum of preparation steps and time, causes minimum chemical

consumption. Developed and validated UHPLC method was applied to other sodas by the market and obtained the results confirmed the success of the method.

Developed and validated UHPLC method was applied to the HPLC system and the results obtained for both systems were compared. UHPLC system was demonstrated more advantageous than HPLC system and the system selection suitability of the UHPLC was determined. The most important advantage of the UHPLC method requires short analysis time and less solvent. Solvent consumption was determined to decrease to 80% as a result of research conducted in the literature. Analysis time and reduction of solvent consumption are important in terms of low cost for many laboratories. In addition, analysis of many studies conducted for method development with UHPLC in the literature have been performed as soon as possible and the method has been expressed that less solvent and time required according to the HPLC in adverse conditions have been described only as it can influence the direction of reducing the column life of the high pressure in the UHPLC system.

Within this thesis work, simple, low-cost, short analysis time, low analyte consumption, high selectivity, reliable UHPLC analysis method was developed for simultaneously detecting additives in various sodas and method previsualized to suitability for quantitative analysis.

Average recovery values obtained in the validation study is 98.88% for Acesulfame K, 98.99% for Aspartame, 99.36% for Caffeine, 98.93% for Sodium Benzoate respectively. Correlation coefficient (r^2) obtained in the linearity study is 0.9999 for Acesulfame K, 0.9996 for Aspartame, 0.9994 for Caffeine, 0.9998 for Sodium Benzoate. Calculated LOD value is 1,6 µg/mL for Acesulfame K, 4,3 µg/mL for Aspartame, 3,9 µg/mL for Caffeine, 4,1 µg/mL for Sodium Benzoate. The calculated LOQ value is 5,2 µg/mL for Acesulfame K, 14,4 µg/mL for Aspartame, 12,9 µg/mL for Caffeine, 13,7 µg/mL for Sodium Benzoate.

Keywords: Carbonated drinks, Acesulfame K, Aspartame, Kaffeine, Sodium Benzoate, UFLC method

BÖLÜM 1

GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Dünya gıda pazarındaki rekabetin artışı, yerli tüketicilerin yüksek kaliteli ürünleri düşük fiyatlara alma beklentisi gıda kalitesinin izlenmesi için yeni yöntemlere ihtiyaç duyulmasına neden olmaktadır. Gıdalarda yapılan tağşiş ve hilenin veya yanıltıcı ilavelerin tespiti için gerek mevcut analitik yöntemlerin geliştirilmesi gerekse de hem Avrupa Birliği hem de diğer gelişmiş ülkelerce yasal düzenlemelerin yapılması adına yönetmelikler ve tüzükler sürekli güncellenmektedir. Ancak, yapılan bilimsel araştırma ve çalışmalara paralel olarak gıda sahtecileri de kabul edilen bu analitik yöntemleri bertaraf edebilecek teknikler geliştirmektedirler. Örneğin 2008'de Çin'de görülen melamin katkılı süt ürünleri gibi.

Gıda katkı maddeleri, gıdaların renk, görünüş, lezzet, koku gibi duyusal özelliklerini düzenlemek, besleyici değerlerini korumak, dayanıklılıklarını arttırmak ve birtakım teknolojik işlemlere yardımcı olmak gibi amaçlarla ilave edilirler. Avrupa Birliğinin, 89/107/EEC nolu Avrupa Parlamentosu ve Konsey direktifinde; sadece teknik olarak kullanılmasına ihtiyaç duyulan katkı maddelerinin gıdaların üretiminde veya hazırlanmasında kullanılabileceği, bunların tüketiciyi aldatmaya yönelik olmaması ve tüketicinin sağlığına zarar vermemesinin gerektiği belirtilmiştir. Şeker içeren ürünlerin aşırı kalori içermeleri, porsiyon miktarlarındaki artış, hareketsiz yaşamın artması, şişmanlık, şeker hastalığı, hipertansiyon, ağız-diş sağlığı ve kalpdamar hastalıklarındaki hızlı artış gibi sebeplerden dolayı, katkı maddelerinin arasında tatlandırıcılar yiyecek, içecek ve ilaç endüstrisinde giderek artış gösteren yaygın bir kullanım alanına

sahiptirler. 94/35 ve 94/31 nolu Avrupa Parlamentosu ve Konsey direktifleri ve 2006/45 ve 2001/46 nolu Türk Gıda Kodeksi tebliğleri gıda maddelerini tatlandırmak amacıyla kullanılan tatlandırıcılarla ilgilidir. Bu direktif ve tebliğlerde satışa sunulan gıdaları veya gıda üretiminde hangi tatlandırıcıların ve ne ölçüde kullanılabileceği, Avrupa Birliği Gıda Güvenliği Ajansı (EFSA) olumlu görüşü de alınarak, belirtilmektedir.

Aspartam gıdalarda Sıvı Kromatografisi (HPLC) [1], IR Spekroskopisi [2], Kapiler Elektroforez [3] ile; sakarin ise gıda ve ilaçlarda potansiyometre [4], Gaz Kromatografisi (GC) [5] ve İyon Kromatografisiyle [6] analiz edilmektedir. İTK genellikle bu tür tatlandırıcıların kalitatif analizlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. İlaç ve bazı gıdalarda aspartam ve sakarinin farklı matriks türlerinde İTK ile tespitine yönelik çalışmalar sınırlı sayıda bulunmaktadır [7-8-9]**.**

Gıda Sektöründe numuneye beyan edilmeden yapılan tatlandırıcı ilavesi çok yaygın olarak görülen bir hile şeklidir. Özelikle karbohidratca zengin gıdalarda bu yolla yapılan tağşişin tespiti oldukça güçtür, çünkü ilave edilen tatlandırıcılar ürünün mevcut karbohidrat profili ile uyum içindedir. Tatlandırıcıların analizi, ürünün orijinalliğinin ve yapılan hilenin tespiti için bir belirteç olabilmektedir.

1.2 Tezin Amacı

Yapılan çalışmada amaç ilk olarak gazlı içeceklerde bulunan Asesülfam K, Aspartam, Kafein, Sodyum Benzoat katkı maddelerinin eş zamanlı tayini için yeni bir UFLC metodu geliştirmektir. Daha sonra geliştirilen bu yöntemin validasyon çalışmalarının yapılması ve tüm gazlı içeceklerin analizinde uygulanabilmesidir. Geliştirilecek ve valide edilecek olan UFLC metodu HPLC sistemine uygulanarak her iki sistem için elde edilen sonuçlar karşılaştırılacaktır.

1.3 Hipotez

Gıda analizlerinde hızlı ve seçici bir yöntem olan UFLC (ultra yüksek performanslı sıvı kromatografi) yöntemi gün geçtikçe diğer kromatografik yöntemlere göre daha çok tercih edilmektedir. Bu tez çalışması kapsamında, başta kola olmak üzere çeşitli

içeceklerdeki tatlandırıcıların tayinine yönelik geliştirilmiş UHPLC yönteminde kullanılabilecek metotların gıda sektöründe kullanılabileceği düşünülmektedir.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1 Genel Bölüm

2.2 Gıda Katkı Maddeleri

Gıda katkı maddeleri, gıdalarda mikrobiyolojik bozulmayı önleme ve dayanıklılığı arttırma, besleyici değeri koruma, raf ömrünü arttırma, teknolojik işlemlere yardımcı olma, renk, görünüş, lezzet, koku gibi duyusal özellikleri düzeltme gibi pek çok amaçla katılan maddelerdir [10]. Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization-WHO) ve Gıda Tarım Örgütü (Food and Agriculture Organization-FAO)'nün ortak çalışmaları ile oluşturulmuş Uluslararası Gıda Kodeks Komisyonu (Codex Alimentarius Commission-CAC) tarafından verilen Gıda Katkı Maddeleri tanımı oldukça ayrıntılıdır. Bu tanımda, Gıda Katkı Maddesi "tek başına gıda olarak kullanılmayan ve gıdanın tipik bir bileşeni olmayan, besleyici değeri olsun veya olmasın, imalat, işleme, hazırlama, uygulama, paketleme, ambalajlama, taşıma, koruma ve depo aşamalarında, gıdalarda teknolojik amaçla katılan ya bu gıdaların içinde veya yan ürünlerinde doğrudan ve dolaylı olarak bir bileşeni haline gelen veya bunların karakteristiklerini değiştiren maddeler" olarak ifade edilmektedir. Bu tanım gıdalara istenilmediği halde bulaşan kontaminantları veya besleyici kaliteyi arttırmak amacıyla katılan maddeleri içermemektedir [10].

Gıda katkı maddelerinin kullanılması ile ilgili tarihsel gelişmeler incelendiğinde, M.Ö. 3000 yıllarında et ürünlerini kürlemede tuzdan yararlanıldığı, M.Ö. 900 yıllarında ise tuz ve odun tütsüsünün gıda saklama yöntemleri olarak kullanıldıkları görülmektedir. Ortaçağlarda etlere koruyucu amaçla tuz ve tütsünün yanı sıra katılan nitratın etin

rengini olumlu yönde değiştirmek ve bozulmayı önlemek amacıyla kullanıldığı bilinmektedir. M.Ö. 50'li yıllarda baharatlardan lezzet verici olarak yararlanılmış, gıda boyaları ise günümüzden yaklaşık 3500 yıl kadar önce Mısırlılar tarafından renklendirici amaçla kullanılmışlardır. 19. yüzyıldaki hızlı şehirleşmenin paralelinde katkı maddelerinin kullanımları, özellikle gıdaları bozulmalara karşı koruma amacıyla yaygınlaşmış olup günümüzde ise bu maddeler gelişen gıda teknolojisinin vazgeçilmez bir parçasını oluşturmuşlardır [11]. Son 30 yıldır gelişmiş ülkeler başta olmak üzere, yiyecek maddelerinde kullanılan katkı maddelerinde ciddi bir artış olduğu bilinmektedir. Örneğin sadece İngiltere'de bir yıl içinde kullanılan katkı maddelerinin toplam ağırlığının iki yüz bin tonu geçtiği sanılmaktadır. Çoğu aroma/lezzetlendirici olmak üzere toplam altı bin civarında katkı maddesi bulunmaktadır ve tatlandırıcı maddeler de gıdalarda kullanılan önemli bir grubu oluşturmaktadırlar. Gıdaya tatlı tadı veren ve şeker olmayan maddeler olarak tanımlanan tatlandırıcılar, farklı kimyasal yapılara sahip olmaları nedeni ile değişik fiziksel, kimyasal ve fizikokimyasal özellikler gösterirler. Tatlandırıcı etkisi bilinen en eski madde şeker grubundaki sukroz olup, glukoz, fruktoz, hidrolize nişasta şurupları ve yüksek fruktozlu mısır şurupları da tarımsal kaynaklı doğal tatlandırıcılardır. Ancak, Dünya Sağlık Teşkilatı (WHO) ve Gıda Tarım Örgütü (FAO)'nün oluşturdukları Uluslararası Gıda Kodeksi Komisyonu (CAC) tarafından yukarıda sayılan ve şeker özelliği taşıyan bu maddeler gıda katkı maddesi olarak nitelendirilmemektedir [10].

2.2.1 Gıda Katkı Maddelerinin Kullanım Amaçları

Gıda katkı maddelerinin kullanım amaçları aşağıdaki gibi sıralanabilmektedir [12];

Gıdaların raf ömrünün uzatılması ve kayıpların azaltılması; ekmeğin küflenmesini önlemede kalsiyum propiyonat, kür edilmiş et ürünlerinde botilizmi engellemede nitrat ve nitrit, yağların acılaşmasına karşı bütillendirilmis hidroksianisol (BHA) gibi maddelerin kullanımı, bu amaca örnek olarak verilebilir.

Gıda kalite karakteristiklerinin muhafaza edilmesi; salata soslarında yağ ayrılmasını önleme amacıyla katılan emilgatörler veya fırınlanmış ürünlerde kullanılan kabartma ajanları bu amaçla kullanılan katkı maddeleridir.

Gıda hazırlamada yardımcı olarak; hazır pudinglerin eldesinde fosfatlı katkı maddelerinden yararlanılması örnek olarak verilebilmektedir.

Besleyici değerin korunması; örneğin, gıdalarda bulunan C vitamini gibi kolay bozunabilen besleyici özellikteki maddeleri korumak amacıyla antioksidanlardan yararlanılmaktadır.

Gıdaların duyusal özelliklerinin düzeltilmesi ve geliştirilmesi; bu amaçla kullanılan katkı maddelerine örnek olarak renklendiriciler, lezzet vericiler, tatlandırıcılar verilebilir.

2.2.2 Gıda Katkı Maddeleri E Kodları

EC (European Community) kodu: Her bir gıda katkı maddesi için Avrupa Birliği tarafından belirlenen kod numaralarını ifade eder [13]. Numaraların başında bulunan E harfi Europe (Avrupa) sözcüğünün ilk harfidir. Bir katkının E kodu taşıması, bu katkının üzerinde tüm güvenlik çalışmalarının tamamlandığını ve Avrupa Birliği'nin Bilimsel Gıda Komitesi tarafından kodlanarak onaylandığını gösterir [14]. Hazır gıdaların paketleri üzerinde, kullanım amaçlarına göre gıda katkı maddelerinin kategorileri, bunu izleyen özel adlar ve "E" numaraları ile belirtilir. "E" numaraları Avrupa Birliği ülkelerinde gıda katkı maddelerini pratik bir kodlama yöntemi olarak geliştirilmiştir. "E" numara sistemi ile gıda katkı maddesinin temel işlevlerine göre sınıflaması şöyledir (Çizelge 2.1) [15].

Çizelge 2. 1 Gıda katkı maddeleri ve E kodları

Renklendiriciler	E100 – 180
Koruyucular	E200 – 297
Antioksidanlar	E300 – 321
Emülsifiyer ve stabilizatörler	E322 – 500
Asit-baz sağlayıcılar	E500 – 578
Tatlandırıcılar, koku verenler	E620 – 637
Genis amaçlı gıda katkı maddesi	E900 – 927

Tarım ve Köyişleri Bakanlığınca hazırlanmış olan ve 16 Kasım 1997 tarihinde yayınlanan Resmi Gazete ile yürürlüğe giren Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği ile gıda katkı

maddelerinin kullanımları konusunda yeni düzenlemeler geliştirilmiştir [13]. Kodekste gıda katkı maddeleri tanımlanmış ve bu maddelerin EC kodları, adları, kullanılabilecekleri gıda grupları ve izin verilen maksimum miktarları listeler halinde açıklanmıştır. Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliğinde E numaraları ile belirtilmiş olan tüm katkılar, gerek CAC gerekse EC listelerinde yer alan ve belirtilen maksimum dozlarında kullanımları, değişik şartlarda ve değişik gıdalarda onaylanan maddelerdir [12].

2.3 Tatlandırıcılar

Günümüzde şeker yerine kullanılan birçok tatlandırıcı bulunmaktadır. Fakat yiyecek ve içecek endüstrisi, daha güvenli ürün geliştirmek ve tüketicilerin beklentilerine cevap vermek için üretilen gıda ürünlerinin duyusal kalitesini iyileştirme çalışmalarına sürekli olarak devam etmektedir [16].

CAC, tatlandırıcı ifadesini "gıdaya tatlı tadı veren, şeker olmayan madde" olarak tanımlamaktadır. Tatlandırıcı özelliği bulunan maddeler farklı kimyasal yapılara sahip olmaları nedeni ile değişik fiziksel, kimyasal ve fizikokimyasal özellikler gösterirler. Bu değişik özellikleri nedeni ile farklı şekillerde sınıflandırılabilmektedirler [16].

En iyi tatlandırıcının bulunması yönündeki çalışmalar devam etse de henüz en ideal tatlandırıcı bulunamamıştır. Sakkaroz tatlandırıcılar içinde altın standart olarak görülmektedir. Fakat bazı ilaç ve sakız gibi ürünlerde sakkarozun kullanımı uygun değildir. İdeal bir tatlandırıcı en az şeker kadar tatlı, renksiz ve kokusuz olmalıdır. Kanserojenik olmamalıdır. Tatlı tadını hemen verebilmeli, istenmeyen tat kokuya neden olmamalıdır. Suda çözünebilmeli, asidik ve bazik koşullara ve ısıl uygulamalara karşı dayanıklı olmalıdır. Ürünün raf ömrü boyunca stabilitesini korumalıdır. Ürünün içerdigi bileşenlerle uyumlu olmalı ve bu bileşenlerle reaksiyona girmemelidir. Toksik olmamalı, tüketildikten sonra normal bir şekilde metabolize olmalı ve vücutta birikmeden atılmalıdır. İnsan sağlığı için güvenilir olduğu bilimsel olarak kanıtlanmıs olmalıdır. Sakkaroz ve diğer tatlandırıcılara göre ucuz olmalı, kolayca üretilebilmeli ve depolama ve taşıma sırasında problem oluşturmamalıdır [17].

Tatlandırıcılar doğal ve yapay tatlandırıcılar olmak üzere iki grupta incelenir. Doğal tatlandırıcılar, şeker, bal, melas gibi bitkilerden veya doğal materyallerden elde edilir.

Aspartam, sakarin, sukraloz gibi yapay tatlandırıcılar ise doğal tatlandırıcı moleküllerinin kimyasal yöntemlerle üretilmesi ile elde edilir. Yapay tatlandırıcılar kalorisiz olarak üretilirken doğal tatlandırıcıların çoğu şeker kadar kalori içermektedir. Fakat şeker alkolleri vücutta daha farklı metabolize olur ve oldukça düşük düzeyde kalori içerir. Bu nedenle kalorisi azaltılmış gıdaların üretiminde kullanılır [18].

Örneğin, enerji verme durumuna göre besin değeri olan ve besin değeri olmayan tatlandırıcılar (Çizelge 2.2) olarak sınıflandırılabildiği gibi; genellikle bitkisel olan doğal kaynaklardan elde edilenler doğal tatlandırıcı, sentezleme yolu ile elde edilenler ise yapay tatlandırıcı olarak, ayrıca tatlandırıcılık etkisinin yanı sıra su tutarak hacim verme özelliği bulunanlar hacim verici tatlandırıcı, çok düşük miktarda kullanıldıklarında bile şiddetli tatlılık oluşturma özelliğinde bulunanlar ise yoğun tatlandırıcı olarak ifade edilmektedir [19].

Çizelge 2. 2 Besin değeri olan ve besin değeri olmayan tatlandırıcılar

Besin Değeri Olan Tatlandırıcılar	**Besin Değeri Olmayan Tatlandırıcılar**
Sakkaroz	Asesülfam Potasyum
Glikoz	Alitam
Fruktoz	Aspartam
Şeker Alkolleri (Polioller)	Siklamat
Arabitol, Eritritol, Gliserol, Isomalt, Laktitol,	Neotam
Maltitol, Mannitol, Sorbitol, Xylitol	Sakarin
	Stevya
	Sukraloz

Sakkaroz bütün tatlandırıcılar için bir standart oluşturmaktadır. Bütün diğer tatlandırıcıların tatlı tadı sakkaroza göre verilir. Sakkarozun tatlılığı 1’ e esittir. Çizelge 2.3’de doğal ve yapay tatlandırıcılar ve tatlılık düzeyleri belirtilmistir.

Çizelge 2. 3 Doğal ve yapay tatlandırıcılar ve tatlılık düzeyleri [18]

Doğal Tatlandırıcılar		Yapay Tatlandırıcılar	
Tatlandırıcının adı	Tatlılık düzeyi	Tatlandırıcının adı	Tatlılık düzeyi
Brazzein	2000	Aspartam	160 – 200
Curculin	550	Asesülfam K	200
Pentadin	500	Alitame	2000
Glisirizin	50	Sakarin	300
Mabinlin	100	Sukraloz	600
Monellin	3000	Siklamat	30
Tamatin	2000 - 3000	Dulcin	250
Tagatoz	0.92	Neohesperidin dihidrokalkon	1500
Stevia	250	Neotame	8000
Hidrojene Nişasta Hidrolizatları	0.4 – 0.9	P-4000	4000
İzomalt	0.45 – 0.65	Karrelam	160000
Laktitol	0.4	Bernardam	180000
Maltitol	0.9	Sukrononat	200000
Mannitol	0.5		
Sorbitol	0.6		
Ksilitol	1		
Eritrol	0.7		
Gliserol	0.6		

2.3.1 Tatlandırıcılar ile ilgili gelişmeler

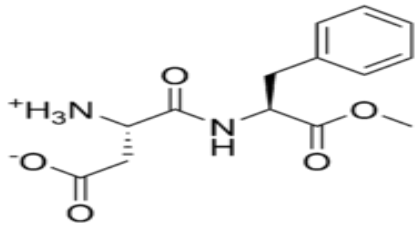
Son iki yüz yıldır düşük kalorili şekersiz ürünlerin tüketimi oldukça artmıştır. Sadece Birleşmiş Milletlerde 150 milyondan fazla insan bu ürünleri düzenli olarak tüketmektedir. Bu nedenle yüzlerce düşük kalorili ve şekersiz ürün çeşidi bulunmaktadır. 1990'lı yılların sonlarında meydana gelen birkaç gelişmenin, bu ürünlerin sayısının artmasını kolaylaştıracağı beklenmektedir. Asesülfam K'nın içeceklerde kullanımının, aspartam ve sukralozun ise tüm gıdalarda tatlandırıcı olarak kullanılmasının Birleşmiş Milletler tarafından onaylanması, poliplerin sakkaroz ile kıyaslandığında kalori değerini düşürücü etkisinin tüm dünyadaki denetim kurumlarınca kabul edilmesi buna bir örnektir. Bununla birlikte aspartam ve sakarin gibi bazı tatlandırıcıların insan sağlığı üzerinde olumsuz etki oluşturabileceği şüpheleri nedeni ile bu tatlandırıcılar üzerinde yapılan çalışmalar devam etmektedir. 1960'lı yıllarda siklamat ve sakarin içeceklerde ve diğer gıdalarda birlikte kullanılmaya başlanmıştır. Tatlandırıcıların birlikte kullanılması ile ilgili yaklaşım ilk olarak bu uygulama ile başlamıştır. Bu tatlandırıcıların karışım halinde kullanılmasının en önemli avantajı sakarinin (sakkarozdan 300 kez daha tatlı), siklamatın (sakkarozdan 30 kez daha tatlı) tatlılık gücünü arttırması ve siklamatın, sakarinin ağızda bıraktığı istenmeyen tat kokuyu maskelemesidir. İki tatlandırıcının birlikte kullanılması ile sinerjik etki oluşur ve tatlılık düzeyleri, tek tek kullanıldıklarında gösterdikleri tatlılık düzeylerinin toplamından daha yüksektir. Sinerji etki oluşumu birçok tatlandırıcı karışımı için geçerlidir. Gazlı içecek endüstrisinde diyet ürünlerin üretilmeye başlamasındaki en önemli faktör, siklamatın çok yaygın bir şekilde kullanılmasıdır. Fakat 1970 yılında Birleşmiş Milletlerde yasaklanması ile birlikte çok geniş bir pazar payına sahip olan diyet içecekler için yeni tatlandırıcılar geliştirme ihtiyacı ortaya çıkmıştır. 1970 yılında siklamat kullanımının durdurulmasından sonra, on yıl boyunca şekere alternatif olarak yalnızca sakarin kullanılmıştır. Fakat günümüzde kullanımı onaylanan aspartam, asesülfam K, sakkaroz gibi tatlandırıcılar da diyet ürün formasyonlarında yer almaktadır. İçeceklerde genellikle sakarin-aspartam, aspartam-asesülfam K ve sukraloz-aspartam kombinasyonları kullanılır. Bunun yanında asesülfam K-aspartam-sakarin ve aspartam–siklamat-asesülfam K üçlü kombinasyonları halinde de kullanılabilmektedir. Bununla birlikte tatlandırıcılar ile ilgili ortaya çıkan tüm gelişmeler olumlu yönde

değildir. Bu tatlandırıcıların gıdalarda kullanımı onaylanmış olmasına rağmen insan sağlığı üzerindeki etkileri ile ilgili şüpheler ve bu yönde yapılan çalışmalar devam etmektedir [17]

2.3.2 Tatlandırıcı Çeşitleri ve Kullanım Alanları

2.3.2.1 Aspartam

Aspartam, 1965 yılında Schlatter adlı araştırıcı tarafından Searle araştırma laboratuarında aminoasitlerden gastrik peptid sentezlenmesinde oluşan ara ürünlerin saflaştırılması sırasında elde edilen N-L-α-aspartil-L-fenilalanin-1-metil esterin tatlılık özelliğinin belirlenmesi üzerine tesadüfi olarak bulunmuştur. Aspartam sentezi L-aspartik asit ve L-fenilalaninden veya L-fenilalaninin metil esterinden başlamaktadır. Bilinen peptid sentezi yolu aspartam için de geçerli olup, aspartik asit için koruyucu gruba gereksinim duyulmaktadır. Bu durumda susuz formilaspartik asit kullanılmakta ve fenilalanin metilester ile reaksiyona sokularak N-formilaspartilfenilalanin elde edilmektedir. Oluşan bu maddenin klorür asidi ve metanol ile muamele edilmesi ile aspartam elde edilmektedir. Şekil 2.1'de aspartamın formülü görülmektedir.



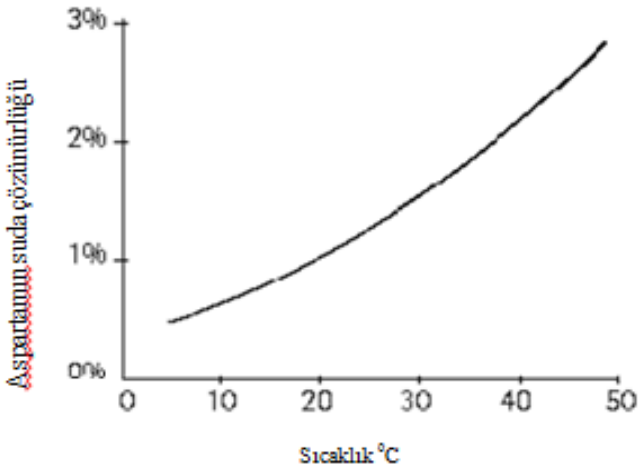
Şekil 2. 1 Aspartamın molekül formülü

Kimyasal peptit sentezi dışında ticari olarak enzimatik yolla da aspartam sentezlenebilmektedir.

Aspartam, aspartik asit ve fenilalaninden oluşmuş amfoter yapıda bir dipeptittir. Sinonimi Aspartyl Fenilalanin Methyl Ester, kimyasal ismi N-(L-α-Aspartyl)-Lphenylalanine- 1-methyl ester, kimyasal formülü $C_{14}H_{18}N_2O_5$, molekül ağırlığı 294,31'dir. 1 g'ı 4 kcal enerji verir. Tat karakteri sakkaroza benzer, hafif geç algılanır, ısıya dayanıksızdır. Aspartamın tatlılığının sakkarozun verdiği tatlı tada benzer olduğu belirtilmektedir. Aspartamın tat algısı gecikmiş olarak ortaya çıkmakta ve uzun

sürmektedir. Ayrıca aspartamın özellikle meyve lezzetini arttırıcı özelliği olduğu da bilinmektedir.

Aspartam, % 4'lük sakkaroz çözeltisinden 150 – 200 kat daha tatlı olup, beyaz toz yapıda ve kokusuz bir tatlandırıcıdır. Suda çok az oranda (25˚C de % 1 düzeyinde), alkolde ise belli oranda çözünmekte, katı ve sıvı yağlarda ise çözünmemektedir. Aspartamın sudaki çözünürlüğü pH'ya bağlı olup, izoelektrik noktası olan pH 5.2' de ve üzerinde (1g/100mL) düşük çözünürlüğe sahiptir. Aspartamın sudaki çözünürlüğü sıcaklığa da bağlı olup, Şekil 2.2'de görüldüğü gibi sıcaklık arttıkça çözünürlük de artmaktadır [19].



Şekil 2. 2 Aspartamın sudaki çözünürlüğü-sıcaklık ilişkisi

Aspartamı meydana getiren bileşikler aspartik asit, fenil alanin ve metanol; aspartam oral yolla tüketildiğinde iki şekilde metabolize olur. Aspartam ya bağırsakta proteolitik ve hidrolitik enzimlerle aspartat (%40), fenilalanin (%50) ve metanole (%10) kadar bozunur. Bu bileşenler aminoasit ve metanolun absorbsiyonuna benzer şekilde absorbe olur ya da önce bir demetilasyon ile metanol ve aspartil fenilalanin dipeptidine yıkılır. Dipeptit bölümü, dipeptitlere özel bir transport mekanizması ile absorbe olduktan sonra mukoza hücresinde hidroliz olarak portal dolaşıma karışır. Metanol ise bilinen şekilde emilir. Bu bileşenler yaygın olarak tüketilen birçok gıdanın yapısında da bulunmakta ve insan vücudunda et, peynir, balık, sebze, meyve suyu ve anne sütünden de aynı şekilde metabolize edilmektedir.

Aspartam, yapısında bulunan dipeptidin vücutta tamamen sindirilmesi nedeni ile enerji veren (4 kcal/g) bir madde olmakla birlikte sakkaroza göre çok düşük miktarlarda kullanıldığından sağladığı kalori düşük düzeydedir.

Aspartamın stabilitesi pH, sıcaklık ve nem gibi faktörlerden etkilenmekte olup, yüksek sıcaklık ve asidik ortamlarda ester bağı hidroliz olarak aspartilfenilalanin ve metanol oluşmaktadır. Oluşan metanol aspartamın diketopiperazine dönüştürülmesiyle ortamdan uzaklaştırılabilmektedir. Diketopiperazin de hidroliz olarak aspartilfenilalanine dönüşmekte ve daha ileri safhada ise kendini oluşturan iki aminoasit; aspartik asit ve fenilalanini oluşturmaktadır. Bu oluşan maddeler tatlı tada sahip olmadıkları için gıdada tatlılık kaybına neden olmaktadır. Bu nedenle aspartamın yüksek sıcaklık ve uzun süre depolama gerektirmeyen ürünlerde kullanılması önerilmektedir. 110°C'nin üzerinde bozunma meydana gelir. Kuru ürünlerde aspartamın stabilitesinin yüksek olduğu, nem miktarı arttıkça stabilitenin azaldığı saptanmıştır. % 8 ve altındaki nem düzeylerinde aspartamın oldukça stabil olduğu belirtilmektedir. Nemin bulunmadığı şartlarda aspartam saf formunda birkaç yıl depolanabilir. Minimum raf ömrü optimum şartlarda 5 yıldır. Bu yüzden toz karışım gibi kuru uygulamalarda ya da tablet formunda hem üretim prosesi boyunca hem de ürünün raf ömrü boyunca stabilite son derece iyidir. Nem ve depolama göz önüne alındığında 30°C'de % 70 nispi nemde 6 ay depolamada aspartamda bozunma tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra 20°C'de % 40 nispi nemde 1 yıl depolandığında % 2 den daha az bozunma olduğu gözlenmiştir Protein yapısında olmasına rağmen aspartam, içecek sektörü başta olmak üzere birçok gıda sektöründe başarılı bir stabiliteye sahiptir. Ortamın pH'sının raf ömrü üzerine etkisi yadsınamaz. Fosforik asit içeren ürünlerde en kısa raf ömrüne sahiptir. Stabilite için optimum pH 4,2 civarındadır. Ancak pH 3–5 civarında da stabilitesini koruyabilir. Aspartamın bazik pH değerine sahip sıvılarda kullanımı pek tavsiye edilmez. Aspartam stabilitesinin korunması açısından uygun pH seviyeleri ve kontrollü depolama sıcaklıkları önem taşımaktadır. Aspartam, diğer karbohidratlar ve yüksek tatlılık potansiyeline sahip sakkaroz, glikoz, fruktoz ve sakkarin ile birlikte kullanıldığında çok çeşitli düşük kalorili ürünler elde edilebilmektedir. Aspartam diğer tatlandırıcılar ile birlikte kullanıldığında sinerjist etki göstererek, kullanılan toplam tatlandırıcı miktarının azaltılmasını da sağlamaktadır.

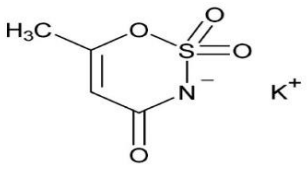
Aspartam, asesulfam K ile birlikte kullanıldığında sinerjist etki gözlenmekte olup, çeşitli gıdalarda yapılan çalışmalarda aspartam / asesulfam K karışımı için en etkili oranın 1:1 olduğu belirlenmiştir.

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

Tahıl ürünlerinde, bir kısım şeker yerine aspartam kullanılmaktadır. Kullanılan aspartam ile şeker miktarı azaldığı için daha fazla tahıl ile daha az enerji eldesi mümkün olabilmektedir. Aspartam tahıl ürünleri üzerine püskürtme ile verilebilmektedir. Şekerlemelerde (şekersiz naneli şekerler, sert şekerlemeler, çikolata, sakız, yumuşak şekerlemeler vb.) aspartamın diş çürümelerine neden olmaması, kalori değerinin düşük olması nedeniyle yaygın şekilde kullanılmaktadır. Şeker oranı yüksek olan bu ürünlerde aspartam kullanımı ile teknolojik problemler de önemli düzeyde çözümlenmiş olmaktadır. Aspartam bunların dışında tatlı turşularda, kremalarda, reçel, marmelat, jöle ve benzeri pasta dolgu maddelerinde de kullanılmaktadır [19].

2.3.2.2 Asesulfam K

Asesulfam K, 1967 yılında Clauss ve Jensen adlı araştırıcılar tarafından tesadüf sonucunda bulunmuş bir tatlandırıcıdır. Araştırıcılar, butin ve florosulfonil izosiyanatla yapılan çalışmalar sırasında sentezlenen dihidrookzatiyazon dioksitlerin tatlı tada sahip olduğunu, kısa zincirli alkil grupları içeren bileşiklerin ise maksimum tatlılığa sahip olduğunu saptamışlardır. Bu bileşikler içerisinde 6-metil-1,2,3-okzatiyazin-4(3H)-on-2,2-dioksit adlı bileşiğin kolay sentezlenmesi nedeniyle yapay tatlandırıcı olarak kullanılması önerilmiştir. Kapalı formülü ($C_4H_4NO_4SK$) olan asesulfam K'nın molekül ağırlığı 201,2 dir. Beyaz, kokusuz ve kristal yapıda olan asesulfam K'nın saf ve katı halinin oda sıcaklığındaki raf ömrü oldukça uzundur. Asesulfam K'nın kimyasal yapısı Şekil 2.3'de görülmektedir.



Şekil 2. 3 Asesulfam K'nın kimyasal yapısı molekül formülü

Asesulfam K'nın sudaki çözünürlüğü oldukça yüksek olup, çözünürlük sıcaklıkla birlikte artmaktadır. Asesulfam K, pH 3-7 arasında stabil iken, pH 3'ün altına düştüğünde çok düşük miktarda parçalanmanın başladığı saptanmıştır. Asesulfam K gıdalara ve içeceklere uygulanan normal işlem koşullarında parçalanmamakta, pişirme sırasında, pastörizasyon veya mikrodalga uygulamalarında da yapısında bir değişiklik olmamaktadır [19].

Asidik gıda ve içeceklerde nötr olanlara kıyasla aynı konsantrasyonda asesulfam K kullanımı ile daha yüksek tatlılık elde edilmektedir. Asesulfam K tek başına tatlandırıcı olarak kullanılabildiği gibi diğer tatlandırıcılarla birlikte kullanıldığında sinerjist etki de oluşturmaktadır. Bu maddenin, sorbitol, izomalt ve fruktoz ile birlikte sinerjist etki yarattığı, siklamat ve aspartam ile de aynı etkinin söz konusu olduğu, sakkarin ile bu etkinin çok düşük bulunduğu saptanmıştır. Sinerjist etkiye en uygun bileşim olan asesulfam K/aspartam karışımı için 1:1 veya 1:5 olarak belirlenmiştir. Asesulfam K'nın şeker alkolleri ile karışım olarak kullanıldığı durumlarda hoşa giden tatlar elde edilmiştir. Özellikle asesulfam K/sorbitol karışımında dolgun bir tatlılık elde edilmiş, bu nedenle söz konusu karışımın şekerlemelerde, meyve preparatlarında ve viskozite gerektiren gıdalarda kullanılmasının uygun olduğu bildirilmiştir. Asesulfam K, vücutta metabolize edilemez ve idrarla değişmeden dışarı atılır. Yapılan farmakolojik çalışmalar tüketilen asesulfam K'nın % 95'inin değişmeden idrarla dışarı atıldığını ve bu nedenle metabolize edilmediği için enerji vermediğini, aynı zamanda asesulfam K tüketiminin vücuda potasyum alımını etkilemediğini ortaya koymuştur. Asesulfam K, Birleşik Gıda Katkıları Uzman Komitesi (JECFA) tarafından ilk olarak 1983 yılında güvenilirlik açısından değerlendirmeye alınmıştır. FDA ilk olarak 1988 yılında asesulfam K'nın alkolsüz içeceklerde tatlandırıcı olarak kullanılmasını onaylamıştır. FDA ve JECFA, asesulfam K için ADI 15 mg/kg olarak belirlemiş, daha sonra Avrupa Birliği Bilimsel Gıda Komitesi (SCF) 1985 yılında tatlandırıcılar hakkında kapsamlı bir değerlendirme

yayınlamış ve komite asesulfam K'nın gıda ve içeceklerde kullanılmasını onaylamış, ancak günlük tüketilebilir miktarın en çok 9 mg/kg olmasını önermiştir. Böylelikle asesulfam K, Avrupa'da 1985 yılından ve ABD'de 1988 yılından bu yana kullanılmaktadır. FDA, asesulfam K'nın güvenirliliğini 2003 yılının kasım ayında tekrar onaylamış ve genel amaçlı kullanımına onay vermiştir. Asesulfam K'nın güvenilirliği 15 yıldan uzun süren 90'nın üzerinde çalışma ile resmi kurumlar tarafından onaylanmış ve aralarında Kanada, İngiltere, Fransa, İsviçre, İtalya, Belçika'nın da bulunduğu 90'nın üzerinde ülkede kullanılmaya başlanmıştır [17].

2.3.2.3 Kafein

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

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

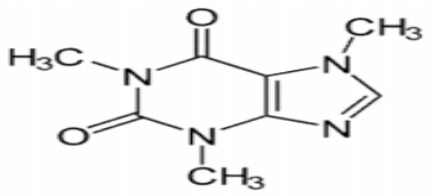
Kafein birçok bitkide değişik miktarlarda bulunmaktadır. Fasulyelerde, yapraklarda ve meyvelerde 60 çeşit bitkide bulunur. Bilinen kuru çay, %10 luk kurşun asetat ($Pb\text{-}CH_3COO$) ya da $CaCO_3$ ile birlikte kaynatıldıktan sonra ayırma hunisinde kloroform ile ekstrakte edilir kalan alt faz alınıp içindeki kloroform uçurulur ve kalan sıvı süblimasyon yöntemi ile saflaştırılarak kafein elde edilebilir.

Temel farmakolojik özellikleri:

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

Kafein ve bağımlılık tartışması

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

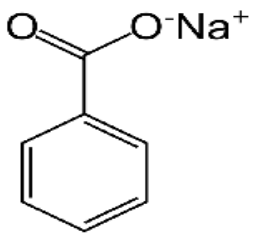


Şekil 2. 4 Kafeının kimyasal yapısı

Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (FDA - Food and Drug Administration) kafeinin gazlı alkolsüz içeceklerde kullanmasıyla sağlığı olumsuz yönde etkilediğine dair bir kanıta rastlanmamış; 140'tan fazla ülkede, kafeinin güvenliği araştırılıp içeceklerde çeşitli seviyelerde kullanımına izin verilmiştir. WHO'ya göre bağımlılık yapan ilaçların neden olduğu sosyal ve fiziksel sonuçlar ile kafein arasında uzaktan yakından bir bağlantı olduğuna dair hiçbir kanıt bulunamamıştır [20].

2.3.2.4 Sodyum Benzoat

Sodyum benzoat bir kimyasal tuzdur. Benzoik asidin sodyum bikarbonat, sodyum karbonat veya sodyum hidroksit ile nötralizasyonu sonucunda elde edilir. Bozulma ısısı 300°C'dir. Suda kolayca çözünebilir.



Şekil 2. 5 Sodyum benzoatın kimyasal yapısı

Bu tuz tabii olarak bulunmaz. Benzoik asit ise pek çok bitki ve hayvanda tabii olarak bulunur. Bu kaynaklardan üretilir. 120 °C de erir. Suda erime oranı düşüktür. Alkol vs. gibi sıvılarda erime oranı daha yüksetir. Ticari benzoik asit, 200 °C civarında, kobalt ve mangan tuzlarının katalist olarak bulunduğu sıvı fazda oksijen ile toluenin reaksiyonu sonucunda elde edilir. Benzenin konsantre edilmiş sülfürik asit veya CO_2 ile yine katalistlerin bulunduğu bir ortamda oksidasyonu sonucunda da elde edilebilir. Üretilen benzoik asidin %90'ı sanayide, % 10'u ise gıda, ilaç ve kozmetiklerde kullanılan SB üretiminde kullanılır. Sodyum benzoat'ın erime sıcaklığı 300 °C civarındadır. Suda erime oranı, benzoik asitten 200 defa daha fazladır. Benzoik asidin ve Sodyum benzoat'ın zehirleme etkisi çok azdır. Ancak alerjik ve asmatik reaksiyonları tetikleyebilir. Cilt ve gözde tahriş yapabilir. Gıda, ilaç ve kozmetik ürünlerinde koruyucu olarak kullanılır. Bazı ürünlerde ise tat verici madde olarak kullanılır. Ürünlerde kullanılma oranı en fazla % 0.1 olmalıdır. Meşrubatlarda, soslarda, turşularda, konservelerde, diş macununda, ilaç ve diğer kozmetiklerde kullanılır [21].

2.4 Asesülfam K, Aspartam, Kafein ve Sodyum Benzoat İçeren Örneklerin Analizlerine Ait Literatürde Yapılan Çalışmalar

Endüstriyel içeceklerdeki yapay tatlandırıcıların içeriğinin daha iyi kontrol edilmesi için hızlı, doğru ve hassas 2 sıvı kromatografi yöntemi geliştirilmiş ve optimize edilmiştir. Ultra performanslı sıvı kromatografi-fotodiyot dizi (UPLC-PDA) ve sıvı kromatografi elektrosprey iyonizasyon-ikili kütle spektrometri (LC-ESI-MS/MS) yöntemleri alkolsüz ve toz içeceklerin içerdiği aspartam, neohesperidin dihidrokalkon, neotam, potasyum asesülfam, sakarin, sodyum siklamat ve sükraloz gibi gıda katkı maddelerinin izlenmesi ve analizi için uygulanmıştır. Yöntemler hedef bileşikler için yüksek doğrusallık (R^2 <0,9990) göstermiştir. Düşünülen tüm bileşikler için ölçüm sınırı UPLC-PDA ve LC-ESI-MS/MS yöntemleri için sırasıyla (0.01-0.1 µg mL-1 and 0.05-5 ng mL-1 olarak belirlenmiştir ve sonuçların yasal olarak uygun değerlerin altında olduğu ifade edilmiştir. Yöntemlerin gerçek örneklere uygulanmasıyla yüksek doğruluk ve geri kazanım sağlanmıştır. Geri kazanım, %9.4'ten düşük bağıl standart sapma (RSD) ile %90.0-114.6 konsantrasyon aralığında değişmiştir. Sonuç olarak, yöntem İspanya'da yaygın olarak tüketilen 66 içeceğin içerisindeki yapay tatlandırıcıların analizi için başarılı

bir şekilde uygulanmıştır. Yöntem farklı örnek kategorileri için değerlendirilmiş ve kalite kontrol laboratuvarlarında yöntemin hızlı ve güvenilir uygulama açısından uygunluğu alkolsüz içecekler, meyve suları, çay, soya içecekleri, süt bazlı içecekler, bira, alkollü içecekler için kanıtlanmıştır. UPLC-PDA yöntemi; yüksek hassasiyet, kısa analiz süresi, düşük çözücü tüketimi gibi pek çok avantaj sağlamıştır ve dolayısıyla maliyeti düşürmüştür. Aynı çalışma için LC-ESI-MS/MS yöntemi hedef bileşiklerin anlaşılır şekilde tanımlanması için uygulanmıştır ve böylece UPLC-PDA ile elde edilen sonuçlar doğrulanmıştır [22].

Ordoñez ve arkadaşları farklı içecek örneklerinde dokuz tane yoğun tatlandırıcının analizi için yüksek sıcaklıklı sıvı kromatografi-ikili kütle spektrometri tekniğine (HTLC–MS/MS) su ve düşük yüzdeli etanol ile (yeşil hareketli faz) kombine edilmiş yeni bir analitik yöntem geliştirmişlerdir. Yöntem 23 dakikada (kolonun yeniden dengeye gelmesi dahil) analizin yapılmasına izin vermiştir ve çok az miktarda organik çözücü (0.85 mL etanol) kullanılması açısından yeşil çözücü sistemi olarak ifade edilmiştir. HTLC–MS/MS yöntemi ile içeceklerdeki tatlandırıcılarınn analizi sonucu; daha az organik çözücü kullanıldığından yeşil ve kullanışlı bir yöntem olması yönüyle bu yöntemin klasik LC–MS tekniğine alternatif olduğunu ifade etmişlerdir [23].

Wu ve arkadaşları asesülfam ve sükraloz katkı maddelerini evsel atıksu kirlilik göstergesi olarak belirlemişlerdir. Ultra yüksek performanslı sıvı kromatografi-ikili kütle spektrometrisi (UHPLC-MS/MS) yönteminin katkı maddelerinin tayin sınırını klasik sıvı koromatografi-kütle spektroskopisi yöntemine göre azalttığını göstermişlerdir. (asesülfam için 0.2 ng/L ve sükraloz için 5 ng/L). Sonuç olarak kuyu suyundan asesülfam ve sükralozun doğrudan analizi için bir yöntem geliştirmiş ve bunu deneysel sonuçlarla göstermişlerdir. Yöntem atıksu kirliliğinin rutin olarak izlenmesi açısından basit, duyarlı ve güvenilirdir [24].

Chang ve arkadaşları çeşitli gıdalardan 10 tatlandırıcının (aspartam, asesülfam potasyum, aspartam, siklamat, Dulcin, glisirizik asit, neotam, neohesperidin dihidrokalkon, sakarin, sükraloz, steviosid) eş zamanlı tanımlanması için sıvı kromatografisi-ikili kütle spektrometrisi (LC-MS / MS) tekniğini geliştirmişlerdir. LC-MS / MS metodu; duyarlılık, yüksek verimlilik ve tek bir çalışma ile daha fazla tatlandırıcı

analizi açısından geleneksel yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemiyle karşılaştırıldığında daha iyi performans göstermiştir [25].

Bruno ve arkadaşları alkolsüz içeceklerdeki sakkarinin tayini için kullanılan metodlardan birisi olan ultraviyole belirleyici yüksek basınçlı sıvı kromatografisi tekniğini, tanımlama ve miktar tayini için kullanmışlardır fakat UV spektrumlarında karşılaşılan problemlere istinaden HPLC-FLD (yüksek basınçlı sıvı kromatografi-floresans belirleyici) yöntemini geliştirmişlerdir. Yöntem verimli, hızlı, kesin ve seçici olup hedef analite karşı uygun bir hassasiyet göstermiştir [26].

Sun ve arkadaşları alkolsüz diet içeceklerinde (cola vb.) aspartam ve bozunma ürünlerinin aynı anda analizi için HPLC-MS/MS yöntemini geliştirmişlerdir. Yöntem klasik yöntemlere göre daha duyarlı (tayin sınırı 0.16–5.8 mg/L olarak belirlenmiştir) ve hızlı olup matris girişimlerini ortadan kaldırma yeteneğine sahiptir [27].

Grembecka ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ile çeşitli alkolsüz içeceklerde ve diyet ürünlerinde aspartam, asesulfam-K, sakkarin, sitrik asit ve sodyum benzoat miktarlarının aynı anda tayini için yeni bir metot geliştirilmiştir. Analitler HPLC–CAD–UV/DAD ile analiz edilmiştir. Meşrubatların 100mL'si ortalama olarak 5.50 mg aspartam, 6.38 mg sakkarin, 8.94 mg asesulfam-K, 9.05 mg sodyum benzoat ve 111 mg sitrik asit içermektedir. Sitrik asit analiz edilen bütün tatlandırıcı örneklerinde en bol bulunan katkı maddesi olarak kabul edilmiştir [28].

Değişik yiyecek ve içeceklerdeki asesülfam-K, siklamat, sodyum sakarin, aspartam, alitam, neotam, sukraloz, dusin ve neohesperidin dihidroalkan'ın birarada tayini için H.Matsumoto ve arkadaşları HPLC-MS/MS metodunu önermişlerdir. Örnekler pH 4.5 tampon çözeltisi ile ekstrakte edilmiştir. Örnek seçici reaksiyon monitör modunda (SRM) MS/MS metodu kullanılarak termo hipersil BPS C18 (250 X3 mm,5-µm) kolonunda ayrıştırılmıştır. Kolerasyon değeri > 0,99 dir. Geri kazanım 90.0-107.5 % aralığındadır [29].

Altı sentetik gıda katkı maddesinin (aspartam, asesülfam-K, benzoik asit, sodyum sakarin, tartrazin ve sunset yellow) başarılı şekilde ayrılabilmesi için ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntem geliştirilmiştir. Yan Q. ve arkadaşları bu ayrılmayı sağlayabilmek için oda şartlarında metanol ve 0.02 mol/L amonyum asetat

(pH 6.0) (30;70,v/v) içeren mobil faz ile Eclipse XDB-C18 kolonunu kullanmışlardır. Başarılı ayırma koşulları 10 dakika içinde tüm bileşikler için optimize edilmiş gradient elüsyonu kullanılarak elde edilmiştir. Geri kazanım değerleri %90- % 109,87 arasındadır. Önerilen bu yöntem içecek numunelerine başarılı bir şekilde uygulanmıştır [30].

Meşrubatlardaki asesülfame K, sakkarin, aspartam gibi bazı yapay tatlandırıcıların ve kafein içeriğinin belirlenmesine yönelik organik çözücüler kullanmadan basit, yeşil HPLC tayin yöntemi geliştirilmiştir. C18 kolunu üzerinde hareketli faz olarak etanol-fosfat tampon kullanılmıştır (0.8 mL/dk) ve optimum ayırma 15 dk içinde elde edilmiştir. Asesülfam K, sakkarin, aspartam, ve kafein sırasıyla 225, 217, 217, ve 280 nm'de tayin edilmiştir. Her bir analit için korrelasyon katsayısı ≥0.999 olarak seçilmiştir. Tayin sınırları asesülfam K, sakkarin, kafein ve aspartam için sırasıyla 0.024 mg/L, 0.011 mg/L, 0.024 mg/L, ve 0.014 mg/L olarak belirlenmiştir. Geliştirilen analiz yöntemi 56 içecek örneğine uygulanmış ve bilinen metotlar ile karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak geliştirilen HPLC analiz yöntemi geleneksel analiz yöntemine göre daha doğru sonuçlar vermiştir [31].

Ma ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada kullanılan yöntem ile 20 sentetik gıda katkı maddesinin (3 tatlandırıcı, 7 renklendirici, 9 sentetik koruyucu ve kafein) HPLC- PDA ile aynı anda tayini üzerine geliştirilmiştir. Yöntem gıda katkı maddelerinin tayini için çok düşük konsantrasyonlarda çalışma imkanı sunar (0.005–0.150 mg/mL). Yöntemin uygulanabilirliği çeşitli gıda maddeleri içerisinde bulunan gıda katkı maddelerinin belirlenmesi ile doğrulanmıştır [32].

Mohd ve arkadaşları tablet tatlandırıcılardaki aspartamın analizi için basit ve yeni yüksek perfomanslı sıvı kromotografi yöntemi geliştirmişlerdir. Bu yöntem ile 332 nm'de aspartamın 2,4-dinitro floro benzen türevinin analizi amaçlanmıştır. Ayırma işlemi hekzan: etil asetat (60;40,v/v) mobil fazı kullanılarak silika kolon üzerinde gerçekleştirilmiştir (pH, % 1 asetik asit kullanılarak 4,5'a ayarlanmıştır). LOD ve LOQ değerleri beklenildiği gibi 1 ng ve 4 ng olarak bulunmuştur. Lineer konsantrasyon aralığı 20-180 ng'dır ve bu yöntem ile geri kazanım değerleri %97 den daha iyi sonuç vermiştir [33].

M.Grembecka ve arkadaşları çeşitli diyet takviyeleri ve alkolsüz içeceklerdeki kafein ve aspartamın aynı anda tayini için kromotografik bir yöntem sunmuştur. Corona charge analit dedektör ile analitler çift dedektörlü bir HPLC sisteminde (Corona CAD-UV DAD) tayin edilmiştir. Yöntem de 5 mikron çapında partiküllerle doldurulmuş Termo – Hypersil altın C18 kolonu ve asetonitril-su (15/85%v/v) mobil fazı 1ml/dakika bir akış hızında kullanılmıştır. HPLC-CAD-UV-DAD yöntemi diyet ürünlerinde ve alkolsüz içeceklerdeki kafein ve aspartamın kantitatif ve kalitatif tayini için uygundur. Belirlenen konsantrasyon limit aralığı 0,25 -0,75 mg/mL'dir. Dedeksiyon limiti kafein için 62 aspartam için 43 ng/ml'dir. Her bir analitin kalibrasyon eğrisinde korelasyon değeri 0.9999 olup lineerdir. Bu teknik akolsüz içecekler ve diyet takviyelerinde katkı maddelerin hızlı bir tarama tekniği olarak kullanılması için uygundur [34].

Yapılan diğer bir çalışmada, içeceklerde ve özel besleyici ürünlerde bulunan aspartam, asesülfam K, sodyum sakkarin, sodyum siklamat yapay tatlandırıcılarının tanımlanması ve ayrılması için yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemi (HPLC-DAD) kullanılmıştır. İlk metot; C18 kolonu üzerinde hareketli faz olarak asetonitril ve fosfat tamponunun izokratik elüsyonu ile aspartam, asesülfam K ve sodyum sakkarin tatlandırıcılarının ayrılmasını kapsamaktadır. İkinci metot ise; C18 kolonu üzerinde hareketli faz olarak metanol ve su ile sodyum siklamatın ayrılmasında kullanılmıştır.Uygun koşullar altında her iki metot doğrusallık, kesinlik, geri kazanım gibi iyi analitik performans göstermiştir. Bu metodlar alkolsüz içeceklere ve özel besleyici ürünlere başarıyla uygulanmıştır [35].

Kritsunankul ve arkadaşları HPLC yöntemiyle bazı gıda katkı maddelerinin aynı anda belirlenmesi için diyaliz bağlı akış enjeksiyon sistemini örneklerin ön işlemden geçmeleri için geliştirmiştir (FID-HPLC-UV). 14 dakikalık analiz süresinde beş ayrı katkı maddesinin elüsyonu sırasıyla asesülfam K, sakkarin, kafein, benzoik asit, sorbik asit şeklinde belirlenmiştir. Geliştirilen sistem örnek ön muamele işlemi için otomasyonu açısından yüksek derecede avantaj sağlamıştır. Örnek seyreltme ve ayırma özelliği, pahalı HPLC kolonunun ömrünü uzatmak için iyi bir örnek temizleyici olması, kısa analiz süresi ve kimyasal madde ve malzemelerin daha az tüketimi açısından yöntemin üstünlüğünü göstermektedir. Önerilen sistem alkolsüz diet içecekleri ve diğer sıvı

yiyeceklerde başarıyla denenmiş ve sonuçlar sistemin gerçek örneklere uygulanabileceğini göstermiştir [36].

Cheng ve arkadaşları tarafından Coca-Cola Zero içeceğinde aspartam ve onun hidroliz ürünlerinin aynı anda analizi için iki boyutlu yenilikçi yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemi geliştirilmiştir. Geliştirilen 2-D HPLC sistemi yüksek duyarlılık, doğruluk ve kesinlik göstermiştir [37].

Son yıllarda kafein ve benzoik asit birçok içecekte bulunmaktadır. Diyet içeceklerde kullanılan düşük kalorili yapay tatlandırıcılar şekerin yerini almıştır. İlk bulunan yapay tatlandırıcın sakkarin olmasına rağmen aspartamın kullanımı daha yaygındır. Cola zero, Diet Cola, Nestle Diet Tea bunları içeren örneklerdendir. M.Ree ve E.Stoa karışım standartları kullanarak geliştirdikleri HPLC yöntemini bu tatlandırıcıların içeceklerde bulunan konsantrasyonlarının belirlenmesinde kullanmışlardır [38].

Gıdalarda aynı anda bulunduğu tespit edilen dokuz farklı yapay tatlandırıcıyı basit ve hızlı şekilde ayırabilmek için HPLC-MS/MS metodu geliştirilmiştir. Örnekler pH 4.5 çözeltisi ile ekstrakte ve seçici reaksiyon görüntüleme modda (SRM) MS/MS yöntemi ile termo hipersil BPS C18 (250X3MM,5 µm) kolonu kullanılarak analiz edilmiştir. Geri kazanım sonuçları %90-107,5 aralığındadır. LOD değerleri beklenildiği gibi 0,001-0,375 mg/ml, LOQ değerleri ise 0,003-1,125 mg/ml konsantrasyon aralığında bulunmuştur. Bu çalışmanın amacı çoklu tatlandırıcıların çeşitli yiyeceklerde tayin edilebilecegi bilgisinin verilmesidir [39].

Perkin Elmer firmasının HPLC ve UHPLC metodlarını karşılaştırmak için, kola içecekleri ve tatlandırıcılardan asesülfam K, aspartam, sakkarin, kafein ve potasyum benzoat katkı maddelerinin deneysel analiz çalışmasının sonucunda; UHPLC yöntemi ile geçiş süresinin %70'e kadar, çözücü kullanımının %80'e kadar azaltılabildiği görülmüştür. Öncelikle kullanılmaya alışılagelmiş C18 HPLC kolonu (250 x 4.6 mm; 5 µm parçacık boyutuna sahip) kullanılarak yapılan klasik metotla optimum akış hızı 1.0 mL/dakika olarak ayarlanarak ölçümler alınmıştır ve 12 dakika içerisinde bütün pikler birbirinden ayrılmıştır. Daha sonra ölçümlerin UHPLC için uygun olan daha küçük C18 kolonu (100 x 2.1 mm, 3 µm parçacık boyutuna sahip) kullanılarak yapılmasıyla geçiş süresinin önemli ölçüde düştüğü görülmüştür (30 ˚C'ta 12 dakikadan yaklaşık 3.5 dakikaya kadar).

Dahası, akış hızı 1.0 mL/dakika'dan 0.7 mL/dakika'ya kadar düşürülmüştür. Böylelikle, UHPLC metotu sayesinde program deneme süresi %70 ve çözücü kullanımı %80 oranında azaltılmıştır. Tüm bu sonuçlar sadece pahalı HPLC saflıkta çözücü kullanımı açısından önemli olmayıp aynı zamanda atık olarak çözücünün daha az ortaya çıkması açısından da önemlidir [40].

A.Zygler ve arkadaşları yüksek duyarlıklı tatlandırıcıların tayini için (SPE) ekstraksiyonunu içeren HPLC-MS spektroskopisini gerçekleştirmişlerdir. Örnekler asesülfam-K, aspartam, alitam, siklamat, dulcin, neohesperidin dihidroalkan, sakarin, ve sükraloz içermektedir. Numuneler formik asit, N,N-diizopropiletilamin ve pH 4,5 tamponu kullanarak ultrasonik banyoda ekstraksiyon işleminden ve sonra Strata-x 3µm polimerik SPE kolonu kullanılarak temizlenmiştir. Ayrışma C18 kolonunda gradient elüsyon yöntemi ile gerçekleşmiştir. Geri kazanım değerleri tüm tatlandırıcılar için 84,2 - 106,7 % aralığında bulunmuştur. Bu metot ile çeşitli içeceklerde, yoğurt ve balık ürünlerinde rutin kalite kontrol analizleri yapılabilir [41].

George ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, HPLC-UV dedektör kullanılarak C18 kolonu üzerinde Lassi içeceğindeki aspartam, asesülfam-K ve sakkarin tatlandırıcılarının eş zamanlı olarak ayrıştırılması sağlanmıştır [42].

Diğer bir araştırmada, HPLC/ESI-MS yöntemi kullanılarak farklı yiyeceklerden aspartam, sakkarin, asesülfam-K, neotam, sukraloz, siklamat, alitam ve doğal tatlandırıcı olan steviosid eş zamanlı olarak tayin edilmiştir. 13 farklı içecek örneğinde ölçülmüş ve 11 içecekte sodyum siklamat, 2 örnekte sakarin tatlandırıcılarına rastlanmıştır. 11 meyve şekerlemesi örneğinin analizi sonucunda ise 3 örnekte sodyum siklamat, 3 örnekte sukraloz, 2 örnekte asesülfam-K, 1 örnekte sakkarin, 1 örnekte siklamat ve sukraloz ve 1 örnekte ise besleyici olmayan tatlandırıcılar tayin edilmiştir. Kek örnekleri için; 2 örnekte sukraloz, 5 örnekte neotam ve 1 örnekte ise sodyum siklamat tayin edilmiştir. Gerçek örneklerin (Çin marketlerinde bulunan) analitik sonuçları göz önüne alındığında sodyum siklamat tatlandırıcısının içecekler başta olmak üzere yiyeceklerde kullanılan temel tatlandırı olduğu ifade edilmiştir [43].

Zygler ve arkadaşları gıdalarda gıda katkı maddesi olarak kullanılan çeşitli yapay tatlandırıcıların, eş zamanlı olarak tek tek ayrılmasına yönelik kullanılan analitik

metodların karşılaştırılması üzerinde tartışmışlardır. HPLC'nin çoklu analit kapasitesi, tatlandırıcıların fizikokimyasal özellikleriyle olan uyumluluğu ve yüksek hassasiyet ve dayanıklılığı özellikleriyle tercih edilen bir yöntem olduğunu ifade edip alnernatif yöntemler ile karşılaştırmışlardır [44].

Ji C ve arkadaşları geliştirdikleri yeni bir metod olan ulta performans sıvı kromotografisi (UPLC) ile sodyum sakkarin, aspartam ve neotamın aynı anda analizinin mümkün olduğunu belirtmişlerdir. Yöntemde 220'nm de tekli enjeksiyon uygulanmış ve gradient programı ile ACQUITY UPLC BEH C18 kolonu kullanılmıştır. Örneklerdeki geri kazanım değerleri % 80.5 - 95.2 aralığındadır. Yöntem toz tablet tatlandırıcılarda ve tatlandıcı içeren içeceklerde başarıyla cevap vermiştir [45].

Trandafir ve arkadaşları kola içeceklerindeki asesülfam K, sakarin, aspartam, kafein ve benzoik asitin tayini için basit, seçici ve hızlı bir yöntem olan terz faz HPLC yöntemini geliştirmişlerdir. Çalışmada DS Hipersil C18,5 µm kolonu kullanılmıştır. Analiz asesülfam K için λ=227 nm, sakarin için λ=265 nm, aspartam, kafein ve benzoik asit için λ=217 nm'de diode array dedektörle ve 40 dakikadan daha az sürede gerçekleşmiştir. Kromotografik ayrım için potasyum dihidrojen orta fosfat tamponu (pH 4,3) ve asetonitril (88:12, v/v) karışımı mobil faz olarak kullanılmıştır. Yöntem 0-100 mg/L konsantrasyon aralığında lineerdir. Metodun validasyon parametreleri sonuçların analitik parametrelere uygun olduğunu göstermiştir [46].

İçecekler, kekler ve konserve meyvelerinde neotame tayini üzerine HPLC ile geliştirilen bir yöntemde; iki tane C18 kolonu üzerinde altı yollu vana ile kolon kilitleme tekniği kullanılarak örnek çözeltileri ayrılmıştır. UV tayini 210 nm' de gerçekleştirilmiştir. Yöntem basit, hızlı, hassas ve yeniden üretilebilir olması yönüyle ilgi çekicidir. Bağıl standart sapma değeri 5% (n=5) ' ten küçüktür. Neotane miktarı 5–100 mg/ml aralığında ve r^2= 0.999 olarak belirlenmiştir [47].

2.5 Kromatografik Yöntemler

Kromatografi birbirine fiziksel ve kimyasal özellikleri bakımından benzeyen maddelerin, karışımların, birbirinden ayrılmasını, tanınmasını ve tayinini sağlayan, birçok yöntemi kapsayan yöntemlerin genel adıdır. Yüzlerce maddenin karışımı bile kromatografi

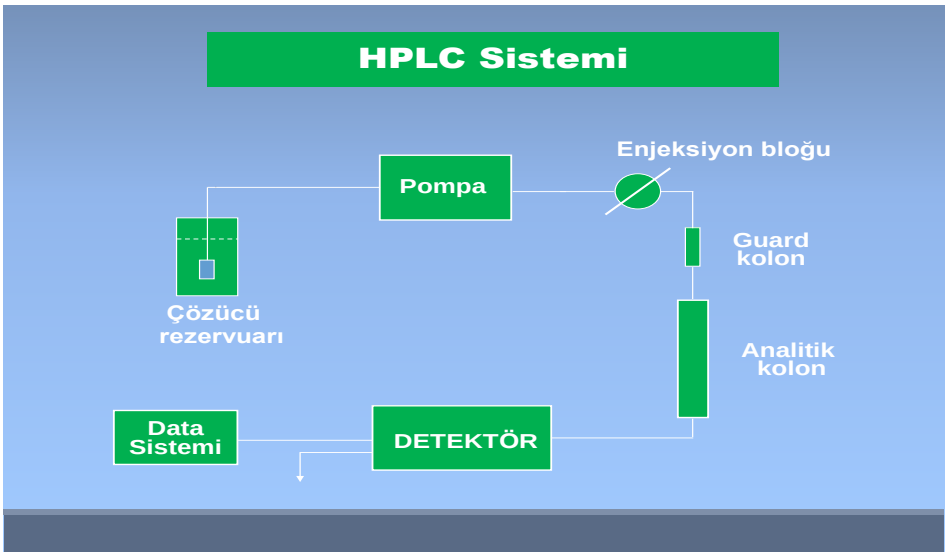
yöntemiyle analiz edilebilir. Kromatografi terimi ilk olarak Mikhail Tswett tarafından 1906 yılında kullanılmıştır. Daha sonraları analitik çalışmaların birçoğunda kromatografi yer almıştır [48].

2.5.1 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 (High Performance Liquid Chromatography, 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 [49].

2.5.1.1 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 2.6'da HPLC sistemi şematik olarak sunulmaktadır [49].



Şekil 2. 6 Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) sisteminin şematik gösterimi

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 vizikoziteli, kimyasal açıdan inert ve örneği çözebilecek kimyasal yapıda olması gerekmektedir [49].

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.

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 [49].

2.5.1.2 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 [49].

2.4.2 UHPLC (Ultra Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi)

Gıda katkı maddeleri, gıda üretimi, ambalajlanması veya saklanması aşamalarında gıdanın kıvamını artırmak, tatlandırmak, besin değerini artırmak, renk vermek, raf ömrünü uzatmak gibi amaçlarla gıdalarda kullanılan maddeler veya madde karışımlarıdır. Günümüzde gıda katkılarının kullanım izinleri ve kullanım oranları yasal

yönetmeliklere göre düzenlenmekte ve gıda üreticileri, resmi kurumlar ve özel gıda laboratuvarları gıda katkı analizleri için analitik metodlara ihtiyaç duymaktadır. Söz konusu analitik metodların hızlı sonuç veriyor olması ise günden güne daha da ilgi çeken bir konu haline gelmiştir. Yüksek hızlı HPLC'nin (UFLC) amacı laboratuvarda analizlerin verimliliği artırmaktır. Kullanıcılar için ise HPLC'nin hızlı sonuç vermesinin yanı sıra elde edilen analitik verilerin güvenilirliğinin yüksek olması birinci derecede önemlidir. Genel beklenti elde edilen sonuçlarının en az konvansiyonel HPLC kadar güvenilir olması yönündedir. Örnek olarak, rezolüsyon on binlerce analitik çalışmadan sonra bile mükemmel olmalı, küçük hacimli numune enjeksiyonu için zaman ve alan tekrarlana bilirliği mükemmel olmalı, sık parça değişimi gerektirmemeli ve cihaz kararlı bir şekilde çalışmalıdır. Uygun parçacık büyüklüğündeki kolon dolgu maddesi ile kolon uzunluğu arasındaki denge kolon performansını artıran en önemli etkendir. Gerçek yüksek çözünürlüklü analiz için karşılanması gereken bazı koşullar mevcuttur. Artan kolon basıncı ve azalan parçacık çapı arasındaki denge noktasının bulunması, basınca dayanıklı bir sistemin tasarlanması, yüksek hassasiyetli ve dinamik aralığı geniş bir detektör kullanılması ve akış yolunun minimum difüzyon sağlayacak şekilde optimize edilmesi bu koşullar arasındadır. Teknolojik olanaklar ve bilgi birikimi sayesinde geliştirilen yüksek basınca dayanıklı UFLC XR sistemleri konvansiyonel akışkan kromatografiye göre 10 kat daha hızlı (analiz süresindeki kısalma analitik koşullara göre değişiklik gösterebilir) sonuç vermekte iken yüksek rezolüsyon değerleri de korunmaktadır. Analiz hızı yükselip alıkonma zamanı düşerken, ayırım verimliliği korunarak konvansiyonel HPLC'de elde edilen bileşenlerin aynısı elde edilebilmektedir. Gıda laboratuvarlarındaki numune yoğunluğunun yüksek olması sebebiyle, gıda katkı maddeleri ile ilgili çok sayıda ultra hızlı likit kromatografi uygulaması bulunmakta ve geliştirilmeye devam edilmektedir [50].

Ultra performans sıvı kromatografi (UPLC) sistemleri, teknolojik ilerlemelerin etkisi ile performans, sistem optimizasyonu, detektör tasarımı ve veri işleme konularında ilerleme elde etmiştir. Birlikte ele alındığında, bu ilerlemeler kromatografi performansında bir gelişme yaratmıştır. Analitik ayırmanın bu yeni kategorisi temel ilkelerini yüksek basınçlı sıvı kromatorafisi (HPLC) ile aynı tutar iken hız, hassasiyet ve çözünürlük niteliklerini arttırmıştır. Bugünün ilaç endüstrisi, ürünlerinin ve analitik

laboratuar kalitesinin artırılması aynı zamanda maliyetin azaltılması ve ilaçların geliştirilme süresinin kısaltılması için yeni yollar aramaktadır. Hız, daha fazla sayıda analiz yapılmasını ve böylece numune ve laboratuar verimliliğini artırarak daha kısa sürede sonuca ulaşmayı sağlamaktadır. Tüm bunlar hızlı analizin dolayısıyla UPLC yardımıyla gerçekleşebilmektedir.

HPLC ile yapılan tipik bir miktar tayini analizinin UPLC'ye transferinin yapılması ile yüksek miktarda numune analiz edilebilmekte, verim arttırılmakta ve daha hassas sonuçlar elde edilebilmekte olup, UPLC ile yapılan analizlerdeki işletme maliyeti de HPLC ile yapılan analizlere göre büyük oranda avantaj sağlamaktadır.

2.4.3 UHPLC (Ultra Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi) ve HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi) Karşılaştırılması

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) 30 yıldan fazla süredir laboratuarlarda dünya çapında kullanılan ve bilinen bir yöntemdir. Ayırma tekniğinin geliştirilmesinden sorumlu malzemelerin gelişimi, ayırma etkisini sürekli geliştirmiştir. Bu gelişimin arkasında, çizgisel hız ve plaka yüksekliği arasındaki ilişkiyi tanımlayan van Deemter denklemi vardır. Van Deemter eşitliğine göre, parçacık boyutunu azaltmak ayırma etkinliğini arttırmaktadır [51], diğer yönden akış hızının artması ise verimi azaltıcı etki etmektedir. Ayrıca, kromatografik sistemlerde parçacık boyutu 2.5 µm'dan az olan analitik kolon kullanımında belirgin etkinlik artışı sağlanmakta ve akış hızı oranının arttırılması ise olumsuz bir etki göstermemektedir. Küçük parçacık boyutuna sahip analitik kolonlar kullanarak, hızlı ve yüksek pik kapasitesine sahip analizler yapabilmek için genişletilmiş limitlere ihtiyaç duyulmuştur ve bu ihtiyaca karşılık UPLC olarak adlandırılan sistemler yapılmıştır. Bu yeni teknoloji, bilinen kromatografik ilkeleri kullanarak, küçük parçacık çapına sahip (1.7 µm – 2.1 µm) analitik kolonlar ve arttırılmış hareketli faz akış oranları ile HPLC'ye göre yüksek hızda analiz imkanı, ayrıca yüksek derecede ayırma ve duyarlılık sağlamaktadır [52-53].

Kromatografi tekniğinde ayırma, en önemli parametredir ve tüm kromatografik gelişimler daha yüksek derecede ayırım sağlamak için yapılmıştır. Kromatografik teknikte kullanılan kolonlar, yüksek akış oranında işleyen ve yüksek miktarda solvent tüketimine sebep olduğundan laboratuarlar için maliyet arttırıcı niteliktedir.

Kromatografide sıcaklığın arttırılması, hareketli fazın viskozitesini azaltarak yüksek akış oranı sağlamakta ve kolon basıncını azaltıcı etki göstermektedir. Ancak, kolon malzemelerinin çok az bir bölümünün yüksek sıcaklıklarda stabil olması sebebiyle arttırılmış sıcaklıklarda rutin olarak çalışma yapılamamaktadır. Bu sebeplerden dolayı, performans arttırıcı en basit ve kabul edilebilir yöntem kolon dolgu maddelerinin parçacık boyutunu azaltmaktır. Kolon parçacık çapını ve kolon uzunluğunu orantılı olarak azaltmak ise ayırma verimini sağlarken analiz süresini ve sistem basıncını arttırmaktadır [54-55].

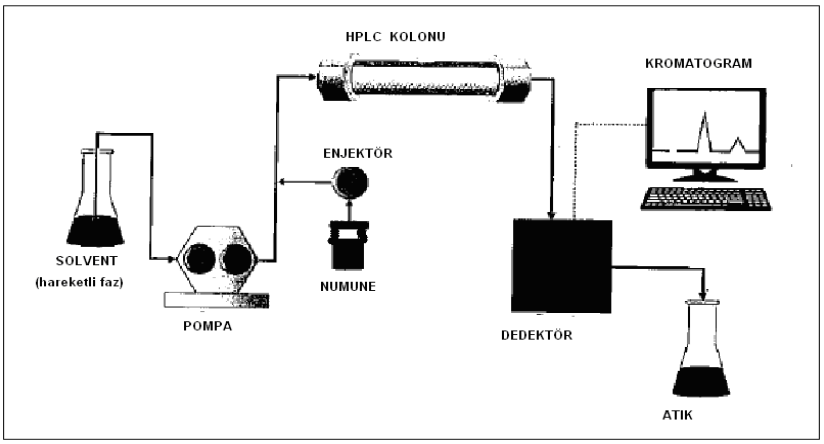
Çünkü oluşan basınç kolon dolgu maddesinin parçacık çapı ile ters orantılıdır ve hareketli fazın kullanılan küçük çaplı dolgu malzemesinde ilerlemesi için daha yüksek basınç ile pompalanmasını gerektirmektedir ve bunu da kullanılmakta olan HPLC sistemleri sağlayamamaktadır [56].

Bu konuda, araştırma yapan laboratuvarlar gözenek içermeyen kolon dolgu malzemeleri kullanmayı önermiş fakat bu tür kolonların kullanımı yüksek sistem basıncına dayanıklı olmalarına rağmen yüksek miktarda numune analizleme kapasitesine sahip olmadıkları ve metot transferi çalışmalarında sınırlamalar getirdiği için farmasötik endüstrisi tarafından kabul görmemiştir [57].

UPLC, tüm teknolojik yenilikleri ve kromatografik temelleri kullanarak küçük parçacık boyutuna sahip kolonlar ile arttırılmış akış oranı ve basınç sağlayan, bu sayede yüksek hızda analizleme yeteneğine, ayırma ve duyarlılığa sahiptir. UPLC sistemleri, küçük parçacık boyutuna sahip kolonların kullanımına bağlı olarak da pompa, enjektör, detektör başta olmak üzere mühendislik açıdan da yenilenmiş yapılar içermektedir.

2.4.3.1. Kromatografik Verimi Etkileyen Faktörler

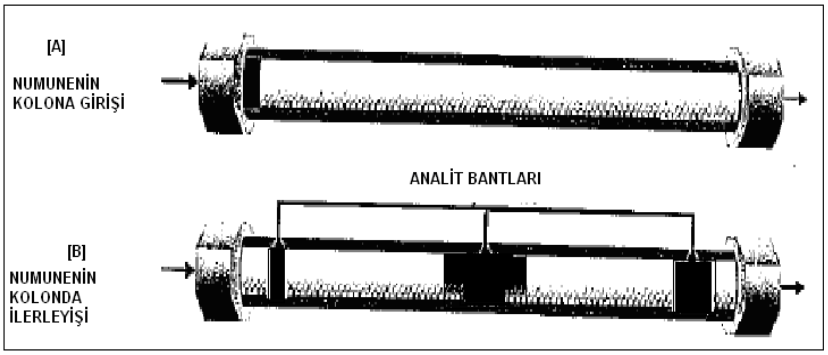
Analiz edilecek numune kromaografik sistemdeki hareketli fazın akış hattına enjekte edilir, bu aşamadan sonra analit hareketli faz tarafından analitik kolona taşınır ve burada analitik kolonun gözeneklerinde yol alıp detektöre ulaşarak tespit edilir. Şekil 2. 7 HPLC ve UPLC sistemlerinin genel tasarımı görülmektedir ve her iki sistemde de işleyiş aynıdır.



Şekil 2. 7 HPLC / UPLC sistemlerinin genel tasarımı [58]

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. Şekil 2. 8'de kolonun numuneye ilk girdiği an ve kolonda ilerlerken ayrıldığı bantlar görülmektedir. Her bir bant numune içindeki farklı bir moleküldür ve ayrılma kolon içinde gerçekleşir.

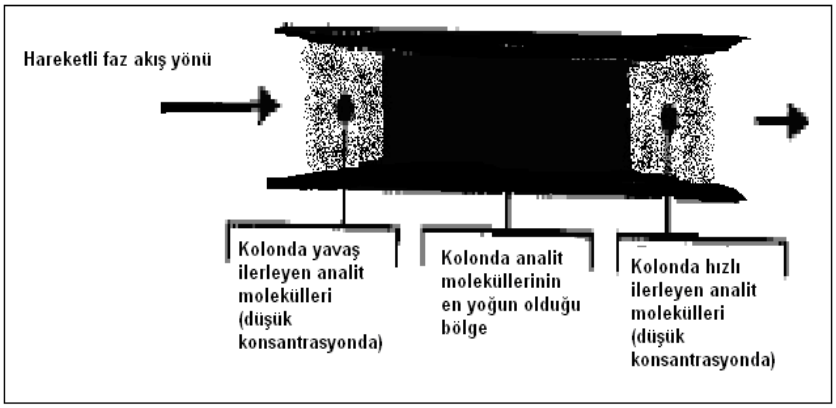


Şekil 2. 8 Analitin kolon içinde bantlara ayrılması [58]

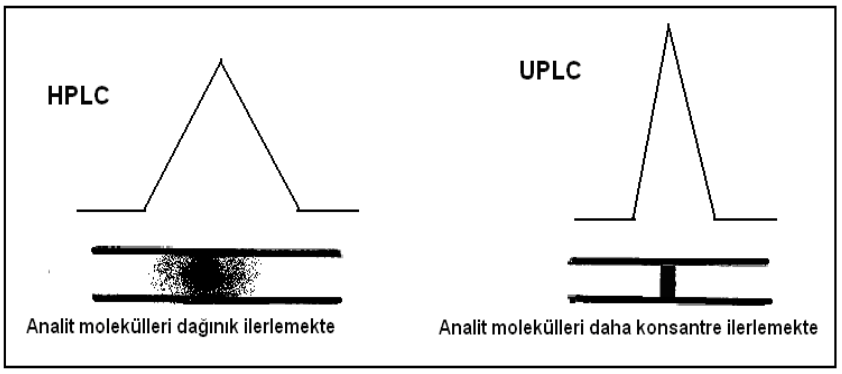
Analit detektöre ulaşmadan önce kromatografik sistemdeki farklı aşamalardan geçmekte ve bu da dedektör tarafından tespit edilme ve analite ait kromatogram bandının oluşmasını etkilemektedir. Analit bandının geniş olması kromatografik pikin genişliğinin artmasına sebep olmaktadır. Geniş bantlar ise pik 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.

Likit kromatografisinde, performansın arttırılması bant genişliğinin mümkün olduğunca küçük olması ve bunu sağlamak için de yalnızca kolon materyalinin değil, aynı zamanda kromatografik sisteminde modernize olması gerekmektedir. UPLC sistemleri bu ilkeden hareketle geliştirilmiş olup önemli derecede başarı kaydetmiştir. Şekil 2. 9 bir analitin kolon içindeki ilerleyişi sırasındaki dağılımını göstermektedir. Şekil 2. 10'da UPLC ve HPLC sistemlerinde kullanılan analitik kolonların analit moleküllerinin kolon içindeki dağılımına etkisini ve bu sistemlerde elde edilen kromatogramlar görülmektedir [58].



Şekil 2. 9 Analit bandındaki analit moleküllerinin konsantrasyon profili[58]

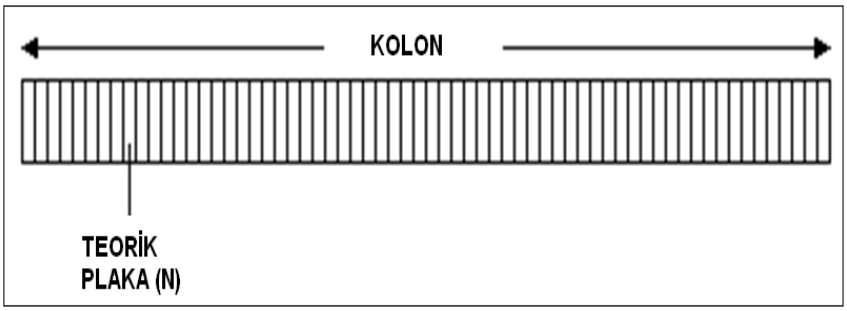


Şekil 2. 10 HPLC / UPLC sistemlerinin pik şekline etkisi [58]

Kolon Uzunluğu, Parçacık Boyutu ve Teorik Plaka Sayısının Etkisi

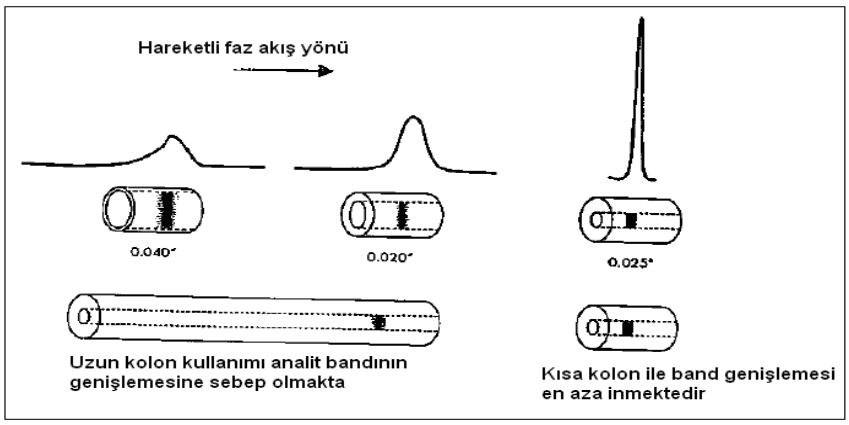
Küçük parçacık boyutu belirgin derecede HETP (Yükseklik Eşdeğer Teorik Plaka) azalışına neden olur ve bu da yüksek verimlilik sağlar. Teorik plaka (N) , kromatografik kolondaki teorik tabakalar olarak düşünülebilir. Numunenin ayrımı, hareketli ve sabit

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 (N) teriminin teorik olarak gösterimidir.



Şekil 2. 11 Teorik plakanın (N) teorik gösterimi [59]

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. UPLC sistemleri ile kullanılabilen küçük parçacık boyutuna sahip kolonlar sayesinde yüksek “N” değerine sahip dar ve keskin pikler elde edilebilmektedir [58].



Şekil 2. 12 Kolon parçacık boyutu ve uzunluğunun bant genişliğine etkisi [58]

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 [58].

Küçük Parçacık Boyutunun Ayrışmaya Etkisi

Van Deemter eşitliğine göre küçük parçacık sadece verimliliği değil aynı zamanda doğrusal hızı da arttırmakta bu da ayrılmayı ve analiz hızını arttırmaktadır. Temel ayrılma eşitliğinde, ayrılma (Rs) teorik plaka sayısının (N) karekökü ile orantılıdır [60].

$$Rs = \frac{\sqrt{N}}{4} \times \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \times \left(\frac{k}{k+1} \right)$$

Bu denklemde "α" seçicilik faktörü, "k" ise alıkonma faktörüdür. "N" teorik plaka sayısı parçacık büyüklüğü (dp) ile ters orantılıdır [52].

$$N \alpha \frac{1}{dp}$$

Parçacık büyüklüğü azaltılırsa ayrılma da artmış olacaktır. Ayrıca, "N" , pik genişliğinin (w) karesi ile de ters orantılıdır [60].

$$N \alpha \frac{1}{w^2}$$

Pik yüksekliği (H) de pik genişliği ile ters orantılıdır [60].

$$H \ \alpha \ \frac{1}{w}$$

Tüm bu veriler sonucunda dar ve keskin piklerin teorik plaka (N) artışını sağladığı ve buna bağlı olarak da ayrışma (Rs) değerini arttırdığı görülmektedir.

$$Rs = \frac{\sqrt{N}}{4} \times \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \times \left(\frac{k}{k+1} \right)$$

Formülde yer alan alıkonma faktörü "k" arttırılırsa da ayrışma değerinde artış gözlenebilmektedir. Fakat "k" değerinin artışı analiz süresinin uzamasına buna bağlı

olarak ta geniş ve keskin olmayan piklerin oluşmasın sebep olmaktadır [58]. Alıkonma değeri 2 < k < 10 olmalıdır.

$$k = \frac{t_r - t_o}{t_0}$$

Eşitlikteki 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

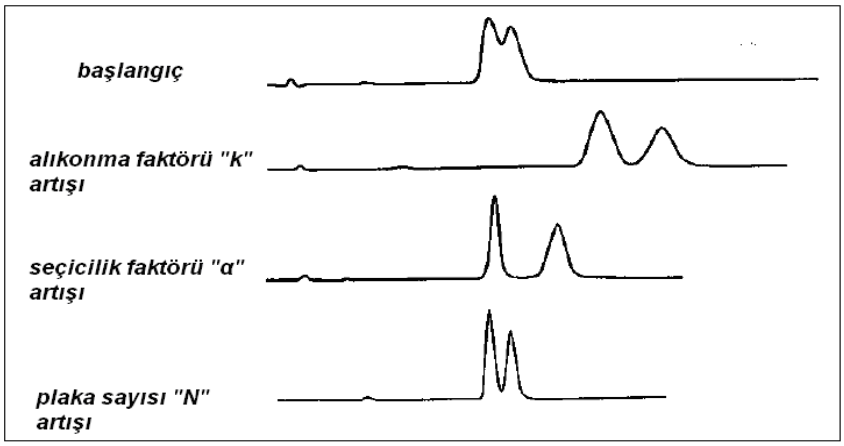
Hareketli fazın sabit faz ile etkileşimi

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 [58]. Sistem uygunluk değeri α > 1,2 olmalıdır.

$$\alpha = \frac{k_A}{k_B}$$

Seçicilik (α) ve alıkonma (k) faktörleri kimyasal etkenlerin değiştirilmesi ile sağlanmakta olup, ayrışma eşitliğinde fiziksel etkenlere bağlı olan tek faktör olan plaka sayısı "N" değerinin değiştirilmesi daha stabil ve doğru ayırım sağlamaktadır. Şekil 2. 13'de bu faktörlerin ayrışmaya etkisi görülmektedir. Daha önce açıklandığı gibi "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 [58].



Şekil 2. 13 Alıkonma, seçicilik ve plaka sayısı değişimlerinin ayrışmaya etkileri [58]

Ayrışma, Etkinlik ve Parçacık Boyutu Arasındaki İlişki

UPLC teknolojisi fiziksel(mekanik) etkileri maksimuma çıkartarak ve küçük parçacık boyutuna sahip analitik kolonlar kullanarak (1,7µm – 1,8µm) analit bant genişliğini minimum seviyeye indirmeyi ve böylece de yüksek verim elde etmeyi mümkün hale getirmiştir [61].

Temel ayrışma eşitliğinde, ayrışma teorik plaka sayısının “N” karekökü ile doğru orantılıdır.

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

Buna 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 [58], (√3 = 1,7).

$$N \propto \frac{1}{d_p} \qquad d_p \downarrow 3x \quad N \uparrow 3x \quad Rs \uparrow 1.7x$$

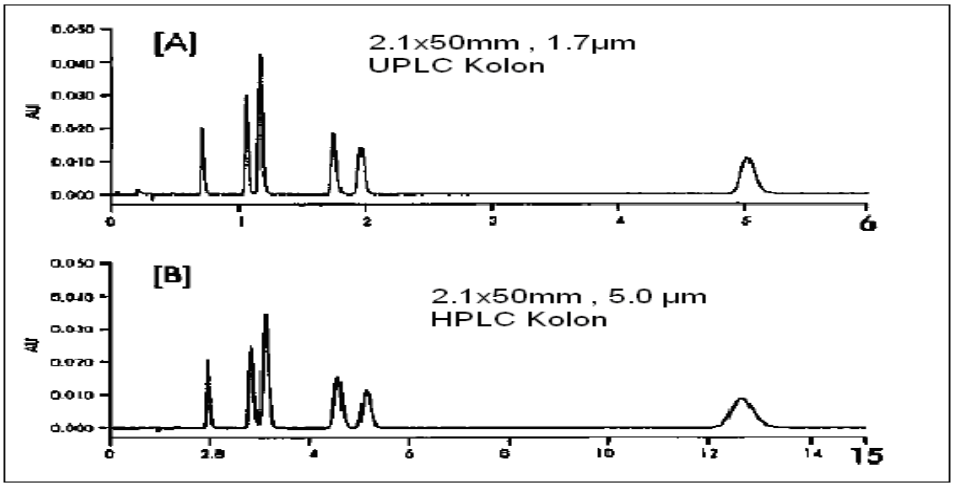
Küçük parçacık boyutu kullanıldığında, optimum akış hızı için de farklı değer oluşmaktadır. Optimum akış hızı parçacık boyutu ile ters orantılıdır. Parçacık boyutu 3

katı azaltıldığında optimum akış hızı (Fopt) da 3 katı artış gösterecektir ve bu da analiz süresinin (T) 3 kat azalmasına sebep olmaktadır [58].

$$F_{opt} \propto \frac{1}{d_p} \qquad d_p \downarrow 3x \quad Rs \uparrow 1.7x \quad T \downarrow 3x$$

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 [58]. 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 [58].

$$N \propto \frac{1}{w^2} \qquad N \uparrow 3x \quad w \downarrow 1.7x \quad \textit{pik yüksekliği} \uparrow 1.7x$$



Şekil 2. 14 Aynı özelliklerde farklı parçacık boyutuna sahip analitik kolonların UPLC sisteminde elde edilen kromatogramlarının karşılaştırılması [58]

2.4.3.2 Van Deemter Eğrileri

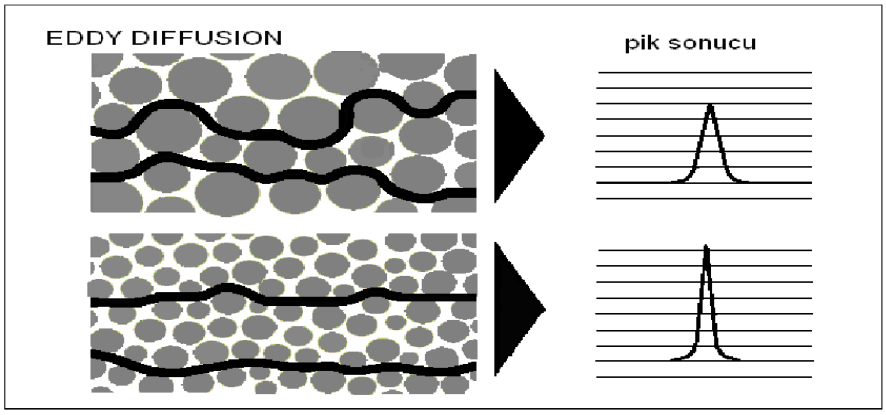
Pik genişliğini etkileyen temel faktör analit moleküllerinin kolonda ilerlerken gösterdiği dağılımdır. Pik genişliği ve analitin kolon içinde ilerlediği mesafe arasındaki ilişkiyi tanımlayan ifade yüksek eşdeğer teorik plaka (high equivalent theoretical plate) kısa

ifadesi ile “HETP” dir. HETP kolon performansının ölçüm değeridir. Aşağıdaki eşitliğe göre, plaka sayısının (N) yüksek olması HETP değerini azaltıcı etki göstermektedir, bu denklemde “L” kolon uzunluğunu ifade etmektedir [62].

$$HETP = \frac{L}{N}$$

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;

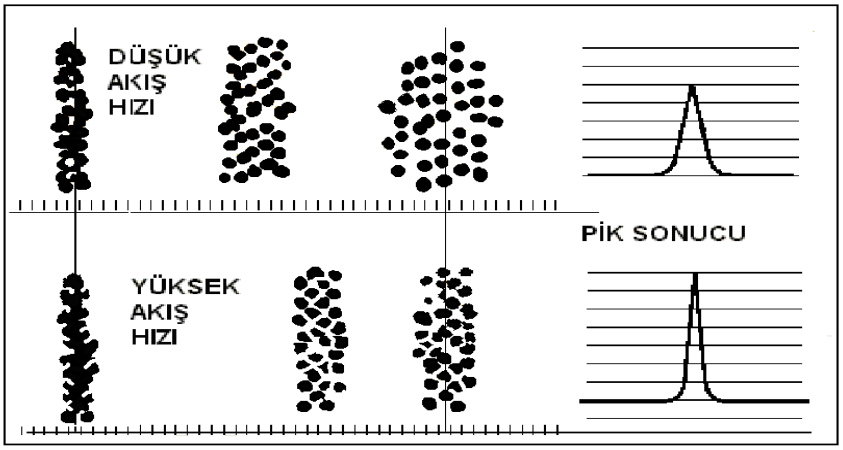
Eddy Difüzyon: Analit molekülünün kolon parçacıklarının etrafından veya yüzeyinden ilerlemesi olarak tanımlanır. Kolon dolgu maddesinin parçacık yapısına bağlı olarak hareketli fazın hızı bu parçacıkların sahip olduğu kanallar tarafından farklılaşmakta buna bağlı olarak ta hareketli faz ile taşınan analit molekülüde 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 [58-59].



Şekil 2. 15 Eddy Difüzyon [59]

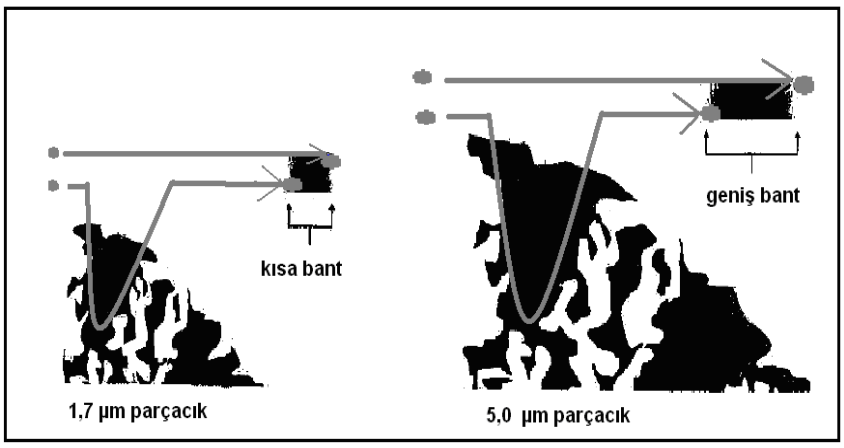
Longitudinal Difüzyon: Analit molekülünün hareketli faz tarafından doğrudan taşınmasıdır. Kolon dolgu maddesinin gözeneklerine girmeyen hareketli faz ile taşınan molekülün ilerleme şeklidir. Bu şekilde taşınma hareketli fazın difüzyon katsayısından ve hareketli fazın akış hızından etkilenir. Düşük akış 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 [58-59].

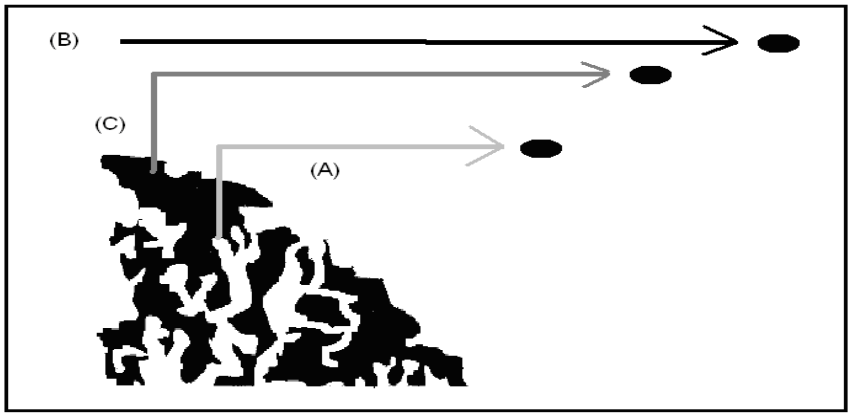


Şekil 2. 16 Longitudinal Difüzyon [59]

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 (C18, C8, 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 [58-59].



Şekil 2. 17 Bant genişliğinde, kütle transfer ve parçacık boyutu ilişkisi [58]



Şekil 2. 18 Analit molekülünün kolon içinde ilerleme tipleri [58]

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 [62]. 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 [62]. Bu faktörlere bağlı olarak HETP denklemi aşağıdaki *van Deemter* eşitliği ile düzenlenmektedir.

$$HETP = A + \frac{B}{u} + C \times u$$

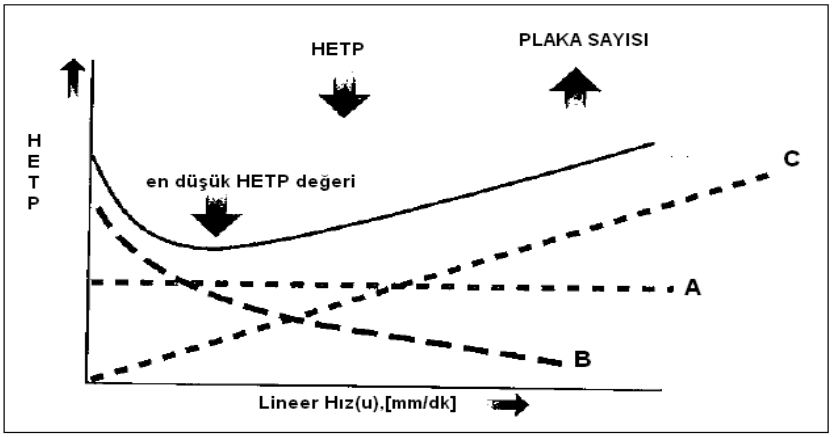
A: eddy diffusion

B: longitudinal difüzyon

u: lineer hız (linear velocity)

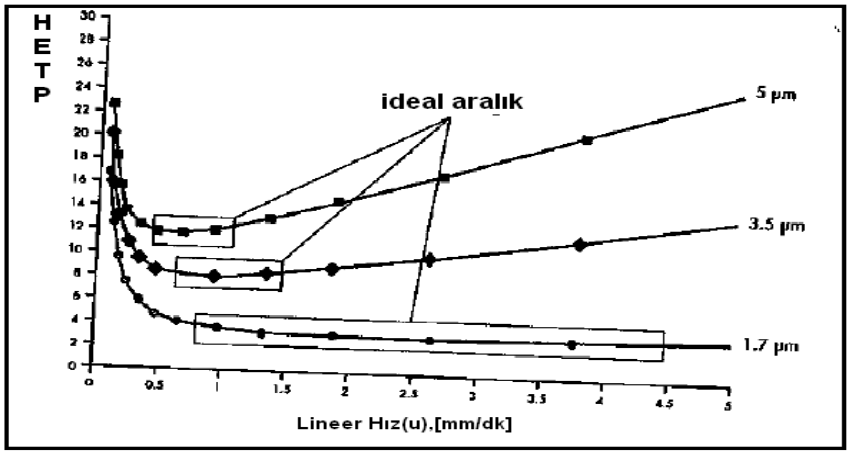
C: kütle transfer

Bu üç transfer terimi ile oluşturulan van Deemter eğrisinden en uygun HETP değeri için gereken teorik plaka sayısı (N) hesaplanabilmektedir. Şekil 2. 19 bu eğrileri ve en düşük HETP değerini veren noktayı göstermektedir.



Şekil 2. 19 Transfer terimlerinin van Deemter eşitliğindeki yerleri ve van Deemter eğrisi grafiği [58]

Van Deemter eğrisini kullanarak farklı parçacık büyüklüğüne sahip kolonlar için de en uygun HETP ve lineer akış değerleri de tespit edilebilmektedir.



Şekil 2. 20 Parçacık boyutu etkilerinin van Deemter eğrileri ile gösterimi [58]

2.4.3.3 Performansın Arttırılması

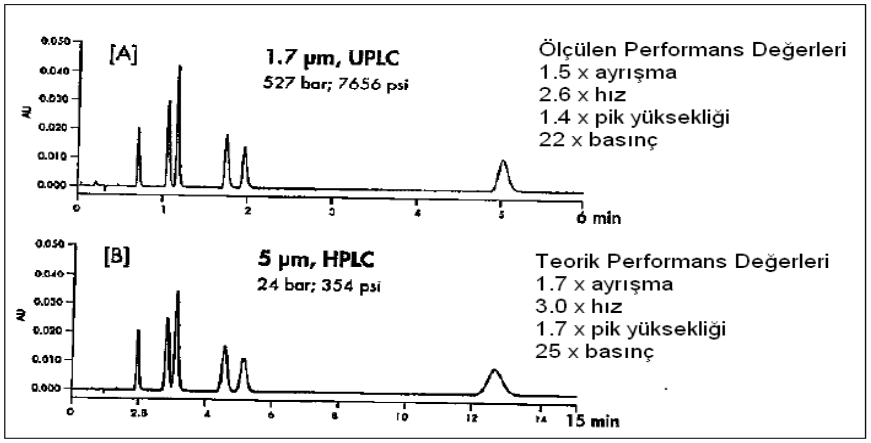
Sistem Basıncı

Analitik kolonlarda küçük boyutlu parçacıklar kullanılması analit pikinin bant genişliğini azaltmaktadır. UPLC teknolojisi, kromatografik performansın arttırılması için değiştirilen parametrelerden olan parçacık boyutunun küçültülmesi sonucunda ortaya çıkan yüksek basınç problemini ortadan kaldıran bir niteliğe sahiptir [62]. 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 [58]. 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 [58].

$$\Delta P_{opt} = \frac{1}{dp^3} \quad dp \downarrow 3x \text{ basınç} \uparrow 27x$$

Mevcut HPLC sistemlerindeki desteklenen basınç limitleri 350– 400 bar (5000- 6000 psi) arasındadır. HPLC sistemleri, küçük parçacık boyutlu kolon kullanımı sonucunda oluşan yüksek basıncı karşılayamaz olduğundan kolon uzunluğu ya da hareketli faz akış hızında kısıtlamalara gidilmek zorundadır. Eğer parçacık boyutu 5,0µm dan 1,7µm a indirilirse sistem basıncının 27 kat artış göstermesi beklenir [58-63]. Tüm teorik veriler ile hesap yapıldığında matematiksel olarak, sabit kolon uzunluğunda 22 kat basınç artışı meydana gelmektedir (Şekil 2. 21).

Kullanılan hiçbir HPLC sistemi bu basıncı karşılayamayacağı içinde küçük çaplı kolonların ticari olarak başarı elde etmesi UPLC sistemlerinin çıkışı ile mümkün olmuştur [63].

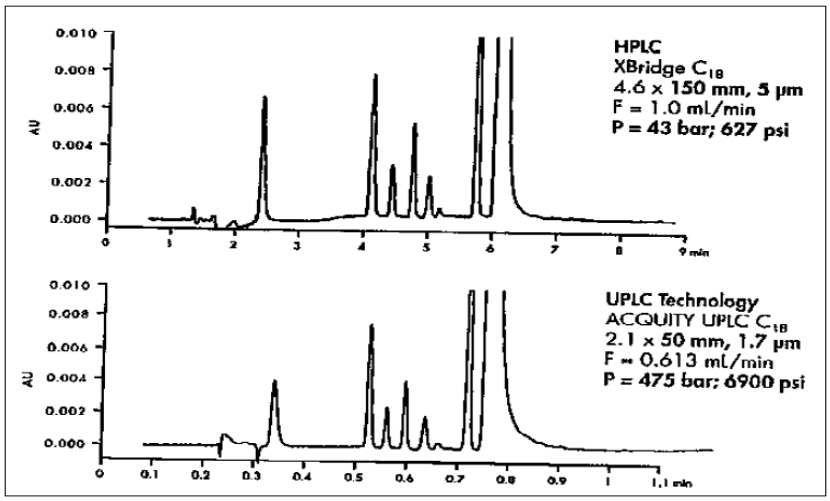


Şekil 2. 21 Parçacık boyutu ve optimum akış hızı değişiminin HPLC ve UPLC sistemlerinde basınç değerine etkisi (her iki sistem için: kolon uzunluğu 2.1x50 mm, akış hızı 0,6 ml/dk UPLC, 0,2 ml/dk HPLC) [58]

Eğer hem kolon uzunluğu hem de parçacık boyutu azaltılırsa bu durumda basınç artışı daha düşük olacaktır fakat bu değeri de HPLC sistemleri karşılayamamaktadır. Eğer kolon boyutu ve parçacık boyutu 3 katı kadar azaltılırsa basınç değeri 9 kat artış gösterecektir.

$$\Delta P_{opt} = \frac{1}{dp^2} \quad L \downarrow 3x \quad dp \downarrow 3x \quad \text{basınç} \uparrow 9x$$

$$P \propto L$$



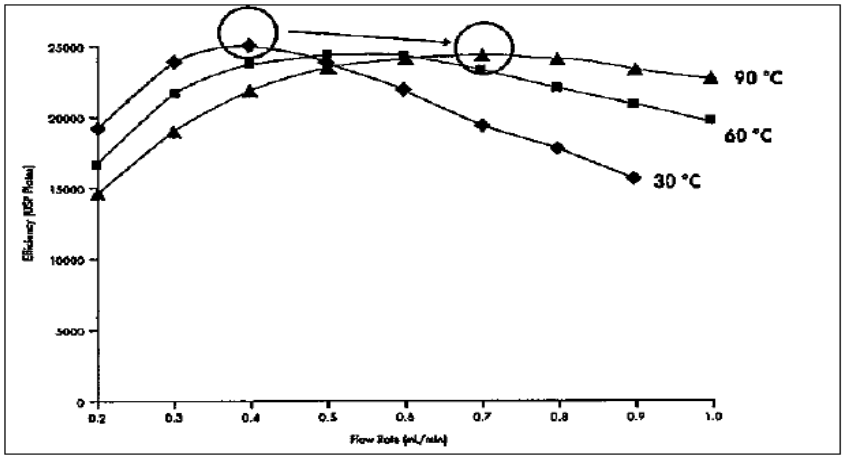
Şekil 2. 22 Parçacık boyutu, kolon uzunluğu ve akış hızının kolon basıncına ve analiz süresine etkisi [58]

HPLC sistemlerinin karşılayamayacağı 400 bar değerinden yüksek basınç oluşturan bu değişimler görülen olumlu etkilerine karşın UPLC sistemleri çıkana kadar

uygulanamamıştır. Yüksek basınç limitlerine sahip (1030 bar = 15000 psi) UPLC sistemleri ile küçük boyutlu parçacıklara sahip kolonlar ile çalışmak mümkün hale gelmiştir [56-63].

Sıcaklığın Yükseltilmesi

Genel bir görüş olarak, küçük parçacıklı kolon kullanımı sürtünme sebebiyle kolonda sıcaklık artışına sebep olmakta bu da plaka sayısında azalışa neden olmaktadır [56]. 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. Yüksek sıcaklıklar ile yapılan çalışmalarda teorik plaka sayısı (HETP) değerleri karşılaştırılmış ve etkinlik üzerinde belirgin bir değişim gösterdiği tespit edilmemiştir (Şekil 2. 23).



Şekil 2. 23 Kolon sıcaklığının etkinliğe etkisi (C18, 2,1X100mm 1,7µm kolon) [58]

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.

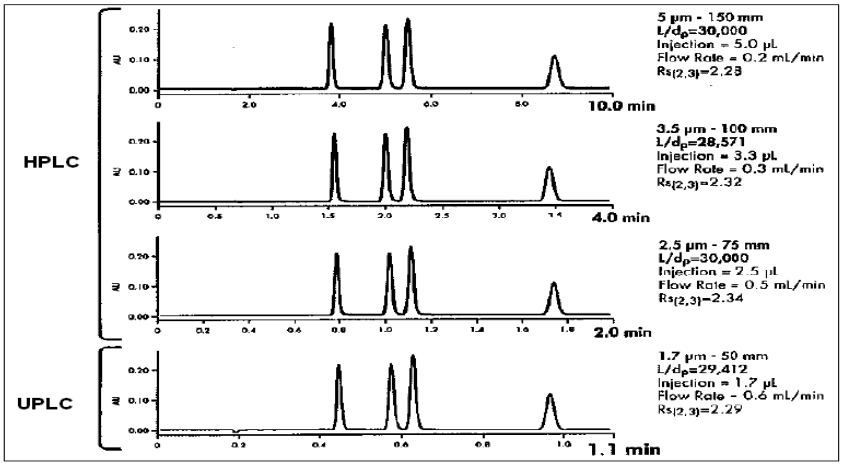
L / dp = 150000 / 5 = 30000

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 1.7µm'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. Şekil 2. 24'de görülen karşılaştırmalarda, L/dp oranı sabit tutularak analiz süresinin 10 kata kadar kısaltılabileceği görülmektedir [58].

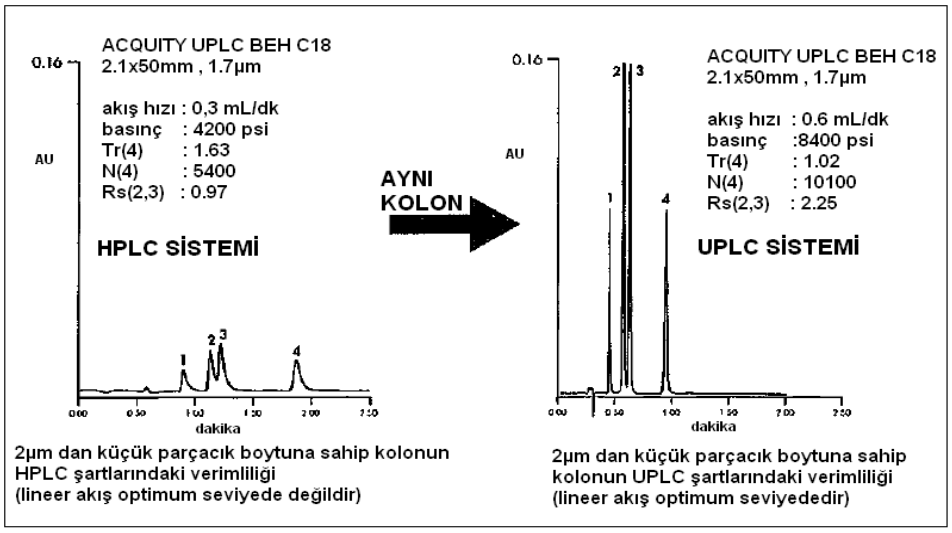


Şekil 2. 24 L/dp oranı sabit tutularak parçacık boyutu ve kolon uzunluğunun azaltılması ile elde edilen verim [58]

UPLC Teknolojisi ile Verimlilik Artışı

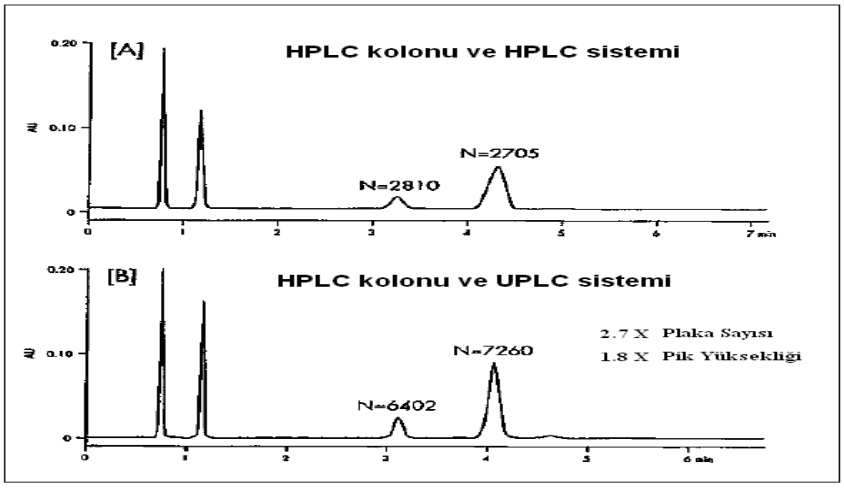
Kromatografik temellerin anlaşılması ve verimi arttırıcı yöndeki çalışmalar sonucunda, kolon parçacık boyutunu azaltmanın en etkili yöntem olduğu fakat bununda sistem basıncını büyük ölçüde arttırdığı görülmüştür. 2µm'dan küçük parçacık boyutuna sahip analitik kolonların sağlamış olduğu yüksek verimlilik bu özellikte kolonların kullanımını için HPLC sistemini oluşturan yapıların yeniden dizayn edilmesini sağlamış ve küçük

parçacık boyutuna sahip kolonlar ile yüksek basınç değerleri sağlayarak çalışabilen UPLC sistemleri oluşturulmuştur [64]. UPLC sistemlerinin sağladığı yüksek ayrışma ve verimlilik, cihaz ve kolon özelliklerinin birleşimi ile sağlanmaktadır. Bu sayede, küçük parçacık boyutuna sahip kolonların kullanımı ile sağlanan verim artmıştır [64]. Şekil 2.25'de, aynı kimyasal (hareketli faz, çözücü) ve kromatografik şartlar ile aynı analitik kolon (ACQUTIY UPLC BEH C18 2,1X50mm, 1,7µm) kullanılarak farklı akış hızlarında (HPLC sistemi için optimum akış hızı kullanılmıştır) elde edilen kromatogramları karşılaştırılmıştır. UPLC ile elde edilen kromatogramdaki belirgin etkinlik, ayrışma, pik keskinliği ve pik yüksekliği UPLC teknolojisinin bütünüyle uygun bir sistem dizaynına ve verimliliğe sahip olduğunu göstermektedir.



Şekil 2. 25 UPLC ve HPLC sistemlerinin karşılaştırılması [59]

HPLC sisteminde yapılan bir analizin, aynı şartlar ve kolon özellikleri ile UPLC sisteminde yapılması da verimliliği arttırmaktadır. Şekil 2.26'da HPLC sisteminde yapılan bir analizin hiçbir koşulu değiştirilmeden aynı şekilde UPLC sisteminde yapılması sonucunda elde edilen verim artışı görülmektedir [58].



Şekil 2. 26 UPLC sisteminin standart HPLC sistemi ile kullanımı ile elde edilen kromatogramlar (XBridge C18, 4,6x100mm, 5 µm analitik kolon, akış hızı: 2.0mL/dk, sıcaklık:45 C, hareketli faz: 73:23:3 su:metanol:asetik asit, dalga boyu:275 nm)[58]

HPLC'den UPLC'ye transfer edilen metot ve elde edilen verilerin karşılaştırılması sonucunda UPLC siteminin sağladığı avantajlar belirgin olarak görülmüştür. Kromatografik temeller değiştirilmeden hız, hassaslık ve ayrışma değerlerinde belirgin artış görülmüştür. Tüm bunlar HPLC'de yapılan bir metodun UPLC'ye taşınmasının ve validasyonunun kolaylıkla yapılabileceğini göstermiştir. Verim değerlerinin artışı HETP ve teorik plaka sayısı değerlerinin karşılaştırılması sonucunda belirgin biçimde görülebilmektedir. Bu noktadan bakıldığında, kompleks farmasötik formülasyonların belirlenmesinde büyük avantaj sağlamaktadır. UPLC'nin en belirgin avantajı analiz süresin azalması buna bağlı olarak da solvent tüketiminin azalışıdır ve literatürde solvent tüketiminin %80'e kadar azaldığı görülmüştür. Analiz süresinin ve buna bağlı olarak solvent tüketiminin azalması birçok laboratuar için maliyet azaltıcı bir etkendir. Ayrıca, literatürdeki metot geliştirme çalışmaları süresince yapılan birçok deneme UPLC ile kısa sürede tamamlanabilir hale gelmiş, HPLC sistemlerine göre yüksek oranda zaman ve solvent tasarufu gösterdiği görülmüştür. UPLC sisteminin sağladığı basınç değerleri ile 3,5 µm'dan küçük parçacık boyutuna sahip analitik kolonların kullanımını uygun hale gelmiştir. Literatürde, HPLC sistemi ile 150 mm uzunluk ve 5,0 µm parçacık boyutuna sahip analitik kolon ile 30 dakikada tamamlanan bir analiz metodu UPLC sistemi ile 50 mm uzunluk ve 1,7 µm parçacık boyutuna sahip analitik kolon ile 3 dakikada tamamlandığı görülmüştür [59]. Gelişen kolon teknolojisi ile azaltılmış uzunluk ve küçük parçacık boyutuna sahip analitik kolonların üretiminin, ticari olarak

elde edilebilirliğinin olanaklı hale gelmesi ve göstermiş olduğu avantajlar sebebiyle de bu tip kolonların kullanımı yaygınlaşmakta olup bu kolonların işleyebilmesini sağlayan, HPLC sistemlerine göre gelişmiş yapıdaki UPLC sistemlerin kullanımı gerekli hale gelmiştir. Tek olumsuzluk olarak, UPLC sistemindeki yüksek basıncın kolon ömrünü azaltıcı yönde etki edebileceği görülmüştür.

2.5 Validasyon (Yöntem Doğrulaması) [65]

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

Doğrulamanın yapılması gereken durumlar:

* Tanınma testleri

* Safsızlıkların miktar tayini

* Safsızlıkların limit testleri

* Bitmiş üründe etken maddenin (ya da seçilen başka bir maddenin) kantitatif analizi

Analitik yöntem parametreleri:

a)Özgünlük

b)Doğrusallık

c)Konsantrasyon aralığı

d)Doğruluk

e)Kesinlik

* Gün içinde tekrarlanabilirlik

* Günler arası tekrarlanabilirlik

* Laboratuvarlar arası tekrarlanabilirlik

f)Deteksiyon limiti(LOD)

g)Kantitatif tayin limiti(LOQ)

h)Sağlamlık(Robustness)

i)Sistem uygunluk testi

2.5.1 Özgünlük

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

a) Safsızlıklar ve bozunma ürünleri gibi girişim yapabilecek maddelerin standartları mevcutsa geliştirilen yöntemde bu maddelerin etken maddeden uygun bir ayrılma gücü değerleriyle ayrıldığı ispat edilmelidir.

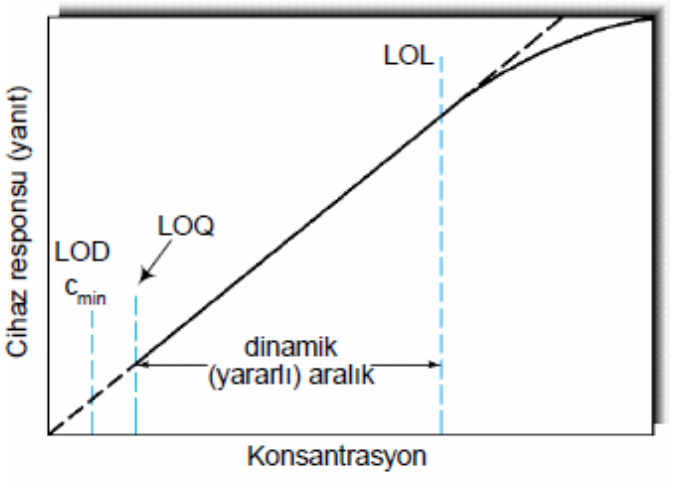
b) Girişim yapan maddelerin standartları sağlanmıyorsa, örnek; ısı, ışık, nem, asit, baz, oksidasyon gibi stres şartlarına maruz bırakılıp sonuçlar referans maddeyle karşılaştırılır.

2.5.2 Doğrusallık

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

2.5.3 Konsantrasyon Aralığı

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



Şekil 2. 27 Bir kalibrasyon eğrisi grafiği; cihaz responsu-kalibrasyon değişimi

2.5.4 Doğruluk

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

2.5.4.1 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 konsantrasyonda ki çözeltilerden 3 defa ölçüm yapılır, çıkan sonuçlar başka bir yöntemle elde edile sonuçlar ile kıyaslanır ve rapor edilir.

2.5.4.2 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.

2.5.4.3 Standart katma yöntemi

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

2.5.5 Kesinlik

Üçe ayrılır:

1.Gün içi tekrarlanabilirlik: Metodun kısa bir zaman içerisinde aynı uygulama koşullarındaki kesinliğidir.%100 konsantrasyonda hazırlanan tek bir örneğin en az 10 defa enjeksiyonu yapılır veya yöntemin sınırları içerisinde alınan 3 konsantrasyondan 3'er enjeksiyon yapılır. Pik alanı veya pik yüksekliği değerlerinin bağıl standart sapması hesaplanır.

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

3.Laboratuvarlar arası tekrarlanabilirlik: Farklı laboratuvarda yöntemin uygulanmasıdır.

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

2.5.6 Dedeksiyon Limiti

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

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

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

c)Kalibrasyon eğrisinden yararalanılarak istatistiksel hesaplamalara dayanan yöntem.

2.5.7 Kantitatif Tayin Limiti

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

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

b)Sinyal/Gürültü oranına dayanan yöntem: Düşük konsantrasyonda hazırlanan örnek çözeltisi le elde dilen sinyalin base line gürültüsüne oranı 10:1 olmalıdır.

c)Kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak istatistiksel hesaplamalara dayanan yöntem.

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

1.Sonuç çabuk alınır ve çalışmacı fazla yorulmaz.

2.Doğruluk derecesi oldukça yüksektir. %1-3 hatayla sonuç alınabilir. Tedbir olarak hata binde 1-2 ye kadar indirilebilir.

3.Her maddenin kendine özgü bir absorplama piki olduğundan seçiciliği yüksektir.

4.Molar absorplama katsayısı 10000'den büyük olan maddelerin 10^{-7} M konsantrasyonları bile tayin edilebilir.

5.Uygulama alanı da oldukça geniştir. Şu kromofor gruplarından bir veya birkaçını içeren maddeler kolaylıkla tayin edilir.

Çizelge 2. 4 Kromofor gruplar

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

Kantitatif analiz için ilk şart, tayini yapılacak maddeyi bilmektir. Bundan sonra birtakım işlemler yapmak gerekir. Bunları şöyle özetlemek mümkündür [65].

1.Tayini yapılacak maddeyi saflaştırmak

2.Tayinin yapılacağı dalga boyunu seçmek

3.Tayinin sıcaklığını ayarlamak

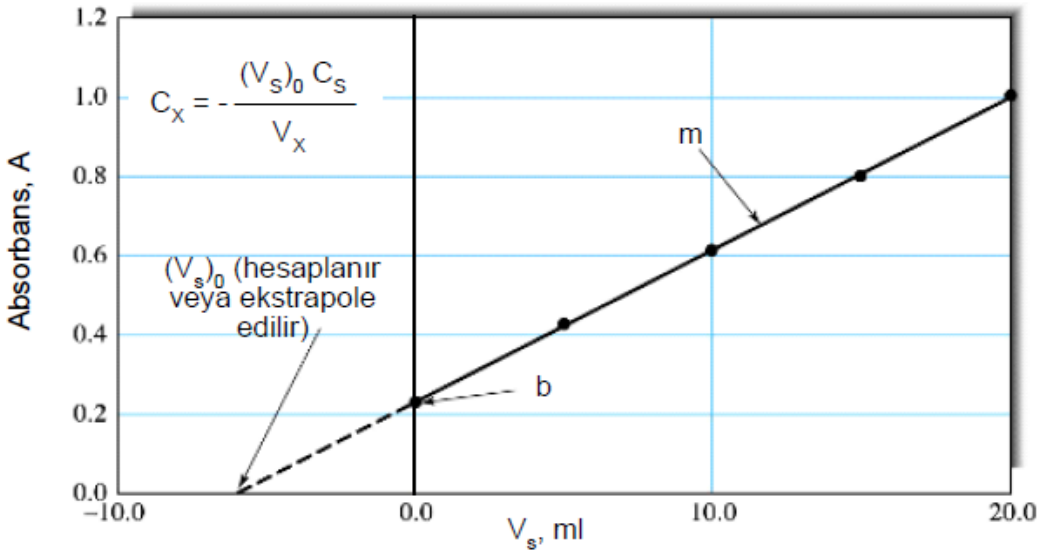
4.Tayin için uygun çözücü seçmek ve pH'ını ayarlamak

5.Tayin için çalışma grafiğini çizmek

2.5.8 Standart Katma Yöntemi (SK)

Kalibrasyon eğrileri içeriği bilinen standartlarla analitin kütle, hacim veya konsantrasyonunun grafiğidir. Gelen sinyaller neticesinde absorbans, elektromanyetik ışımanın emilsiyon 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 [65].



Şekil 2. 28 Standart ekleme eğrisi

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

BÖLÜM 3

DENEYSEL BÖLÜM

Sanayi ile işbirliği içinde ülkenin Ar-Ge faaliyetlerine katkıda bulunan 21. yüzyılın girişimci üniversite modeli doğrultusunda Teknopark kurulması çalışmalarına başlamış ve 4691 sayılı Teknoloji Geliştirme Bölgeleri Kanunu'nun dört maddesine göre Başkanlar Kurulu'nun 22/3/2003 tarih ve 5390 sayılı kararı ile Yıldız Teknik Üniversitesi Teknoloji Geliştirme Bölgesi kurulmuştur.

3.1 Araştırma Araçları ve Kimyasalları

3.1.1 Reaktifler ve Standartlar

Çizelge 3. 1 Kullanılan reaktifler

Reaktifler	**Üretici Firma**	**Lot Numarası**	**Son Kullanım Tarihi**
Potasyum dihidrojen fosfat	Merck	M1063455000	07.09.2016
Asetonitril	Jt Baker	836118	06.01.2017
Fosforik asit	Merck	M1005632500	15.04.2016

Çizelge 3. 2 Kullanılan standartlar

Standartlar	**Üretici Firma**	**Lot Numarası**	**Son Kullanım Tarihi**
Asesülfam K	USP/FCC	WM3407000	23.08.2015
Aspartam	USP/FCC	WM3654984	14.04.2015
Kafein	USP/FCC	K2M218	17.09.2015
Sodyum Benzoat	Sigma	SLBB8058	02.06.2015

3.1.2 Kullanılan Cihaz ve Ekipmanlar

Çizelge 3. 3 Kullanılan cihazlar

Ekipmanlar	**Üretici Firma**	**Firma Kod No**	**Kalibrasyon Tarihi**	**Bir Sonraki Kalibrasyon Tarihi**
UFLC (Dual-Array-Diode) (sadece seçicilik için)	SHIMADZU	PLF2102515	02.04.2014	02.04.2015
UFLC (UV Dedektör)	SHIMADZU	ARM6516598	12.06.2014	12.06.2015
UFLC (UV Dedektör) (ara kesinlik çalışması için)	SHIMADZU	PLF451714	12.06.2014	12.06.2015
Analitik Terazi	METTLER TOLEDO	PLF572448	02.07.2014	02.01.2015

Çizelge 3. 4 Kullanılan kolon özellikleri

Türü	Shim-pack XR-ODS
Uzunluğu	75 mm
Çapı	2.0 mm
Partikül boyutu	2.2 µm
Üretici Firma	SHIMADZU
Lot Numarası	228-00663-91

3.2 Yapılan Deneysel Çalışmalar

3.2.1 Piyasada Bulunan Ürünlerde Tayin Edilecek Bileşenler ve Miktarları

Çizelge 3. 5 Coca Cola Light'da tayin edilecek bileşenler ve miktarları

Bileşenler	**Birim formül, g/L**	**Fonksiyon**	**Referans**
Asesülfam K	0,20	Tatlandırıcı	**USP Food Chemicals**
Aspartam	0,20	Tatlandırıcı	**USP Food Chemicals**
Kafein	Maks. 0,15	Uyarıcı	**USP Food Chemicals**
Sodyum Benzoat	Etiketinde miktarı belirtilmemiş	Koruyucu	**USP Food Chemicals**

Çizelge 3. 6 Pepsi Light'da tayin edilecek bileşenler ve miktarları

Bileşenler	**Birim formül, g/L**	**Fonksiyon**	**Referans**
Asesülfam K	0,20	Tatlandırıcı	**USP Food Chemicals**
Aspartam	0,20	Tatlandırıcı	**USP Food Chemicals**
Kafein	0,12	Uyarıcı	**USP Food Chemicals**
Sodyum Benzoat	Etiketinde miktarı belirtilmemiş	Koruyucu	**USP Food Chemicals**

Çizelge 3. 7 Cola Cola Zero' da tayin edilecek bileşenler ve miktarları

Bileşenler	**Birim formül, g/L**	**Fonksiyon**	**Referans**
Asesülfam- K	0,20	Tatlandırıcı	**USP Food Chemicals**
Aspartam	0,20	Tatlandırıcı	**USP Food Chemicals**
Kafein	Maks. 0,15	Uyarıcı	**USP Food Chemicals**
Sodyum Benzoat	Etiketinde miktarı belirtilmemiş	Koruyucu	**USP Food Chemicals**

3.2.2 Analitik Yöntem Validasyonu

Analitik yöntem validasyonunda amaç, geliştirilen test yöntemlerinin geçerli ve güvenilir olduğunu kanıtlamaktır.

3.2.2.1 Miktar Tayini Metodu

Metot

Metot minimum çözelti hazırlık basamağı (numune direk enjekte ediliyor, numune hazırlık basamağı yok) ve süresi, minimum kimyasal malzeme (reaktif) sarfiyatı ile, light kolada bulunan tüm tatlandırıcı, koruyucu ve uyarıcı maddeleri aynı anda, minimum analiz süresinde (3 dk) basit ve güvenilir bir şekilde (valide metot) tayin etmek amacıyla UFLC kullanılarak geliştirildi.

Limitler

Asesülfam- K: 0.20 g/L

Aspartam:0.20 g/L

Kafein: Maks. 0.15 g/L

Sodyum Benzoat: -

Kromatografik koşullar

Cihaz: Shimadzu UFLC Sistemi

Kolon: Shim-pack XR-ODS (75 mm x 2.0 mm x 2.2 µm (veya eşdeğeri)

Dedektör: UV, 214 nm

Akış hızı: 1.5 ml/dk. izokritik

Enjeksiyon hacmi: 1 µl

Kolon fırın sıcaklığı: 40°C

Numune Sıcaklığı: 5°C

Enjeksiyon Süresi: 3 dk

Hareketli faz : Asetonitril (HPLC-grade): pH 3 Tampon çözelti = 20:80 (h/h)

Seyreltme Çözeltisi : Hareketli Faz

pH 3 Tampon Çözelti : 3,4 g Potasyum dihidrojen fosfat R (KH_2PO_4) 1000 ml'lik balon jojeye aktarılır, üzerine bir miktar saf su (HPLC grade) ilave edilir. Balon joje 15 dk. ultrasonik banyoda tutulur. Tamamen çüzünme sağlanınca aynı çözücüyle hacmine tamamlanır. Çözeltinin pH'ı derişik fosforik asit (H_3PO_4) ile 3 ± 0,05'e ayarlanır.

Standart Çözeltisi

2 paralel standart çözelti hazırlanır (Standart çözelti 1 ve Standart çözelti 2)**.** Yaklaşık 20 mg Asesülfam K, 20 mg Aspartam, 15 mg Kafein, 10 mg Sodyum Benzoat 100 ml'lik bir balon jojeye aktarılır, üzerine bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilir. Balon joje 15 dk. ultrasonik banyoda tutulur. Tamamen çüzünme sağlanınca aynı çözücüyle hacmine tamamlanır.Bu çözelti 0,45 µm naylon filtreden süzülerek UFLC vialine aktarılır. (C_{std}= 0.20 mg/ml Asesülfam K, C_{std}= 0.20 mg/ml Aspartam, C_{std}= 0.15 Kafein, C_{std}=0.10 Sodyum Benzoat)

Numune çözeltisi

2 paralel numune çözeltisi hazırlanır (Numune çözeltisi 1 ve Numune çözeltisi 2)**.** Diet kola numunesi degaze edilip ilk kısım atıldıktan sonra 0,45 µm'lik naylon filtreden süzülür ve viale aktarılır. (C_{num}= 0.20 mg/ml Asesülfam- K, C_{num}= 0.20 mg/ml Aspartam, C_{num}= Maks. 0.15 Kafein, C_{num} - Sodyum Benzoat).

Prosedür

Kolon dengelendikten sonra Standart çözelti 1 (2 kez) ve Standart çözelti 2 (6 kez) enjekte edilir. Numune çözeltisi 1 ve Numune çözeltisi 2 (2'şer kez), kontrol standardı olarak Standart çözelti 2 (2 kez) enjekte edilir.

Sistem Uygunluğu

Limit: Asesülfam K, Aspartam, Kafein, Sodyum Benzoat pik alanlarının %RSD (Standart çözeltinin 6 enjeksiyonu için) değeri en fazla %1.0 olmalıdır. Asesülfam K, Aspartam, Kafein, Sodyum Benzoat piklerinin teorik plaka sayısı en az 2250 olmalıdır. Asesülfam K, Aspartam, Kafein, Sodyum Benzoat piklerinin kuyruklanma faktörü ise 2.0 dan fazla olmamalıdır.

Hesaplama

Asesülfam K, miktarı aşağıdaki formül ile hesaplanır:

$$\text{Asesülfam K, mg/1000mL} = \frac{A_n}{A_S} \times \frac{W_s}{100} \times \frac{P}{100} \times \frac{1000}{W_n} \times d \times AW$$

A_n : Numune çözeltisi kromatogramındaki Asesülfam K pik alanı

A_s : Standart çözelti kromatogramındaki Asesülfam K piklerinin ortalama alanı

Ws : Standart çözelti için kullanılan Asesülfam K ağırlığı, mg

Wn : Numune çözeltisi için etikette belirtilen Asesülfam K ağırlığı, g

P : Asesülfam K potensi (asis), %

D :Yoğunluk, g/cm^3

AW : 1 kutu veya şişe içeriğinin ortalama hacmi, mL

NOT: Aspartam, Kafein ve Sodyum Benzoat miktarı da benzer şekilde hesaplanır. Kullanılan Asesülfam K, Aspartam, Kafein ve Sodyum Benzoat'ın potensi % 100 dür.

3.2.3 Miktar Tayini Metot Validasyonu

Bütün parametreler UFLC yöntem için değerlendirilir.

3.2.3.1 Miktar Tayini Metot Validasyon Parametreleri

a) Seçicilik (Spesifiklik)

b) Doğruluk

c) Kesinlik

Cihaz kesinliği yada enjeksiyon tekrarlanabilirliği

Metot Kesinliği

Ara Kesinlik

Tekrarlanabilirlik

d) Doğrusallık ve Çalışma Aralığı

e) LOD Minimum Tayin Değeri (Limit of Dedection), LOQ Minimum Saptama Değeri (Limit of Quantification)

f) Güvenirlilik

Spesifiklik

Asesülfam K Standart Çözelti

20 mg Asesülfam K 100 ml'lik bir balon jojeye aktarılır, üzerine bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilir. Balon joje 15 dk. ultrasonik banyoda tutulur. Tamamen çüzünme sağlanınca aynı çözücüyle hacmine tamamlanır. İlk kısım atıldıktan sonra 0,45 µm'lik naylon filtreden süzülür ve viale aktarılır (C_{std}= 0.20 mg/ml Asesülfam K).

Aspartam Standart Çözeltisi

20 mg Aspartam 100 ml'lik bir balon jojeye aktarılır, üzerine bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilir. Balon joje 15 dk. ultrasonik banyoda tutulur. Tamamen çüzünme sağlanınca aynı çözücüyle hacmine tamamlanır. İlk kısım atıldıktan sonra 0,45 µm'lik naylon filtreden süzülür ve viale aktarılır (C_{std}= 0.20 mg/ml Aspartam).

Kafein Standart Çözeltisi

15 mg Kafein 100 ml'lik bir balon jojeye aktarılır, üzerine bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilir. Balon joje 15 dk. ultrasonik banyoda tutulur. Tamamen çüzünme sağlanınca

aynı çözücüyle hacmine tamamlanır. İlk kısım atıldıktan sonra 0,45 µm'lik naylon filtreden süzülür ve viale aktarılır (C_{std}= 0.15 mg/ml Kafein).

Sodyum Benzoat Standart Çözelti

10 mg Sodyum Benzoat 100 ml'lik bir balon jojeye aktarılır, üzerine bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilir. Balon joje 15 dk. ultrasonik banyoda tutulur. Tamamen çüzünme sağlanınca aynı çözücüyle hacmine tamamlanır. İlk kısım atıldıktan sonra 0,45 µm'lik naylon filtreden süzülür ve viale aktarılır (C_{std}= 0.10 mg/ml Sodyum Benzoat).

Asesülfam K İçin Plasebo Çözeltisinin Hazırlanışı

Ürünün birim formülüne göre 20 mg Aspartam, 15 mg Kafein, 10 mg Sodyum Benzoat 100 ml'lik bir balon jojeye aktarılır, üzerine bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilir. Balon joje 15 dk. ultrasonik banyoda tutulur. Tamamen çüzünme sağlanınca aynı çözücüyle hacmine tamamlanır.Bu çözelti 0,45 µm naylon filtreden süzülerek UFLC vialine aktarılır. ($C_{placebo}$= 0.20 mg/ml Aspartam, $C_{placebo}$= 0.15 Kafein, $C_{placebo}$=0.10 Sodyum Benzoat)

Aspartam İçin Plasebo Çözeltisinin Hazırlanışı

Ürünün birim formülüne göre 20 mg Asesülfam K, 15 mg Kafein, 10 mg Sodyum Benzoat 100 ml'lik bir balon jojeye aktarılır, üzerine bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilir. Balon joje 15 dk. ultrasonik banyoda tutulur. Tamamen çüzünme sağlanınca aynı çözücüyle hacmine tamamlanır. Bu çözelti 0,45 µm naylon filtreden süzülerek UFLC vialine aktarılır. ($C_{placebo}$= 0.20 mg/ml Asesülfam K, $C_{placebo}$= 0.15 Kafein, $C_{placebo}$=0.10 Sodyum Benzoat)

Kafein İçin Plasebo Çözeltisinin Hazırlanışı

Ürünün birim formülüne göre 20 mg Asesülfam K, 20 mg Aspartam, 10 mg Sodyum Benzoat 100 ml'lik bir balon jojeye aktarılır, üzerine bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilir. Balon joje 15 dk. ultrasonik banyoda tutulur. Tamamen çüzünme sağlanınca aynı çözücüyle hacmine tamamlanır. Bu çözelti 0,45 µm naylon filtreden süzülerek UFLC vialine aktarılır. ($C_{placebo}$= 0.20 mg/ml Asesülfam K, $C_{placebo}$= 0.20 mg/ml Aspartam, $C_{placebo}$=0.10 Sodyum Benzoat)

Sodyum Benzoat İçin Plasebo Çözeltisinin Hazırlanışı

Ürünün birim formülüne göre 20 mg Asesülfam K, 20 mg Aspartam,15 mg Kafein 100 ml'lik bir balon jojeye aktarılır, üzerine bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilir. Balon joje 15 dk. ultrasonik banyoda tutulur. Tamamen çüzünme sağlanınca aynı çözücüyle hacmine tamamlanır. Bu çözelti 0,45 µm naylon filtreden süzülerek UFLC vialine aktarılır. ($C_{placebo}$= 0.20 mg/ml Asesülfam K, $C_{placebo}$= 0.20 mg/ml Aspartam, $C_{placebo}$= 0.15 Kafein)

Limit Konsantrasyonunda Asesülfak K, Aspartam. Kafein, Sodyum Benzoat Karışımı Çözeltisi Hazırlanışı

Ürünün birim formülüne göre 20 mg Asesülfam K, 20 mg Aspartam, 15 mg Kafein, 10 mg Sodyum Benzoat 100 ml'lik bir balon jojeye aktarılır, üzerine bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilir. Balon joje 15 dk. ultrasonik banyoda tutulur. Tamamen çüzünme sağlanınca aynı çözücüyle hacmine tamamlanır.Bu çözelti 0,45 µm naylon filtreden süzülerek UFLC vialine aktarılır. ($C_{cöz}$= 0.20 mg/ml Asesülfam K, $C_{cöz}$= 0.20 mg/ml Aspartam, $C_{çöz}$= 0.15 Kafein, $C_{çöz}$=0.10 Sodyum Benzoat)

Prosedür

Seyreltme çözeltisi enjekte edilir.

Plasebo çözeltileri enjekte edilir.

Asesülfam K, Aspartam, Kafein, Sodyum bonzoat standart çözeltileri enjekte edilir.

Limit Konsantrasyonunda Asesülfak K, Aspartam, Kafein, Sodyum Benzoat karışımı çözeltisi enjekte edilir.

Numune çözeltisi enjekte edilir.

Enjeksiyon yapılan çözeltilerin alıkonma ve bağıl alıkonma zamanları not edilir.

Çizelge 3. 8 Çözeltilerin alıkonma ve bağıl alıkonma zamanları

Bileşenler	**Alıkonma Zamanı**
Seyreltme Çözeltisi (Hareketli Faz)	0
Asesülfam K İçin Plasebo Çözeltisi	1,028
	1,227
	2,314
Aspartam İçin Plasebo Çözeltisi	0,743
	1,028
	2,314
Kafein İçin Plasebo Çözeltisi	0,745
	1,224
	2,341
Sodyum Benzoat İçin Plasebo Çözeltisi	0,747
	1,059
	1,228
Asesülfan K Standart Çözeltisi	0,732
Kafein Standart Çözeltisi	1,047
Aspartam Standart Çözeltisi	1,273
Sodyum Benzoat Standart Çözeltisi	2,521
Limit Konsantrasyonunda Asesülfak K, Aspartam. Kafein, Sodyum Benzoat Karışımı Çözeltisi	0,743
	1.028
	1,227
	2,314

Çizelge 3. 8 (devam)

Bileşenler	**Alıkonma Zamanı**
Numune Çözeltisi	0,746
	1.027
	1,223
	2,299

Spesifiklik Kriterleri

Etken madde (Asesülfam K, Aspartam, Kafein, Sodyum Bonzoat) alıkonma zamanında başka pik görülmemelidir.

Sonuç

Bu sonuçlara dayanarak, miktar tayininde bu yöntemin seçicilik parametresi uygundur.

Doğruluk

Doğruluk tayini için numunelerin hazırlanması

%80'lik doğruluk numunesinin hazırlanması

Yaklaşık 16 mg Asesülfam K, 16 mg Aspartam, 12 mg Kafein, 8 mg Sodyum Benzoat 100 ml'lik bir balon jojeye aktarılır, üzerine bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilir. Balon joje 15 dk. ultrasonik banyoda tutulur. Tamamen çözünme sağlanınca aynı çözücüyle hacmine tamamlanır. Bu çözelti 0,45 µm naylon filtreden süzülerek UFLC vialine aktarılır (C_{num}= 0.16 mg/ml Asesülfam K, C_{num}= 0.16 mg/ml Aspartam, C_{num}= 0.12 Kafein, C_{num}=0.08 Sodyum Benzoat).

%100'lük doğruluk numunesinin hazırlanması

Yaklaşık 20 mg Asesülfam K, 20 mg Aspartam, 15 mg Kafein, 10 mg Sodyum Benzoat 100 ml'lik bir balon jojeye aktarılır, üzerine bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilir. Balon joje 15 dk. ultrasonik banyoda tutulur. Tamamen çüzünme sağlanınca aynı çözücüyle hacmine tamamlanır.Bu çözelti 0,45 µm naylon filtreden süzülerek UFLC

vialine aktarılır (C_{num}= 0.20 mg/ml Asesülfam K, C_{num}= 0.20 mg/ml Aspartam, C_{num}= 0.15 Kafein, C_{num}=0.10 Sodyum Benzoat).

%120'lik doğruluk numunesinin hazırlanması

Yaklaşık 24 mg Asesülfam K, 24 mg Aspartam, 18 mg Kafein, 12 mg Sodyum Benzoat 100 ml'lik bir balon jojeye aktarılır, üzerine bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilir. Balon joje 15 dk. ultrasonik banyoda tutulur. Tamamen çözünme sağlanınca aynı çözücüyle hacmine tamamlanır. Bu çözelti 0,45 µm naylon filtreden süzülerek UFLC vialine aktarılır (C_{num}= 0.24 mg/ml Asesülfam K, C_{num}= 0.24 mg/ml Aspartam, C_{num}= 0.18 Kafein, C_{num}=0.12 Sodyum Benzoat).

80%, 100%, 120% doğruluk numuneleri enjekte edilir.

Çizelge 3. 9 Asesülfam K için % geri kazanım değerleri

Test	**Tartılan Hammadde (mg/mL)**	**Hesaplanan Hammadde (mg/mL)**	**Geri Kazanım %**
80%	0,1611	0,1586	98,45
	0,1609	0,1591	98,88
	0,1607	0,1585	98,63
100%	0,2012	0,1990	98,91
	0,2011	0,1992	99,06
	0,2009	0,1984	98,76
120%	0,2408	0,2382	98,92
	0,2413	0,2389	99,01
	0,2405	0,2389	99,33
Ortalama Geri Kazanım:			98,88

Çizelge 3. 10 Aspartam için % geri kazanım değerleri

Test	**Tartılan Hammadde (mg/mL)**	**Hesaplanan Hammadde (mg/mL)**	**Geri Kazanım %**
80%	0,1606	0,1584	98,63
	0,1595	0,1578	98,93
	0,1598	0,1581	98,94
100%	0,1998	0,1978	99,00
	0,2004	0,1981	98,85
	0,1997	0,1974	98,85
120%	0,2404	0,2380	99,00
	0,2412	0,2385	98,88
	0,2395	0,2391	99,83
Ortalama Geri Kazanım:			98,99

Çizelge 3. 11 Kafein için % geri kazanım değerleri

Test	**Tartılan Hammadde (mg/mL)**	**Hesaplanan Hammadde (mg/mL)**	**Geri Kazanım %**
80%	0,1203	0,1195	99,33
	0,1195	0,1190	99,58
	0,1197	0,1198	100,08
100%	0,1499	0,1490	99,40
	0,1504	0,1485	98,74
	0,1495	0,1479	98,93
120%	0,1801	0,1795	99,67
	0,1792	0,1790	99,89
	0,1805	0,1780	98,61

Çizelge 3. 11 (devam)

Ortalama Geri Kazanım:	98,99

Çizelge 3. 12 Sodyum Benzoat için % geri kazanım değerleri

Test	**Tartılan Hammadde (mg/mL)**	**Hesaplanan Hammadde (mg/mL)**	**Geri Kazanım %**
80%	0,0811	0,0801	99,50
	0,0809	0,0801	99,75
	0,0812	0,0801	99,75
100%	0,1010	0,1001	99,70
	0,1012	0,1002	99,80
	0,1014	0,1002	99,70
120%	0,1213	0,1200	99,75
	0,1211	0,1199	99,75
	0,1212	0,1201	99,67
Ortalama Geri Kazanım:			98,93

Kriter

Kabul edilebilir geri kazanım: % 98-102

Sonuç

Ortalama geri kazanım değerleri Asesülfam K, Aspartam, Kafein ve Sodyum Benzoat için sırasıyla %98,88, %98,99, %99,36, %98,93'dir. Bu sonuca göre, %80, %100, %120 için % geri kazanım değerleri yeterlidir ve miktar tayini testi “doğruluk” metot validasyon parametresi yöntemi uygundur.

Kesinlik

Bir analitik yöntemin kesinliği homojen numunenin tekrarlanan analizlerinden elde edilen sonuçlarının dağılma miktarıdır.

Cihaz Kesinliği ya da Enjeksiyon Tekrarlanabilirliği

Test, en az %100 konsantrasyonda hazırlanan standart çözeltinin 6 enjeksiyonu ile yapılır. Standart çözeltisi Bölüm 3.2.2.1'de anlatıldığı gibi hazırlanır.

Çizelge 3. 13 Asesülfam K için test sonuçları

Enjeksiyon Sayısı	Alan (uV)	Alıkonma Zamanı
1	504505	0,733
2	504001	0,732
3	504856	0,735
4	504865	0,732
5	504564	0,732
6	504874	0,731
Ortalama	504611	0,733
Standart sapma	340	0
Bağıl std. Sapma	0,07	0,19

Çizelge 3. 14 Aspartam için test sonuçları

Enjeksiyon Sayısı	Alan (uV)	Alıkonma Zamanı
1	320625	1,259
2	320351	1,261
3	320665	1,258
4	320246	1,259
5	320554	1,259
6	320788	1,251
Ortalama	320538	1,258
Standart sapma	203	0
Bağıl std. Sapma	0,06	0,28

Çizelge 3. 15 Kafein için test sonuçları

Enjeksiyon Sayısı	**Alan (uV)**	**Alıkonma Zamanı**
1	870720	1,045
2	870684	1,048
3	870924	1,050
4	870759	1,060
5	870889	1,050
6	870424	1,039
Ortalama	870733	1,050
Standart sapma	179	0
Bağıl std. Sapma	0,02	0,66

Çizelge 3. 16 Sodyum Benzoat için test sonuçları

Enjeksiyon Sayısı	**Alan (uV)**	**Alıkonma Zamanı**
1	399035	2,508
2	399145	2,509
3	399234	2,508
4	399042	2,506
5	399045	2,505
6	399145	2,508
Ortalama	399108	2,507
Standart sapma	80,33	0,00
Bağıl std. Sapma	0,02	0,06

Kriter

Bağıl Standart Sapma %2.0’ dan fazla olmamalıdır.

Sonuç

Asesülfam K için pik alanının ve pik alıkonma zamanının bağıl standart sapması %0.07 ve %0.19, Aspartam için pik alanının ve pik alıkonma zamanının bağıl standart sapması %0.06 ve %0.28, Kafein için pik alanının ve pik alıkonma zamanının bağıl standart sapması %0.02 ve %0.66, Sodyum Benzoat için pik alanının ve pik alıkonma zamanının bağıl standart sapması %0.02 ve %0.06,olduğu için; yöntemin cihaz kesinliği ya da enjeksiyon tekrarlanabilirliği uygundur.

Metot Kesinliği

Metot kesinliğinin saptanması için Bölüm 3.2.2.1'de anlatıldığı gibi 6 adet test numunesi hazırlanarak çalışma yapılır.

Çizelge 3. 17 Metot kesinliği test sonuçları

Metot Kesinliği	**(sonuç, mg/mL)**			
	Asesülfam K	**Aspartam**	**Kafein**	**Sodyum Benzoat**
Test Nunumesi 1	0,2010	0,2004	0,1304	0,1004
Test Nunumesi 2	0,2012	0,2006	0,1302	0,1003
Test Nunumesi 3	0,1998	0,1999	0,1298	0,1001
Test Nunumesi 4	0,2004	0,2002	0,1305	0,1005
Test Nunumesi 5	0,2009	0,2007	0,1299	0,1002
Test Nunumesi 6	0,1998	0,1999	0,1301	0,1004
Ortalama	0,2005	0,2003	0,1302	0,1003
Standart Sapma	0,0615	0,0343	0,0274	0,0147
Bağıl Standart Sapma (%)	0,3065	0,1713	0,2104	0,1467

Kriter

6 analiz sonucunun bağıl standart sapma değeri maksimum %2.0 olmalıdır.

Sonuç

6 analiz sonucunun bağıl standart sapma değeri Asesülfam K, Aspartam, Kafein ve Sodyum Benzoat için sırasıyla %0,31, %0,17, %0,21, %0,15'dir.

Yöntemin metot kesinliği uygundur.

Ara Kesinlik

Ara kesinlik laboratuvar içindeki değişikliklerin (farklı günlerde, farklı analistler) kesinliğini ifade eder.

Ara kesinlik parametresi üründen elde edilen sonuçlarla hesaplanır.

Her bir analist tarafından 6 adet numune çözeltisi Bölüm 3.2.2.1'de anlatıldığı gibi hazırlanır.

Tüm numune çözeltileri birinci analist tarafından, I.cihazda analiz edilir.

Tüm numune çözeltileri ikinci analist tarafından, II cihazda analiz edilir.

Bütün sonuçlar kıyaslanıp Bağıl Standart Sapma hesaplanır.

Çizelge 3. 18 Ara kesinlik test sonuçları analist I

Ara Kesinlik	**Analist I**			
	I.Cihaz (mg/mL sonuç)			
	Asesülfam K	**Aspartam**	**Kafein**	**Sodyum Benzoat**
Test Nunumesi 1	0,2001	0,1998	0,1304	0,1004
Test Nunumesi 2	0,2002	0,2007	0,1305	0,1008
Test Nunumesi 3	0,2000	0,2004	0,1298	0,1015
Test Nunumesi 4	0,2005	0,2001	0,1304	0,1011
Test Nunumesi 5	0,1999	0,1999	0,1308	0,1003
Test Nunumesi 6	0,2004	0,1998	0,1304	0,1001
Ortalama	0,2002	0,2001	0,1304	0,1007

Çizelge 3. 18 (devam)

Standart Sapma	0,0232	0,0366	0,0325	0,0533
Bağıl Standart Sapma (%)	0,1157	0,1827	0,2493	0,5292

Çizelge 3. 19 Ara kesinlik test sonuçları analist II

Ara Kesinlik	**Analist II**			
	II.Cihaz (mg/mL sonuç)			
	Asesülfam K	**Aspartam**	**Kafein**	**Sodyum Benzoat**
Test Nunumesi 1	0,2001	0,1994	0,1299	0,1001
Test Nunumesi 2	0,2002	0,2001	0,1309	0,1014
Test Nunumesi 3	0,2001	0,2001	0,1301	0,1008
Test Nunumesi 4	0,2004	0,2004	0,1304	0,1011
Test Nunumesi 5	0,1997	0,2001	0,1298	0,1006
Test Nunumesi 6	0,2001	0,2005	0,1299	0,1008
Ortalama	0,2001	0,2001	0,1302	0,1008
Standart Sapma	0,0228	0,0385	0,0418	0,0443
Bağıl Standart Sapma (%)	0,1140	0,1923	0,3211	0,4392

Çizelge 3. 20 Ara kesinlik 12 analiz sonucu

ARA KESİNLİK (12 Analiz Sonucu)		**(mg/mL sonuç)**			
		Asesülfam K	**Aspartam**	**Kafein**	**Sodyum Benzoat**
Analist I (I. Cihaz)	Test Nunumesi 1	0,2001	0,1998	0,1304	0,1004
	Test Nunumesi 2	0,2002	0,2007	0,1305	0,1008
	Test Nunumesi 3	0,2000	0,2004	0,1298	0,1015
	Test Nunumesi 4	0,2005	0,2001	0,1304	0,1011
	Test Nunumesi 5	0,1999	0,1999	0,1308	0,1003
	Test Nunumesi 6	0,2004	0,1998	0,1304	0,1001
Analist II (II. Cihaz)	Test Nunumesi 1	0,2001	0,1994	0,1299	0,1001
	Test Nunumesi 2	0,2002	0,2001	0,1309	0,1014
	Test Nunumesi 3	0,2001	0,2001	0,1301	0,1008
	Test Nunumesi 4	0,2004	0,2004	0,1304	0,1011
	Test Nunumesi 5	0,1997	0,2001	0,1298	0,1006
	Test Nunumesi 6	0,2001	0,2005	0,1299	0,1008
Ortalama		0,2001	0,2001	0,1303	0,1008
Standart Sapma		0,0223	0,0358	0,0374	0,0470
Bağıl Standart Sapma (%)		0,1116	0,1789	0,2874	0,4665

Kriter

Analist I ve cihaz I'den elde edilen sonuçları ve Analist II ve cihaz II'den elde edilen sonuçların kendi içindeki Bağıl Standart Sapma değeri maksimum %2.0 olmalıdır.

12 analiz sonucunun Bağıl Standart Sapma değeri maksimum %2.0 olmalıdır.

Sonuç

Analist I ve cihaz I'den elde edilen sonuçların Bağıl Standart Sapma değeri Asesülfam K, Aspartam, Kafein ve Sodyum Benzoat için sırasıyla %0,12, %0,18, %0,25, %0,53'dir.

Analist II ve cihaz II'den elde edilen sonuçların Bağıl Standart Sapma değeri Asesülfam K, Aspartam, Kafein ve Sodyum Benzoat için sırasıyla %0,11, %0,19, %0,32, %0,44'dir.
12 analiz sonucunun Bağıl Standart Sapma değeri Asesülfam K, Aspartam, Kafein ve Sodyum Benzoat için sırasıyla %0,11, %0,18, %0,29, %0,47'dir
Yöntemin ara kesinliği uygundur.

Doğrusallık ve Çalışma Aralığı

Doğrusallık çalışması bir konsantrasyon aralığındaki numune çözeltilerindeki analit cevabının konsantrasyonla doğru orantılı olduğunun gösterilmesidir.
60%, 80%, 100%, 120% ve 140% konsantrasyon aralığında standart çözeltiler hazırlanır.

Asesülfam K İçin Doğrusallık Çözeltilerinin Hazırlanması

%60 Asesülfam K Standart Çözeltisi

12 mg Asesülfam K 100 ml'lik bir balon jojeye aktarılır, üzerine bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilir. Balon joje 15 dk. ultrasonik banyoda tutulur. Tamamen çözünme sağlanınca aynı çözücüyle hacmine tamamlanır. İlk kısım atıldıktan sonra 0,45 µm'lik naylon filtreden süzülür ve viale aktarılır (C_{std}= 0.12 mg/ml Asesülfam K).

%80 Asesülfam K Standart Çözeltisi

16 mg Asesülfam K 100 ml'lik bir balon jojeye aktarılır, üzerine bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilir. Balon joje 15 dk. ultrasonik banyoda tutulur. Tamamen çözünme sağlanınca aynı çözücüyle hacmine tamamlanır. İlk kısım atıldıktan sonra 0,45 µm'lik naylon filtreden süzülür ve viale aktarılır (C_{std}= 0.16 mg/ml Asesülfam K).

%100 Asesülfam K Standart Çözeltisi

20 mg Asesülfam K 100 ml'lik bir balon jojeye aktarılır, üzerine bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilir. Balon joje 15 dk. ultrasonik banyoda tutulur. Tamamen çözünme sağlanınca aynı çözücüyle hacmine tamamlanır. İlk kısım atıldıktan sonra 0,45 µm'lik naylon filtreden süzülür ve viale aktarılır (C_{std}= 0.20 mg/ml Asesülfam K).

%120 Asesülfam K Standart Çözeltisi

24 mg Asesülfam K 100 ml'lik bir balon jojeye aktarılır, üzerine bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilir. Balon joje 15 dk. ultrasonik banyoda tutulur. Tamamen çözünme

sağlanınca aynı çözücüyle hacmine tamamlanır. İlk kısım atıldıktan sonra 0,45 µm'lik naylon filtreden süzülür ve viale aktarılır (C_{std}= 0.24 mg/ml Asesülfam K).

%140 Asesülfam K Standart Çözeltisi

28 mg Asesülfam K 100 ml'lik bir balon jojeye aktarılır, üzerine bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilir. Balon joje 15 dk. ultrasonik banyoda tutulur. Tamamen çözünme sağlanınca aynı çözücüyle hacmine tamamlanır. İlk kısım atıldıktan sonra 0,45 µm'lik naylon filtreden süzülür ve viale aktarılır (C_{std}= 0.28 mg/ml Asesülfam K).

Aspartam İçin Doğrusallık Çözeltilerinin Hazırlanması

%60 Aspartam Standart Çözeltisi

12 mg Aspartam 100 ml'lik bir balon jojeye aktarılır, üzerine bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilir. Balon joje 15 dk. ultrasonik banyoda tutulur. Tamamen çözünme sağlanınca aynı çözücüyle hacmine tamamlanır. İlk kısım atıldıktan sonra 0,45 µm'lik naylon filtreden süzülür ve viale aktarılır (C_{std}= 0.12 mg/ml Aspartam).

%80 Aspartam Standart Çözeltisi

16 mg Aspartam 100 ml'lik bir balon jojeye aktarılır, üzerine bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilir. Balon joje 15 dk. ultrasonik banyoda tutulur. Tamamen çözünme sağlanınca aynı çözücüyle hacmine tamamlanır. İlk kısım atıldıktan sonra 0,45 µm'lik naylon filtreden süzülür ve viale aktarılır (C_{std}= 0.16 mg/ml Aspartam).

%100 Aspartam Standart Çözeltisi

20 mg Aspartam 100 ml'lik bir balon jojeye aktarılır, üzerine bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilir. Balon joje 15 dk. ultrasonik banyoda tutulur. Tamamen çözünme sağlanınca aynı çözücüyle hacmine tamamlanır. İlk kısım atıldıktan sonra 0,45 µm'lik naylon filtreden süzülür ve viale aktarılır (C_{std}= 0.20 mg/ml Aspartam).

%120 Aspartam Standart Çözeltisi

24 mg Aspartam 100 ml'lik bir balon jojeye aktarılır, üzerine bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilir. Balon joje 15 dk. ultrasonik banyoda tutulur. Tamamen çözünme sağlanınca aynı çözücüyle hacmine tamamlanır. İlk kısım atıldıktan sonra 0,45 µm'lik naylon filtreden süzülür ve viale aktarılır.

(C_{std}= 0.24 mg/ml Aspartam)

%140 Aspartam Standart Çözeltisi

28 mg Aspartam 100 ml'lik bir balon jojeye aktarılır, üzerine bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilir. Balon joje 15 dk. ultrasonik banyoda tutulur. Tamamen çözünme sağlanınca aynı çözücüyle hacmine tamamlanır. İlk kısım atıldıktan sonra 0,45 µm'lik naylon filtreden süzülür ve viale aktarılır (C_{std}= 0.28 mg/ml Aspartam).

Kafein İçin Doğrusallık Çözeltilerinin Hazırlanması

%60 Kafein Standart Çözeltisi

9 mg Kafein 100 ml'lik bir balon jojeye aktarılır, üzerine bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilir. Balon joje 15 dk. ultrasonik banyodatutulur. Tamamen çözünme sağlanınca aynı çözücüyle hacmine tamamlanır. İlk kısım atıldıktan sonra 0,45 µm'lik naylon filtreden süzülür ve viale aktarılır (C_{std}= 0.09 mg/ml Kafein).

%80 Kafein Standart Çözeltisi

12 mg Kafein 100 ml'lik bir balon jojeye aktarılır, üzerine bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilir. Balon joje 15 dk. ultrasonik banyoda tutulur. Tamamen çözünme sağlanınca aynı çözücüyle hacmine tamamlanır. İlk kısım atıldıktan sonra 0,45 µm'lik naylon filtreden süzülür ve viale aktarılır (C_{std}= 0.12 mg/ml Kafein).

%100 Kafein Standart Çözeltisi

15 mg Kafein 100 ml'lik bir balon jojeye aktarılır, üzerine bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilir. Balon joje 15 dk. ultrasonik banyoda tutulur. Tamamen çözünme sağlanınca aynı çözücüyle hacmine tamamlanır. İlk kısım atıldıktan sonra 0,45 µm'lik naylon filtreden süzülür ve viale aktarılır (C_{std}= 0.15 mg/ml Kafein).

%120 Kafein Standart Çözeltisi

18 mg Kafein 100 ml'lik bir balon jojeye aktarılır, üzerine bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilir. Balon joje 15 dk. ultrasonik banyoda tutulur. Tamamen çözünme sağlanınca aynı çözücüyle hacmine tamamlanır. İlk kısım atıldıktan sonra 0,45 µm'lik naylon filtreden süzülür ve viale aktarılır.

(C_{std}= 0.18 mg/ml Kafein)

%140 Kafein Standart Çözeltisi

21 mg Kafein 100 ml'lik bir balon jojeye aktarılır, üzerine bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilir. Balon joje 15 dk. ultrasonik banyoda tutulur. Tamamen çözünme sağlanınca aynı çözücüyle hacmine tamamlanır. İlk kısım atıldıktan sonra 0,45 µm'lik naylon filtreden süzülür ve viale aktarılır (C_{std}= 0.21 mg/ml Kafein).

Sodyum Benzoat İçin Doğrusallık Çözeltilerinin Hazırlanması

%60 Sodyum Benzoat Standart Çözeltisi

6 mg Sodyum Benzoat 100 ml'lik bir balon jojeye aktarılır, üzerine bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilir. Balon joje 15 dk. ultrasonik banyoda tutulur. Tamamen çözünme sağlanınca aynı çözücüyle hacmine tamamlanır. İlk kısım atıldıktan sonra 0,45 µm'lik naylon filtreden süzülür ve viale aktarılır (C_{std}= 0.06 mg/ml Sodyum Benzoat).

%80 Sodyum Benzoat Standart Çözeltisi

8 mg Sodyum Benzoat 100 ml'lik bir balon jojeye aktarılır, üzerine bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilir. Balon joje 15 dk. ultrasonik banyoda tutulur. Tamamen çüzünme sağlanınca aynı çözücüyle hacmine tamamlanır. İlk kısım atıldıktan sonra 0,45 µm'lik naylon filtreden süzülür ve viale aktarılır (C_{std}= 0.08 mg/ml Sodyum Benzoat).

%100 Sodyum Benzoat Standart Çözeltisi

10 mg Sodyum Benzoat 100 ml'lik bir balon jojeye aktarılır, üzerine bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilir. Balon joje 15 dk. ultrasonik banyoda tutulur. Tamamen çüzünme sağlanınca aynı çözücüyle hacmine tamamlanır. İlk kısım atıldıktan sonra 0,45 µm'lik naylon filtreden süzülür ve viale aktarılır (C_{std}= 0.10 mg/ml Sodyum Benzoat).

%120 Sodyum Benzoat Standart Çözeltisi

12 mg Sodyum Benzoat 100 ml'lik bir balon jojeye aktarılır, üzerine bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilir. Balon joje 15 dk. ultrasonik banyoda tutulur. Tamamen çüzünme sağlanınca aynı çözücüyle hacmine tamamlanır. İlk kısım atıldıktan sonra 0,45 µm'lik naylon filtreden süzülür ve viale aktarılır (C_{std}= 0.12 mg/ml Sodyum Benzoat).

%140 Sodyum Benzoat Standart Çözeltisi

14 mg Sodyum Benzoat 100 ml'lik bir balon jojeye aktarılır, üzerine bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilir. Balon joje 15 dk. ultrasonik banyoda tutulur. Tamamen çüzünme sağlanınca aynı çözücüyle hacmine tamamlanır. İlk kısım atıldıktan sonra 0,45 µm'lik naylon filtreden süzülür ve viale aktarılır (C_{std}= 0.14 mg/ml Sodyum Benzoat).

100% standart çözeltisi 6 kez, diğer standart çözeltiler 3'er kez enjekte edilir.

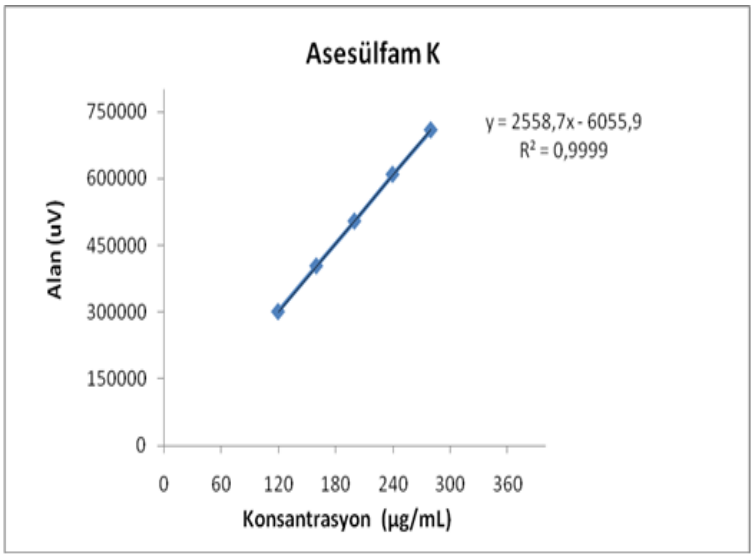
Doğrusallık grafiği çizilir.

Eğim, kesişim, korelasyon katsayısı hesaplanır.

Çizelge 3. 21 Asesülfam K için doğruluk ve çalışma aralığı

Çözelti Seviyesi	**Hammadde konsantrasyonu (mg/mL)**	**Enjeksiyonun alan ortalamaları (Y)**	**Hesaplanan alan (Yi)**	**$(Y-Yi)^2$**
60 %	0,12	300891	300988	9428
80 %	0,16	403651	403336	99162
100 %	0,20	504505	505684	1390277
120 %	0,24	609814	608032	3175168
140 %	0,28	709547	710380	694056

Eğim :	2558,7
Kesişim :	-6055,9
R^2:	0.9999
y = mx + n :	2558,7x-6055,9
$\sum(Y-Yi)^2$:	5368090

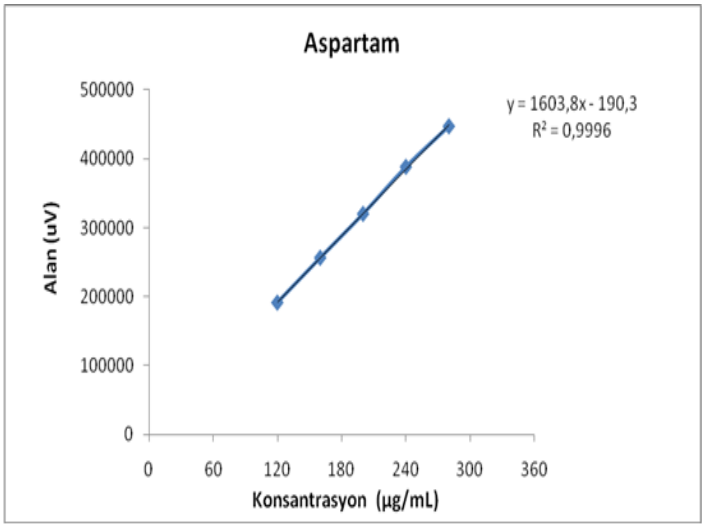


Şekil 3. 1 Asesülfam K için doğrusallık ve lineerlik grafiği

Çizelge 3. 22 Aspartam için doğruluk ve çalışma aralığı

Çözelti Seviyesi	**Hammadde konsantrasyonu (mg/mL)**	**Enjeksiyonun alan ortalamaları (Y)**	**Hesaplanan alan (Yi)**	**$(Y-Yi)^2$**
60 %	0,12	191652	192266	376628
80 %	0,16	256514	256418	9274
100 %	0,20	319998	320570	326841
120 %	0,24	387971	384722	10557950
140 %	0,28	446676	448874	4829885

Eğim :	1603,8
Kesişim :	-190,3
R^2:	0.9999
y = mx + n :	1603,8x-190,3
$\sum(Y-Yi)^2$:	15995664

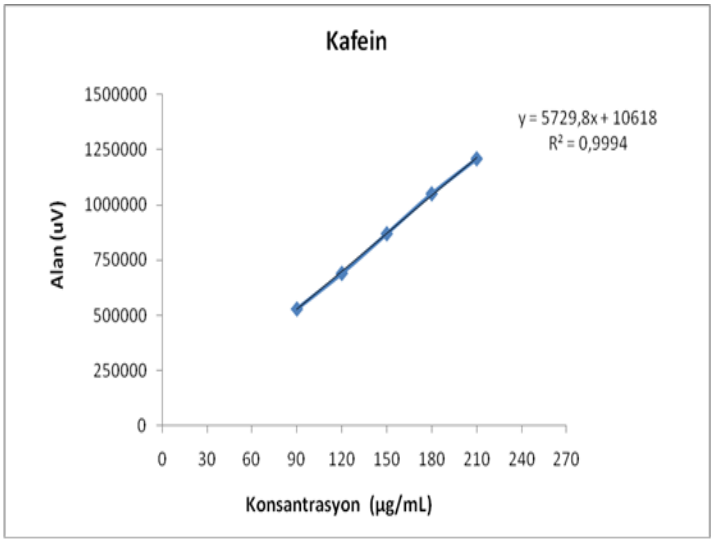


Şekil 3. 2 Aspartam için doğrusallık ve lineerlik grafiği

Çizelge 3. 23 Kafein için doğruluk ve çalışma aralığı

Çözelti Seviyesi	**Hammadde konsantrasyonu (mg/mL)**	**Enjeksiyonun alan ortalamaları (Y)**	**Hesaplanan alan (Yi)**	**$(Y-Yi)^2$**
60 %	0,90	529574	526300	10719076
80 %	0,12	690901	698194	53187849
100 %	0,15	870087	870088	1
120 %	0,18	1050810	1041982	77933584
140 %	0,21	1209095	1213876	22857961

Eğim :	5729,8
Kesişim :	10618
R^2:	0.9994
y = mx + n :	5729,8x+10618
$\sum(Y-Yi)^2$:	164698471

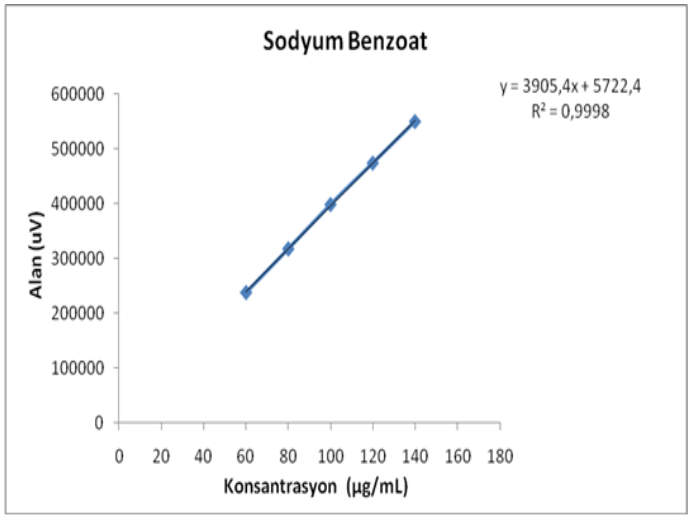


Şekil 3. 3 Kafein için doğrusallık ve lineerlik grafiği

Çizelge 3. 24 Sodyum Benzoat için doğruluk ve çalışma aralığı

Çözelti Seviyesi	**Hammadde konsantrasyonu (mg/mL)**	**Enjeksiyonun alan ortalamaları (Y)**	**Hesaplanan alan (Yi)**	**$(Y-Yi)^2$**
60 %	0,06	238421	240046	2641925
80 %	0,08	318228	318154	5417
100 %	0,10	399147	396262	8320717
120 %	0,12	474842	474370	222407
140 %	0,14	550649	552478	3346704

Eğim :	3905,4
Kesişim :	5722,4
R^2:	0,9998
y = mx + n :	3905,4x+5722,4
$\sum(Y-Yi)^2$:	14537370



Şekil 3. 4 Sodyum Benzoat için doğrusallık ve lineerlik grafiği

Çizelge 3. 25 Doğrusallık ve lineerlik 100% Standat Çözelti Alanları

100% Standart Çözeltileri	**Alan (uV)**			
Enjeksiyon Sayısı	**Asesülfam K**	**Aspartam**	**Kafein**	**Sodyum Benzoat**
1	504504	320632	870710	399021
2	504012	320345	870675	399134
3	504485	320654	870932	399237
4	504856	320252	870754	399046
5	504573	320543	870898	399044
6	504873	320778	872454	399145
Ortalama	504611	320534	870737	399105
Standart Sapma	333	199	173	83
Bağıl Standart Sapma (%)	0,07	0,06	0,02	0,02

Kriter

Korelasyon katsayısı (r^2) minimum 0.99 olmalıdır.

100 % seviyesindeki analit için elde edilen alanın bağıl standart sapması 2.0 %'den az olmalıdır.

Sonuç

Korelasyon katsayısı (r^2) Asesülfam K, Aspartam, Kafein ve Sodyum Benzoat için sırasıyla 0,9999, 0,9996, 0,9994, 0,9998'dir.

100 % standart çözeltilerin 6 kez enjekte edilmesi ile elde edilen bağıl standart sapma değeri Asesülfam K, Aspartam, Kafein ve Sodyum Benzoat için sırasıyla %0,07, %0,06, %0,02, %0,02'dir.

Yöntem miktar tayini testi için doğrusallık kriterine uyar.

Bu da gösterir ki geliştirilen miktar tayini yöntemi, etiket değerinin %60-140'ı konsantrasyonları arasında doğrusaldır.

Yöntemin doğrusallık parametresi uygundur.

LOD Minimum Tayin Değeri (Limit of Dedection), LOQ Minimum Saptama Değeri (Limit of Quantification)

LOD ve LOQ değerlerini hesaplamada pik alanlarının standart sapması (σ) ve doğrusallık grafiği ile hesaplanan eğim (m)'in mukayase edilmesi yöntemi kullanılmıştır. Bölüm 3.2.3.1'deki doğrusallık grafiği ile hesaplanan eğimler ve $\sum(Y\text{-}Yi)^2$ değerleri kullanılmıştır.

LOD ve LOQ aşağıdaki formül ile hesaplanır:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum(Y-Yi)^2}{a-2}} \quad , \qquad LOD = \frac{3\sigma}{m} \quad , \quad LOQ = \frac{10\sigma}{m}$$

σ : Pik alanlarının standart sapması

a : Çalışılan konsantrasyon aralığı sayısı

Y : Doğrusallık grafiği çalışmasındaki enjeksiyon alan ortalaması

Yi : Doğrusallık grafiğinden elde edilen deklemden hesaplanan alan

m : Doğrusallık grafiğininin eğimi

Asesülfam K, Aspartam, Kafein, Sodyum Benzoat için $\sum(Y\text{-}Yi)^2$ ve m (eğim) değeri Çizelge 3.21, Çizelge 3.22, Çizelge 3.23, Çizelge 3.24 de verilmiştir.

Bölüm 3.2.3.2'de yer alan Doğrusallık Çalışmalarında 60%, 80%, 100%, 120% ve 140% olmak üzere 5 farklı konsantrasyonda çalışıldığı için çalışılan konsantrasyon aralığı sayısı (a) 5 olarak alınmıştır.

Çizelge 3. 26 Hesaplanan LOD ve LOQ Değerleri

	Asesülfam K (µg/mL)	**Aspartam (µg/mL)**	**Kafein (µg/mL)**	**Sodyum Benzoat (µg/mL)**
LOD	1,6	4,3	3,9	4,1
LOQ	5,2	14,4	12,9	13,7

Güvenilirlik

Bir analitik prosedürün güvenilirliği, analitik prosedürün küçük fakat önemli yöntem parametreleri değiştirildiğinde etkilenmeden kalma kapasitesinin bir ölçüsüdür. Ayrıca normal kullanımda kararlılığını gösterir.

Çözelti Stabilitesi

Bölüm 3.2.2.1'de belirtildiği gibi standart ve numune çözeltisi hazırlanır.Bu çözelti başlangıçta, 6 saat sonra, 24 saat sonra ve 48 saat sonra analiz edilir.Numuneler bu süre zarfında oda sıcaklığında korunur. Sonuçlar başlangıç değeri ile kıyaslanır ve % değişim hesaplanır.

% Değişim = (Di – Dt) / Di x 100

Dt: Herhangi bir t anında bulunan değer

Di: Başlangıçta bulunan değer

Çizelge 3. 27 Asesülfam K için çözelti stabilitesi

Oda Koşullarında	**Başlangıç**	**6. saat**	**% Değişim**	**24. saat**	**% Değişim**	**48. saat**	**% Değişim**
Standart Alanı	504415	509014	0,91	505678	0,25	507505	0,61
Numune Alanı	504684	509005	0,86	508855	0,83	506845	0,43

Çizelge 3. 28 Aspartam için çözelti stabilitesi

Oda Koşullarında	**Başlangıç**	**6. saat**	**% Değişim**	**24. saat**	**% Değişim**	**48. saat**	**% Değişim**
Standart Alanı	320652	321478	0,26	320412	0,07	320101	0,17
Numune Alanı	310785	311324	0,17	312441	0,53	310151	0,20

Çizelge 3. 29 Kafein için çözelti stabilitesi

Oda Koşullarında	Başlangıç	6. saat	% Değişim	24. saat	% Değişim	48. Saat	% Değişim
Standart Alanı	877451	871147	0,72	873654	0,43	871645	0,66
Numune Alanı	878241	873244	0,57	872756	0,62	871975	0,71

Çizelge 3. 30 Sodyum Benzoat için çözelti stabilitesi

Oda Koşullarında	Başlangıç	6. saat	% Değişim	24. saat	% Değişim	48. Saat	% Değişim
Standart Alanı	398785	399221	0,11	399851	0,27	397854	0,23
Numune Alanı	400115	401561	0,36	400987	0,22	400870	0,19

Kriter

Başlangıç değerinden değişim 2.0%'den fazla olmamalıdır.

Sonuç

Standart çözeltisi için 48. saat;

Başlangıç değerinden % değişim Asesülfam K, Aspartam, Kafein ve Sodyum Benzoat için sırasıyla % 0,61, % 0,17, % 0,66, %.0,23' tür.

Numune çözeltisi için 48. saat;

Başlangıç değerinden % değişim Asesülfam K, Aspartam, Kafein ve Sodyum Benzoat için sırasıyla % 0,43, % 0,20, % 0,71, %.0,19' dur.

Yöntemin çözelti stabilitesi uygundur.

Metot dayanıklılık testi

Bu bölümde metoda özel kritik sayılabilecek parametrelerden, (5 parametreden) 3 tanesi seçilir.

Hareketli fazın oranı

Bölüm 3.2.2.1'de belirtildiği gibi standart çözeltisi hazırlanır. Hareketli fazın başlangıç oranı yöntemde belirtildiği gibi 20:80 (h/h)'dir (Asetonitril : pH 3 Tampon çözelti = 20:80 (h/h)).

Hareketli fazın oranı: 22:78 (h/h) ve 18:82 (h/h) olarak değiştirildikten sonra analiz edilir. Sonuçlar başlangıç değeri ile kıyaslanır ve % değişim hesaplanır.

% Değişim = (Di – Dh) / Di x 100

Dh: Hareketli fazın oranı değiştikten bulunan değer

Di: Başlangıçta bulunan değer

Çizelge 3. 31 Katkı maddeleri için metot dayanıklılık (hareketli faz % değişim)

	Başlangıç (20:80)	**Değişiklikten sonra (22:78)**	**% Değişim**	**Değişiklikten sonra (18:82)**	**% Değişim**
Asesülfam K Pik Alanı	503598	506581	0,59	505976	0,47
Aspartam Pik Alanı	320721	320852	0,04	321439	0,22
Kafein Pik Alanı	870934	878425	0,86	870299	0,07
Sodyum Benzoat Pik Alanı	399124	399621	0,12	398423	0,18

Kriter

Başlangıç değerinden değişim %2.0'den fazla olmamalıdır.

Sonuç

Hareketli fazın oranı: 22:78 (h/h) olarak değiştirildikten sonra;

Başlangıç değerinden değişim Asesülfam K, Aspartam, Kafein ve Sodyum Benzoat için sırasıyla % 0,59, % 0,04, % 0,86, %.0,12'dir.

Hareketli fazın oranı 18:82 (h/h) olarak değiştirildikten sonra;

Başlangıç değerinden değişim Asesülfam K, Aspartam, Kafein ve Sodyum Benzoat için sırasıyla % 0,47, % 0,22, % 0,07, %.0,18'dir.

Yöntem hareketli fazın oranı değiştirilerek çalışılan " metot dayanıklılık" parametresi için uygundur.

Kolon Sıcaklığı

Yöntemde belirtildiği gibi standart çözeltisi hazırlanır. Bu çözelti başlangıç kolon sıcaklığında ve kolon sıcaklığı ±2 ˚C değiştirildikten sonra analiz edilir. Sonuçlar başlangıç değeri ile kıyaslanır ve % değişim hesaplanır.

% Değişim = (Di – Dk) / Di x 100

Dk: Kolon sıcaklığı değiştirildikten sonra bulunan değer

Di: Başlangıçta bulunan değer

Çizelge 3. 32 Katkı maddeleri için metot dayanıklılık (kolon sıcaklığı % değişim)

	Başlangıç (40 ˚C)	**Değişiklikten sonra (38 ˚C)**	**% Değişim**	**Değişiklikten sonra (42 ˚C)**	**% Değişim**
Asesülfam K	505564	506874	0,26	510012	0,88
Aspartam	321792	320152	0,51	320541	0,39
Kafein	871425	870045	0,16	872014	0,07
Sodyum Benzoat	399035	400142	0,28	401987	0,74

Kriter

Başlangıç değerinden değişim %2.0'den fazla olmamalıdır.

Sonuç

Kolon sıcaklığı 38 ˚ C için;

Başlangıç değerinden değişim Asesülfam K, Aspartam, Kafein ve Sodyum Benzoat için sırasıyla % 0,26, % 0,51, % 0,16, %.0,28' dir.

Kolon Sıcaklığı 42˚C için;

Başlangıç değerinden değişim Asesülfam K, Aspartam, Kafein ve Sodyum Benzoat için sırasıyla % 0,88, % 0,39, % 0,07, %.0,74‘ dir.

Yöntem kolon sıcaklığı değiştirilerek çalışılan “ metot dayanıklılık” parametresi için uygundur.

Farklı Kolon

Bölüm 3.2,2.1‘de belirtildiği gibi standart çözeltisi hazırlanır. Bu çözelti metodta belirtilen kolonda ve farklı lot numaralı kolonda analiz edilir. Sonuçlar başlangıç değeri ile kıyaslanır ve % değişim hesaplanır.

% Değişim = (Di – Df) / Di x 100

Df: Farklı bir lot numaralı kolon kullanılarak bulunan değer

Di: Başlangıçta bulunan değer

Çizelge 3. 33 Katkı maddeleri için metot dayanıklılık (farklı kolon % değişim)

	Başlangıç	**Farklı Kolon**	**% Değişim**
Asesülfam K Pik Alanı	503905	503244	0,13
Aspartam Pik Alanı	321247	320874	0,12
Kafein Pik Alanı	8707241	8614212	1,07
Sodyum Benzoat Pik Alanı	398512	395851	0,67

Kriter

Başlangıç değerinden değişim %2.0’den fazla olmamalıdır.

Sonuç

Başlangıç değerinden değişim Asesülfam K, Aspartam, Kafein ve Sodyum Benzoat için sırasıyla % 0,13, % 0,12, % 1,07, %.0,67‘ dir.

Yöntem farklı lot numaralı kolon kullanılarak çalışılan ‘‘metot dayanıklılık” parametresi için uygundur.

3.2.4 Yöntemin Farklı Marka Gazlı İçeceklere Uygulanması

Geliştirilen ve valide edilen UFLC yöntemi piyasada bulunan farklı marka gazlı içeceklere uygulandı. Elde edilen sonuçlar aşağıdaki tablolarda (çizelge 3.34, çizelge 3.35, çizelge 3.36) verilmiştir.

Çizelge 3. 34 Lighh Coca Cola örneğinin analizi

N	**Asesülfam K**	**Aspartam**	**Kafein**	**Sodyum Benzoat**
1	0,202	0,201	0,128	0,103
2	0,204	0,203	0,129	0,102
3	0,200	0,204	0,129	0,103
X_{ort}	0,202	0,203	0,129	0,103
S	0,200	0,153	0,058	0,058
%S	0,990	0,754	0,449	0,562

Çizelge 3. 35 Light pepsi örneğinin analizi

N	**Asesülfam K**	**Aspartam**	**Kafein**	**Sodyum Benzoat**
1	0,200	0,201	0,117	0,101
2	0,204	0,200	0,119	0,103
3	0,200	0,203	0,119	0,102
X_{ort}	0,201	0,201	0,118	0,102
S	0,231	0,153	0,115	0,100
%S	1,147	0,759	0,976	0,980

Çizelge 3. 36 Coca Cola Zero örneğinin analizi

N	**Asesülfam K**	**Aspartam**	**Kafein**	**Sodyum Benzoat**
1	0,204	0,201	0,129	0,103
2	0,204	0,201	0,129	0,100
3	0,200	0,203	0,127	0,102
X_{ort}	0,203	0,202	0,128	0,102
S	0,231	0,115	0,115	0,153
%S	1,140	0,573	0,900	1,502

BÖLÜM 4

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada gazlı içeceklerdeki Asesülfam Potasyum, Aspartam, Kafein ve Sodyum Benzoat'ın tek bir metot ile aynı anda tayini için basit, kısa analiz süreli, güvenilir ve geçerli bir UFLC yönteminin geliştirilmesi ve yöntemin validasyonunun yapılarak tüm gazlı içeceklerin analizinde uygulanabilirliğinin araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca bu yöntem her hangi bir ön ayırma veya türevlendirme işelemine gerek duyulmaması, minimum hazırlık basamağı ve süresi içermesi, minimum kimyasal malzeme (reaktif) sarfiyatına sebep olması açısından önemlidir.

Geliştirilen ve valide edilen UFLC metodunun piyasadaki diğer gazlı içeceklere uygulanması ile elde edilen sonuçlar metodun başarısını kanıtlamıştır.

Geliştirilen ve valide edilen UFLC metodu HPLC ye transfer edilerek her iki sistemde elde edilen sonuçlar karşılaştırılmış UFLC sisteminin daha avantajlı olduğu ve sistem seçiminin doğru olduğu görülmüştür.

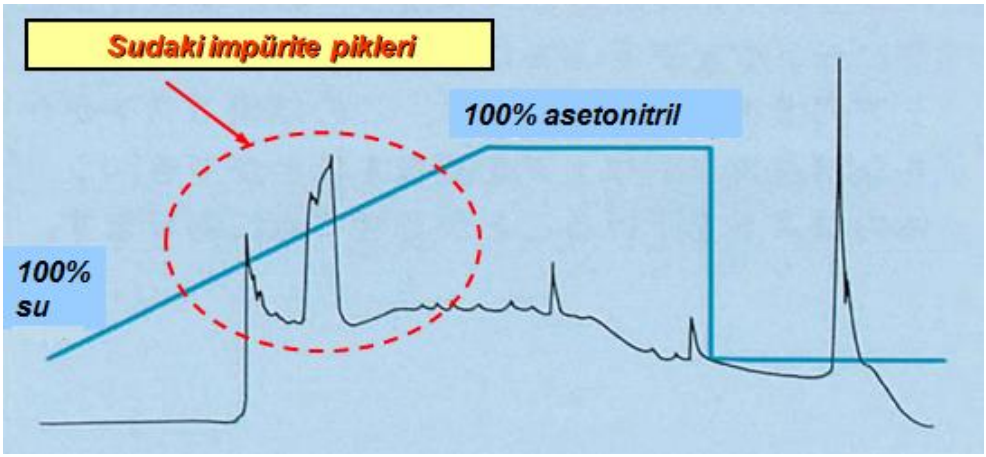
Metot Geliştirme Çalışmaları

HPLC-Grade Distile Su Etkisi:

Geliştirilen ve Bölüm 3.2.2.1 de verilen metodta hareketli faz ve seyreltme çözeltisi olarak Asetonitril (HPLC-grade): pH 3 Tampon çözelti (20:80 (h/h)) kullanılmıştır.

Su birçok organik ve inorganik maddeler, iyonik ve non iyonik maddeler, UV absorbent ve fluoresans maddeler içerir. pH 3 Tampon çözelti hazırlanırken HPLC-grade distile su kullanılmadığı durumda sisteme blank çözelti (seyreltme çözeltisi) enjekte edildiğinde

sudaki impüritelerin asetonitrilden ayrılarak kolonda tutunması sebebiyle hayalet pikler oluşturduğu görüldü.

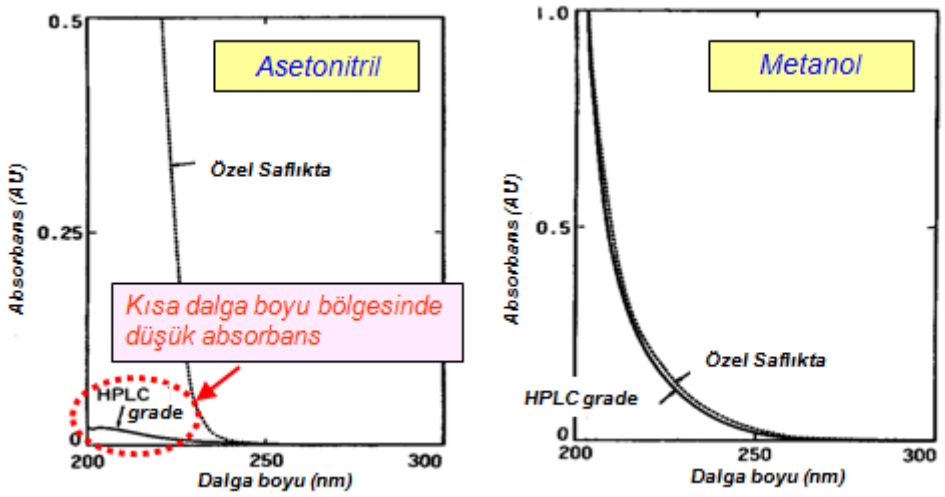


Şekil 4. 1 Sudaki impürite pikleri

HPLC-grade distile suyun kısa UV dalga boyunda absorbansı düşürdüğü, sudan gelebilecek impüriteleri minimuma indirdiği görüldü. Ayrıca sistemin ve kolonun şartlanma (baseline) süresini düşürdüğü, baselinedaki kayma ve hayalet pik oluşumunu minimuma indirdiği tespit edildi.

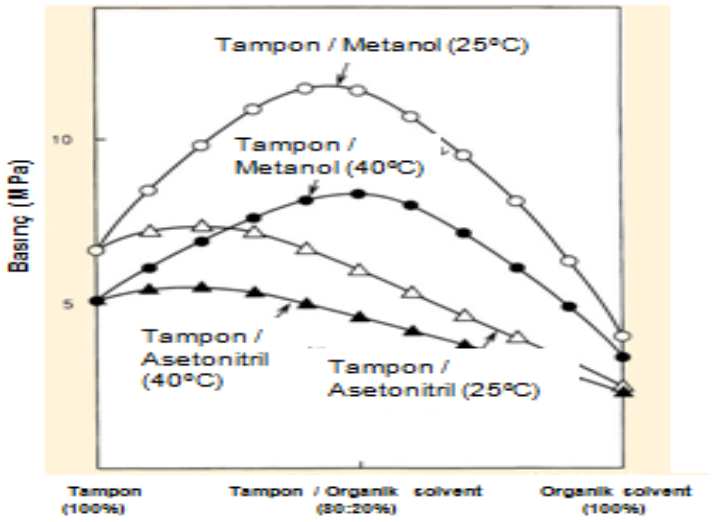
Organik Çözücü Etkisi:

Düşük absorbansa sahip olması nedeniyle mobil fazda HPLC-grade asetonitril kullanılmasının HPLC- grade metanole göre özellikle kısa dalda boyu (UV) aralığında çalışıldığında daha iyi sonuç verdiği görüldü.

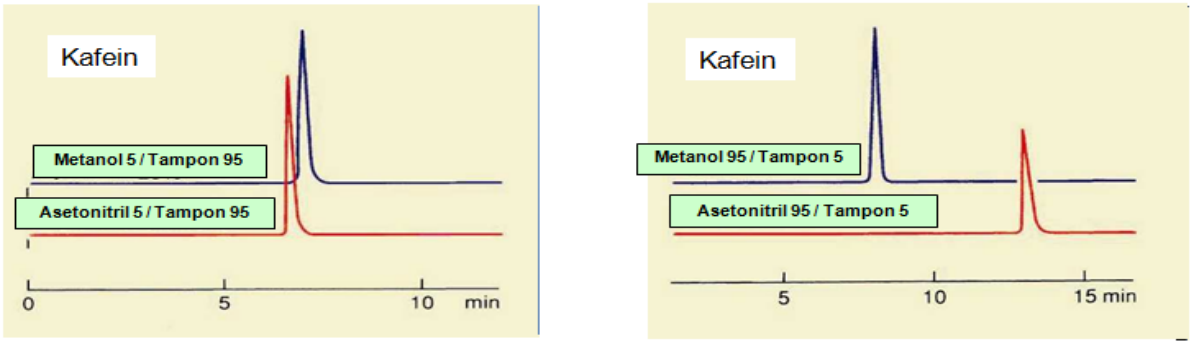


Şekil 4. 2 Asetonitril ve metanolün absorbansa etkisi

Asetonitril metanole göre düşük vizkoziteye sahip olduğundan mobil fazda asetonitril kullanımının aynı akış hızında kolon basıncının azalmasına ve bunun da analiz süresinin azalmasına sebep olduğu görüldü.



Şekil 4. 3 Mobil faz oranının kolon basıncına etkisi



Kolon: : ODS (75mmL. x 2mm ID)
Akış Hızı : 1.0 mL/min
Kolon Sıcaklığı : 30 °C
Dedektör : UV 214 nm

Şekil 4. 4 Mobil faz oranının kafeinin alıkonma zamanına etkisi

Kafein için genel olarak mobil fazdaki organik çözücü oranının alıkonma süresi ile ters orantılı olduğu görüldü.

Mobil fazdaki Asetonitril oranı arttırıldığında Kafein'in alıkonma zamanının arttığı, mobil fazdaki Metanol oranı değiştirildiğinde ise Kafein'in alıkonma zamanının önemli ölçüde değiştirmediği tespit edildi.

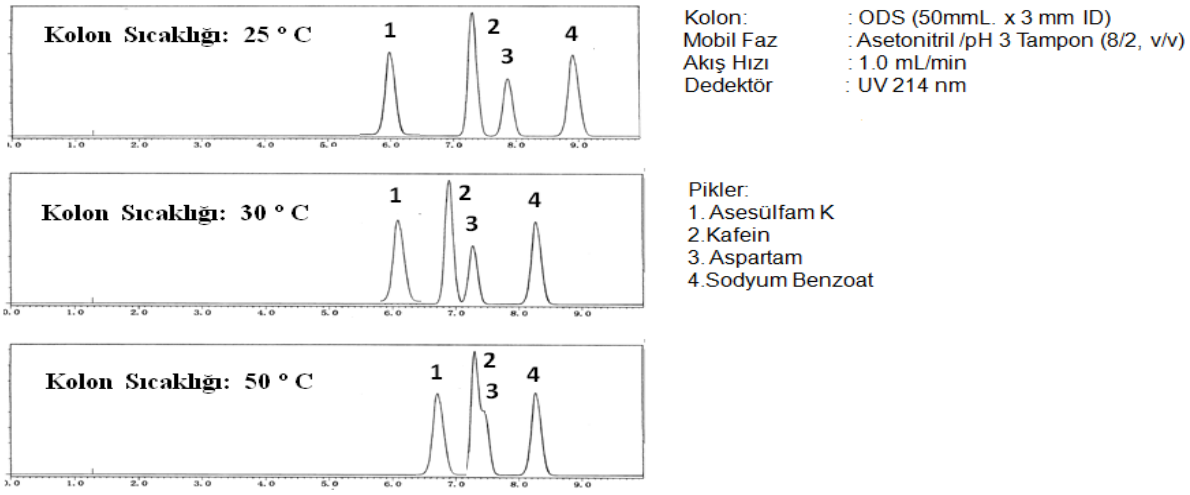
Mobil fazda Metanol kullanıldığında zayıf seçicilik ve pik şekilleri elde edildiği ve Asesülfam, Kafein, Aspartam ve Sodyum Benzoatın Asetonitrilde iyi çözündüğü için mobil fazda Asetonitril kullanılması tercih edildi.

Kolon Sıcaklığının Etkisi:

Kolon sıcaklığının arttırılması numune çözünürlüğünü ve kolon verimini arttırırken kolon iç basıncını düşürdüğü görüldü.

Kolon Sıcaklığının Seçiciliğe Etkisi:

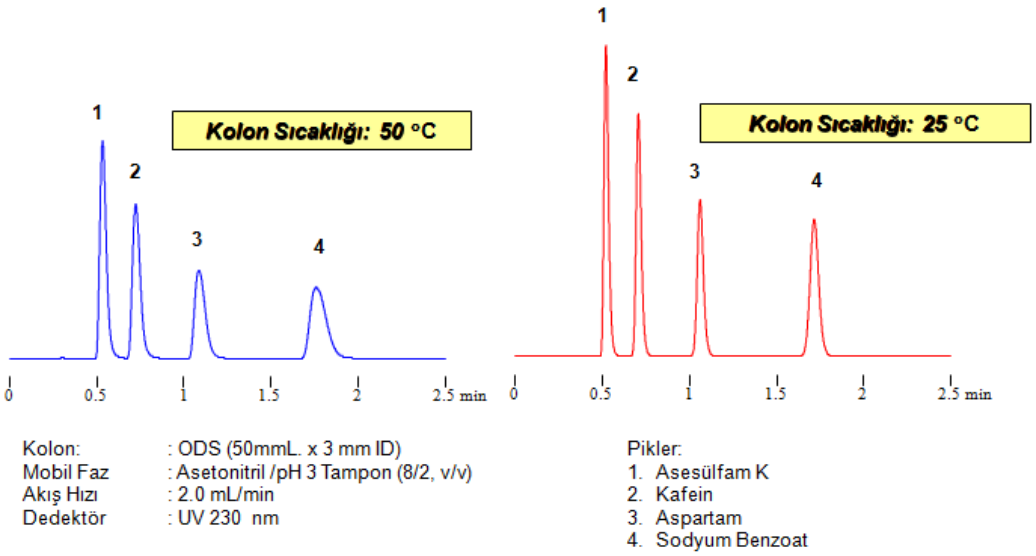
Aynı mobil faz kullaılarak yapılan çalışmalarda kolon sıcaklığının değiştirilmesi ile piklerin ayrılmasının sağlandığı tespit edildi.



Şekil 4. 5 Kolon sıcaklılığının seçiciliğe etkisi

Kolon Sıcaklığının Pik Şekline Etkisi:

Kolon sıcaklığı 50 ˚C olarak çalışıldığında 25 ˚C ye göre seçiciliği (piklerin ayrılmasını) azalttığı görüldü. Buna rağmen akış hızının arttırılması ile meydana gelen kolon iç basıncı artışını dengelemek için kolon sıcaklığının arttırılması tercih edildi.



Şekil 4. 6 Kolon sıcaklığının pik şekline etkisi

Validasyon Çalışmaları

Spesifiklik Kriterleri

Asesülfam K, Aspartam, Kafein ve Sodyum Benzoatın alıkonma zamanlarında başka pik görülmemiştir.

Doğruluk

Ortalama geri kazanım değerleri Asesülfam K, Aspartam, Kafein ve Sodyum Benzoat için sırası ile %98,88, %98,99, %99,36, %98,93'dir. Bu sonuca göre, %80, %100, %120 için % geri kazanım değerleri yeterlidir ve miktar tayini testi "doğruluk" metot validasyon parametresi uygundur.

Kesinlik

Cihaz Kesinliği ya da Enjeksiyon Tekrarlanabilirliği

Asesülfam K için pik alanının ve pik alıkonma zamanının bağıl standart sapması %0.07 ve %0.19, Aspartam için pik alanının ve pik alıkonma zamanının bağıl standart sapması %0.06 ve %0.28, Kafein için pik alanının ve pik alıkonma zamanının bağıl standart sapma değeri %0.02 ve %0.66, Sodyum Benzoat için pik alanının ve pik alıkonma zamanının bağıl standart sapma değeri %0.02 ve %0.06 olduğu için; yöntemin cihaz kesinliği ya da enjeksiyon tekrarlanabilirliği uygundur.

Metot Kesinliği

6 analiz sonucunun bağıl standart sapma değeri Asesülfam K, Aspartam, Kafein ve Sodyum Benzoat için sırası ile %0,31, %0,17, %0,21, %0,15'dir.

Yöntemin metot kesinliği uygundur.

Ara Kesinlik

Analist I ve cihaz I'den elde edilen sonuçların bağıl standart sapma değeri Asesülfam K, Aspartam, Kafein ve Sodyum Benzoat için sırası ile %0,12, %0,18, %0,25, %0,53'dir.
Analist II ve cihaz II'den elde edilen sonuçların bağıl standart sapma değeri Asesülfam K, Aspartam, Kafein ve Sodyum Benzoat için sırası ile %0,11, %0,19, %0,32, %0,44'dir.
12 analiz sonucunun bağıl standart sapma değeri Asesülfam K, Aspartam, Kafein ve Sodyum Benzoat için sırası ile %0,11, %0,18, %0,29, %0,47'dir
Yöntemin ara kesinliği uygundur.

Doğrusallık ve Çalışma Aralığı

Korelasyon katsayısı (r^2) Asesülfam K, Aspartam, Kafein ve Sodyum Benzoat için sırası ile 0,9999, 0,9996, 0,9994, 0,9998'dir.

100 % standar çözeltilerin 6 kez enjekte edilmesi ile elde edilen bağıl standart sapma değeri Asesülfam K, Aspartam, Kafein ve Sodyum Benzoat için sırası ile %0,07, %0,06, %0,02, %0,02'dir.

Yöntem miktar tayini testi için doğrusallık kriterine uyar.
Bu da gösterir ki geliştirilen miktar tayini yöntemi, etiket değerinin %60-140'ı konsantrasyonları arasında doğrusaldır.
Yöntemin doğrusallık parametresi uygundur.

LOD (Minimum Tayin Değeri) LOQ Minimum Saptama Değeri

Hesaplanan LOD değeri Asesülfam K, Aspartam, Kafein ve Sodyum Benzoat için sırası ile 1,6 µg/mL, 4,3 µg/mL, 3,9 µg/mL, 4,1 µg/mL'dir.
Hesaplanan LOQ değeri ise Asesülfam K, Aspartam, Kafein ve Sodyum Benzoat için sırası ile 5,2 µg/mL, 14,4 µg/mL, 12,9 µg/mL, 13,7 µg/mL'dir

Güvenilirlik

Çözelti Stabilitesi

Standart çözeltisi için 48. Saat başlangıç değerinden % değişim Asesülfam K, Aspartam, Kafein ve Sodyum Benzoat için sırası ile % 0,61, % 0,17, % 0,66, %.0,23 'tür.

Numune çözeltisi için 48. Saat başlangıç değerinden % değişim Asesülfam K, Aspartam, Kafein ve Sodyum Benzoat için sırası ile % 0,43,% 0,20, % 0,71,%.0,19 'dur.

Yöntemin çözelti stabilitesi uygundur.

Metot Dayanıklılık

Hareketli Fazın Oranı

Hareketli fazın oranı: 22:78 (h/h) olarak değiştirildikten sonra başlangıç değerinden değişim Asesülfam K, Aspartam, Kafein ve Sodyum Benzoat için sırası ile % 0,59, % 0,04, % 0,86, %.0,12 'dir.

Hareketli fazın oranı 18:82 (h/h) olarak değiştirildikten sonra başlangıç değerinden değişim Asesülfam K, Aspartam, Kafein ve Sodyum Benzoat için sırası ile % 0,47, % 0,22, % 0,07, %.0,18 'dir.

Yöntem hareketli fazın oranı değiştirilerek çalışılan " metot dayanıklılık" parametresi için uygundur.

Kolon Sıcaklığı

Kolon sıcaklığı 38 ˚C için başlangıç değerinden değişim Asesülfam K, Aspartam, Kafein ve Sodyum Benzoat için sırası ile % 0,26, % 0,51, % 0,16, %.0,28 'dir.

Kolon Sıcaklığı 42˚C için başlangıç değerinden değişim Asesülfam K, Aspartam, Kafein ve Sodyum Benzoat için sırası ile % 0,88, % 0,39, % 0,07, %.0,74 'dir.

Yöntem kolon sıcaklığı değiştirilerek çalışılan " metot dayanıklılık" parametresi için uygundur.

Farklı Kolon

Başlangıç değerinden değişim Asesülfam K, Aspartam, Kafein ve Sodyum Benzoat için sırası ile % 0,13, % 0,12, % 1,07, %.0,67 'dir.

Yöntem farklı lot numaralı kolon kullanılarak çalışılan ''metot dayanıklılık" parametresi için uygundur.

Yöntemin Farklı Marka Gazlı İçeceklere Uygulanması

Geliştirilen ve valide edilen UFLC yöntemi piyasada bulunan farklı marka gazlı içeceklere uygulandığında başarılı sonuçlar alınmıştır.

Geliştirilen ve Valide Edilen UFLC Metodun HPLC ye Taşınması ve Sonuçların Karşılaştırılması

Kromatografide performansın arttırılması için geliştirilen küçük boyutlu parçacıklara sahip analitik kolonlar HPLC sistemleri ile kombine olamamış ve geliştirilen UFLC sistemleri bu tip kolonlar ile etkin biçimde kullanım alanı bulmaya başlamıştır. UFLC sistemleri dizayn edilmeden önce HPLC ile yapılan analiz metotlarının daha verimli çalışabilmesi için kullanıla gelen HPLC metotlarının UFLC sistemlerine taşınması gerekli hale gelmiştir.

Bölüm 3.2.2.1 deki yöntem sadece akış hızı enjeksiyon hacmi ve kullanılan kolon değiştirilerek HPLC ye taşınmış, standart çözeltisi UFLC ve HPLC kromatografik sistemlerine 10'ar defa enjekte edilmiştir.

Her iki sistemde yapılan çalışma karşılaştırıldığında UFLC sisteminin 8 kat daha hızlı, solvent tüketiminin de 8 kata kadar azaldığı görülmüştür.

Çizelge 4. 1 HPLC ve UFLC sistemlerinin kromatografi şartları

	HPLC	**UFLC**
Kolon	C18, 4.0mmX125mm, 5 µm	ODS 75 mm x 2.0 mm x 2.2 µm
Akış Hızı	0.6 ml/dk	1.5 ml/dk
Enjeksiyon Hacmi	10 µl	1 µl
Analiz Süresi	25 dk	3 dk
Solvent Tüketimi	20.7 ml	1.58 ml

Çizelge 4. 2 HPLC ve UFLC sistemi ile elde edilen sonuçların sisteme uygunluk parametreleri

Sistem Uygunluk Parametresi	**Asesülfam K**	**Kafein**	**Aspartam**	**Sodyum Benzoat**
Teorik plaka sayısı (N)				
HPLC	3397	3178	4163	5462
UFLC	1080	2143	3604	4959
HETP				
HPLC	36.80	58.33	36.68	25.21
UFLC	46.30	23.33	13.87	10.08
Simetri faktörü (α)				
HPLC	1.20	1.11	41.20	0.98
UFLC	1.15	1.14	1.06	1.03
Tekraredilebilirlik (%RSD) (Alıkonma zamanı)				
HPLC	0.92	0.76	0.23	0.25
UFLC	0.06	0.05	0.06	0.07
Tekraredilebilirlik (%RSD) (Alan)				
HPLC	0.93	0.68	0.25	0.27
UFLC	1.13	0.34	0.29	0.48

HPLC'de ve UFLC' de çalışılan metot ile elde edilen verilerin karşılaştırılması sonucunda UFLC sisteminin sağladığı avantajlar belirgin olarak görülmüştür. Kromatografik temeller değiştirilmeden hız, hassaslık ve ayrışma değerlerinde belirgin artış görülmüştür.

Verim değerlerinin artışı HETP ve teorik plaka sayısı değerlerinin karşılaştırılması sonucunda belirgin biçimde görülebilmektedir. Bu noktadan bakıldığında, kompleks formülasyonların belirlenmesinde büyük avantaj sağlamaktadır. UFLC'nin en belirgin

avantajı analiz süresinin azalması buna bağlı olarak da solvent tüketiminin azalışıdır ve literatürde solvent tüketiminin %80'e kadar azaldığı görülmüştür. Analiz süresinin ve buna bağlı olarak solvent tüketiminin azalması birçok laboratuar için maliyet azaltıcı bir etkendir. Ayrıca, literatürdeki metot geliştirme çalışmaları süresince yapılan birçok deneme UFLC ile kısa sürede tamamlanabilir hale gelmiş, HPLC sistemlerine göre yüksek oranda zaman ve solvent tasarrufu gösterdiği görülmüştür.

UFLC sisteminin sağladığı basınç değerleri ile 3,5 µm'dan küçük parçacık boyutuna sahip analitik kolonların kullanımını uygun hale gelmiştir. Gelişen kolon teknolojisi ile azaltılmış uzunluk ve küçük parçacık boyutuna sahip analitik kolonların üretiminin, ticari olarak elde edilebilirliğinin olanaklı hale gelmesi ve göstermiş olduğu avantajlar sebebiyle de bu tip kolonların kullanımı yaygınlaşmakta olup bu kolonların işleyebilmesini sağlayan, HPLC sistemlerine göre gelişmiş yapıdaki UFLC sistemlerin kullanımı gerekli hale gelmiştir.

Tek olumsuzluk olarak, UFLC sistemindeki yüksek basıncın kolon ömrünü azaltıcı yönde etki edebileceği görülmüştür.

KAYNAKLAR

[1] TS EN 12856, (2003). Gıda Maddeleri-Asesulfam K, Aspartam ve Sakarin Tayini Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografik Yöntem, TSE, I. Baskı, Ankara.

[2] Sergio, A., Salvador, G., Miguel, G., (2004). ‘‘FTIR Determination of Aspartame and Acesulfame-K in Tabletop Sweeteners’’, J. Agric. Food Chem., 52: 26.

[3] Aboul-Enein, H. Y., Bakr, S.A., (2004). ‘‘Comparative Study of The Separation and Determination of Aspartame and Its Decomposition Products in Bulk Material and Diet Soft Drinks By HPLC and CE’’, J. Lıq. Chrom. & Rel. Technol., 20(9): 1437-1444.

[4] Santini, A.O., Lemos, S.C., Pezza, H.R., Carloni-Filho, J.O., Pezza, L., (2008). ‘‘Development of a Potensiometric Sensor for the Determination of Saccharin in Instant Tea Powders, Diet Soft Drinks and Strawberry Dietetic Jam’’, Microchemical Journal, 90(2): 124-128.

[5] Coppini, D., Albasini, A., (1968)., Mitt. Geb. Lebensmittelunters. Hyg., 59: 239.

[6] Zhu, Y., Guo, Y. ve Ye, M., (2005). ‘‘Separation and Simultaneous Determination of Four Artificial Sweeteners in Food and Beverages by Ion Chromatography’’, J. Chromatogr. A, 1085: 143–146.

[7] Idris, M., Srivastava, S., Baggi, T. R., Shukla, S. K., (2010). ‘‘High-Performance Thin-Layer Chromatography Analysis of Saccharin in Foods and Beverages’’, Journal of Planar Chromatography, 23(5): 339–342.

[8] Sherma, J., Chapin, S., Follenweiler, J., (1985). ‘‘Quantitative TLC Determination of Aspartame in Beverages’’, Americ. Lab., 17(3): 131-133.

[9] Cakar, M., Gordana, P., (2006). ‘‘Determination of Saccharin in Pharmaceuticals by High Performance Thin Layer Chromatography’’, J. Serb. Chem. Soc., 71(6): 669– 676.

[10] Altuğ, T., Elmacı, Y., (2001). Gıda Katkı Maddeleri ve Tatlandırıcılar, Meta Basım, İzmir.

[11] Altuğ, T., (1999). ‘‘Gıda Katkı Maddeleri’’, Hekim ve Yaşam Dergisi, 29-31.

[12] Altuğ, T., (2009). Gıda Katkı Maddeleri, Sidas Medya Ltd. Sti., İzmir.

[13] Küçüköner, E. (2006) . Yeni Ürün Gelistirmede Gıda Katkı Maddelerinin Fonksiyonları ve Önemi. GIDA 31 (3): 175-181.

[14] Yurttagül, M., Ayaz, A., (2008). Katkı Maddeleri: Yanlışlar ve Doğrular, Hacettepe Üniversitesi-Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Ankara.

[15] Çalışır, Z. E., Çalışkan, D., (2003). ‘‘Gıda Katkı Maddeleri ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri’’, Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi, 32: 207-206.

[16] İnanç, A. L., Çınar, İ., (2009). ‘‘Alternatif Doğal Tatlandırıcı Stevya’’, Gıda Dergisi, 6: 411-415.

[17] Nabors, L. B., (2001). Alternative Sweeteners, Food Trade Press Ltd., USA.

[18] Low-Calorie & No-Calorie Sweeteners, www.thenibble.com, 15 Aralık 2014.

[19] Yılmaz, N., (2007). Yapay Tatlandırıcılar ve Gıda Sanayinde Kullanımları, Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa.

[20] Tatlandırıcılar, http://gida.mersin.edu.tr/Gm324/Kafein.Pdf ,17 Haziran 2013

[21] Tatlandırıcılar, www.hammadeler.com, 15 Mayıs 2013

[22] Lorenzo, R.A., Pena, M.T., Fernandez, P., Gonz_alez, P., Carro, A. M., (2015). ‘‘Artificial Sweeteners in Beverages by Ultra Performance Liquid Chromatography with Photodiode Array and Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry’’, Food Control, 47: 43-52.

[23] Ordoñez, E. Y., Rodil, R., Quintana, J. B., Cela, R., (2015). ‘‘Determination of Artificial Sweeteners in Beverages with Green Mobile Phases and High Temperature Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry’’, Food Chemistry, 169:162–168.

[24] Wu, M., Qian, Y., Boyd, J. M., Hrudey, S. E., Le, X. C., Li, X. F., (2014). ‘‘Direct Large Volume Injection Ultra-High Performance Liquidchromatography-Tandem Mass Spectrometry Determination Ofartificial Sweeteners Sucralose and Acesulfame in Well Water’’, Journal of Chromatography A, 1359: 156–161.

[25] Chang, C.S., Yeh, T.S., (2 0 1 4). ‘‘Detection of 10 Sweeteners in Various Foods by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry’’, Journal of Food and Drug Analysis, 22: 318-328.

[26] Bruno, S. N.F., Cardoso, C. R., Maciel, M. M. A., Vokac, L., Junior, A. I. S., (2014). ‘‘Selective Identification and Quantification of Saccharin by Liquid Chromatography and Fluorescence Detection’’, Food Chemistry, 159: 309–315.

[27] Sun, J.P., Han, Q., Zhang, X.Q., Ding, M.Y., (2014). ‘‘Investigations on the Degradation of Aspartame Using High-Performance Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry’’, Chinese Chemical Letters, 25: 1259–1264.

[28] Grembecka, M., Baran, P., Błazewicz, A., Fijałek, Z., Szefer, P., (2014). ‘‘Simultaneous Determination of Aspartame, Acesulfame-K, Saccharin, Sitric Acid and Sodium Benzoate in Various Food Products Using HPLC–CAD–UV/DAD’’, Eur Food Res Technol, 238: 357–365.

[29] Lim, H.S., Park and Kwak, I., (2013). '' HPLC-MS/MS Analysis of 9 Artificial 179 Sweeteners, Imported Foods'', Food Science and Biotechnology, 22(1): 233-240.

[30] Yan, Q., Yang L., Ma. X., and Feng H., (2013). ''Simultaneous Determination Of Six Food Additives in Drinks by High Performance Liquid Chromatography Coupled to Diode Array Detector Detection'', Journal of the Chem. Society of Pakistan, 35(4): 1060-1065.

[31] Sik, B., (2012). ''Development and Validation of a Green High Performance Liquid Chromatographic Method for the Determination of Some Artificial Sweeteners and Caffeine in Soft Drinks'', Food Anal. Methods, 5: 1443–1452.

[32] Ma, K., Yang, Y., Jiang, X., Zhao, M., Cai, Y. Q., (2012). ''Simultaneous Determination of 20 Food Additives by High Performance Liquid Chromatography with Photo-Diode Array Detector'', Chinese Chemical Letters, 23: 492–495.

[33] Mohd, I., Varshney, K. M., Sudhakar, P., Shukla, S.K., Baggi, T. R., (2012). '' HPLC Determination Of Aspartame in Tabletop Sweeteners by Precolumn Derivatization Using 2,4-Dinitrofluorobenzene'', Academic Science, 4(1): 975.

[34] Grembecka, M., Szefer, P., (2012). ''Simultaneous Determination of Caffeine and Aspartame in Diet Supplements and Non-Alcholic Beverages Using Liquid Chromatography Coupled To Corona CAD And UV-DAD Detectors'', Food Anal. Methods, 5: 1010-1017.

[35] Serdar, M., Kneževic, Z., (2011). ''Determination of Artificial Sweeteners in Beverages and Special Nutritional Products Using High Performance Liquid Chromatography'', Arh Hig Rada Toksikol, 62: 169-173.

[36] Kritsunankul, O., Jakmunee, J., (2011). '' Simultaneous Determination of Some Food Additives in Soft Drinks and Other Liquid Foods by Flow Injection On-line Dialysis Coupled to High Performance Liquid Chromatography'', Talanta, 84: 1342–1349.

[37] Cheng, C., Wu, S.C., (2011). ''Simultaneous Analysis of Aspartame and Its Hydrolysis Products of Coca-Cola Zero by On-line Postcolumn Derivation Fluorescence Detection and Ultraviolet Detection Coupled Two-Dimensional High Performance Liquid Chromatography'', Journal of Chromatography A, 1218: 2976–2983.

[38] Ree, M., Stoa, E., (2011). '' Simultaneous Determination of Aspartame, Benzoic Acid, Caffeine and Saccharin in Sugar-Free Beverages Using HPLC'', Concordia College Journal of Analytical Chemistry, 7(4): 73-77.

[39] Nieland, B., Lock, S., (2011). '' The Quantitation and Identification of Coccidiostats in Food by LC-MS/MS Using the AB SCIEX 4000 Q TRAP System'', Food Chem., 54: 3062–3022.

[40] UPFLC, www.perkinelmer.com, 09 Mayıs 2014.

[41] Zygler, A., Wasik, A., Namieśnik, A., (2011), '' Determination of Nine High-Intensity Sweeteners in Various Foods by High Performance Liquid

Chromotograhy with Mass Spectrometric Detection'', Anal Bioanal Chem, 400(7): 2159-2172.

[42] George, V., Arora, S., Wadhwa, B. K., Singh, A. K., (2010). '' Analysis of Multiple Sweeteners and Their Degradation Products in Lassi by HPLC and HPTLC Plates'', Food Science Technology, 47(4): 408–413.

[43] Yang, D., Chen, B., (2009). ''Simultaneous Determination of Nonnutritive Sweeteners in Foods by HPLC/ESI-MS'', Food Chem., 57: 3022–3027.

[44] Zygler, A., Wasik, A., Namiesnik, J., (2009). ''Analytical Methodologies for Determination of Artificial Sweeteners in Foodstuffs'', Trends in Analytical Chemistry, 28: 9-209.

[45] Ji, C., Sun, Y., Li, X., Chu, X., Chen, Z., (2009). '' Simultaneous Determination of Artificial Sweeteners in Beverage by Ultra Performance Liquid Chromotography'', 27(1):111-3.

[46] Trandafir, I., Nour, V., Ionica, E. M., (2009). ''Develooment and Validation of HPLC Method for Simultaneous Quantification of Asesülfam-K, Saccharin, Aspartam, Caffeine and Benzoic Acid in Cola Soft Drinks'', Scientific Study&Research, 2: 1582.

[47] Yang, D., Chen, B., (2010). '' Determination of Neotame in Beverages, Cakes and Preserved Fruits by Column-Switching High-Performance Liquid Chromatography'', Food Additives and Contaminants, 27 (9): 1221–1225.

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

[49] Çelebi, B., (2010). Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi İçin İmmobilize Enzim Reaktörlerinin Geliştirilmesi ve Kinetik Karakterizasyonu, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

[50] UFLC, http://www.antteknik.com, 08 Mart 2014.

[51] Villiers, A., Lestremau, F., Szucs, R., Gelebart, S., David, F., Sandra, P., (2006). ''Evaluation of Ultra Performance Liquid Chromatography, Part I. Possibilities and Limitations'', Journal of Chromatography A, 1127: 60-69.

[52] Yamashita, T., Dohta, Y., Nakamura, T., Fukami, T,. (2008). ''High-Speed Solubility Assay Using Ultra-Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry in Drug Discovery'', Journal of Chromatography A, 1182: 72-76

[53] Villiers, A., Lynen, F., Sandra, P., (2009). ''Effect of Analyte Properties on The Kinetic Performance of Liquid Chromatographic Separations'', Journal of Chromatography A, 1216: 3431-3442.

[54] Wren, S., Tchelitcheff, P., (2006). ''Use of Ultra-Performance Liquid Chromatography in Pharmaceutical Development'', Journal of Chromatography A, 1119:140-146.

[55] Guillarme, D., Nyugen, D., Rudaz, S., Veuthey, J., (2007). ''Method Transfer for Fast Liquid Chromatography in Pharmaceutical Analysis: Application to Short

Columns Packed With Small Particle. Part I: Isocratic Seperation'', European Journal of Pharmaceutics and Biopharmeceutics, 66: 475-482.

[56] Fekete, S., Ganzler, K., Fekete, J., (2010). ''Facts and Myths About Columns Packed With Sub-3µm and sub-2µm Particles'', Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 51: 56-64.

[57] Guillarme, D., Nguyen, D., Rudaz, S., Veuthey, J., (2007). ''Recent Developments in Liquid Chromatography—Impact on Qualitative and Quantitative Performance'' Journal of Chromatography A, 1149: 20-29.

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

[59] UHPLC, www.teaching.shu.ac.uk, 8 Ekim 2010.

[60] Michael, E., Swartz, D., Ph.D, (2005). Ultra Performance LC Separation Science Redefined, Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC): An Introduction, Waters Corporation, USA.

[61] Guillarme, D., Nguyen, D., Rudaz, S., Veuthey, J., (2008). ''Method Transfer for Fast Liquid Chromatography in Pharmaceutical Analysis: Application to Short Columns Packed with Small Particl'', European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 68: 430-440.

[62] Chen, S., Kord, A., (2009). ''Theoretical and Experimental Comparison of Mobile Phase Consumption Between Ultra High Performance Liquid Chromatography and High Performance Liquid Chromatography'', Journal of Chromatograhy A, 1216:6204-6209.

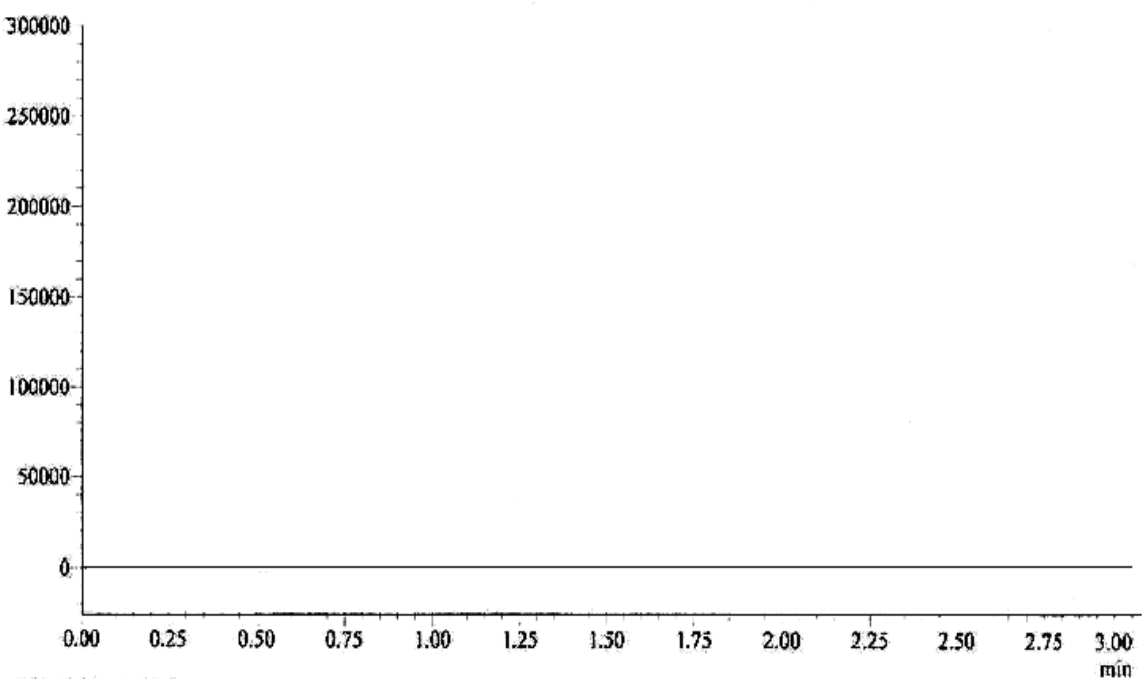
[63] Yang, Y., Hodges, C.C., (2005). Ultra Performance LC Separation Science Redefined, Assay Transfer from HPLC to UPLC for Higher Analysis Throughput, Waters, USA.

[64] Novakova, L., Matysova, L., Solich, P., (2006). ''Advantages of Application of UPLC in Pharmaceutical Analysis'', Talanta, 68: 908-918.

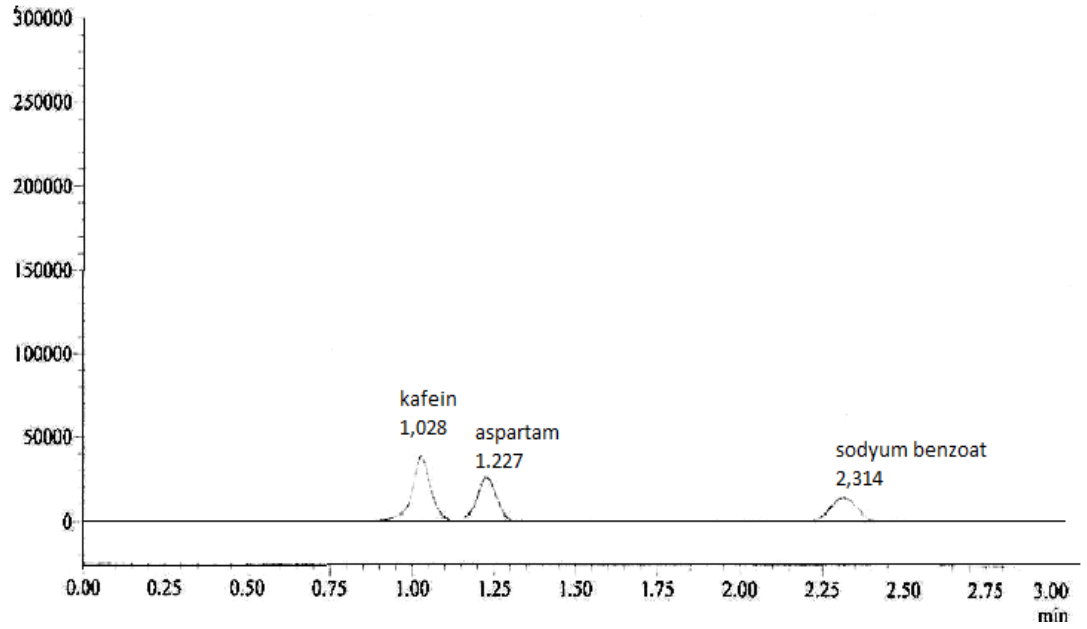
[65] Ertaş, Ö., Kayalı, A., (2005). ''Analitik Yöntem Geçerliliğine Genel Bir Bakış'', Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi, 34 (1): 41-57.

EK-A

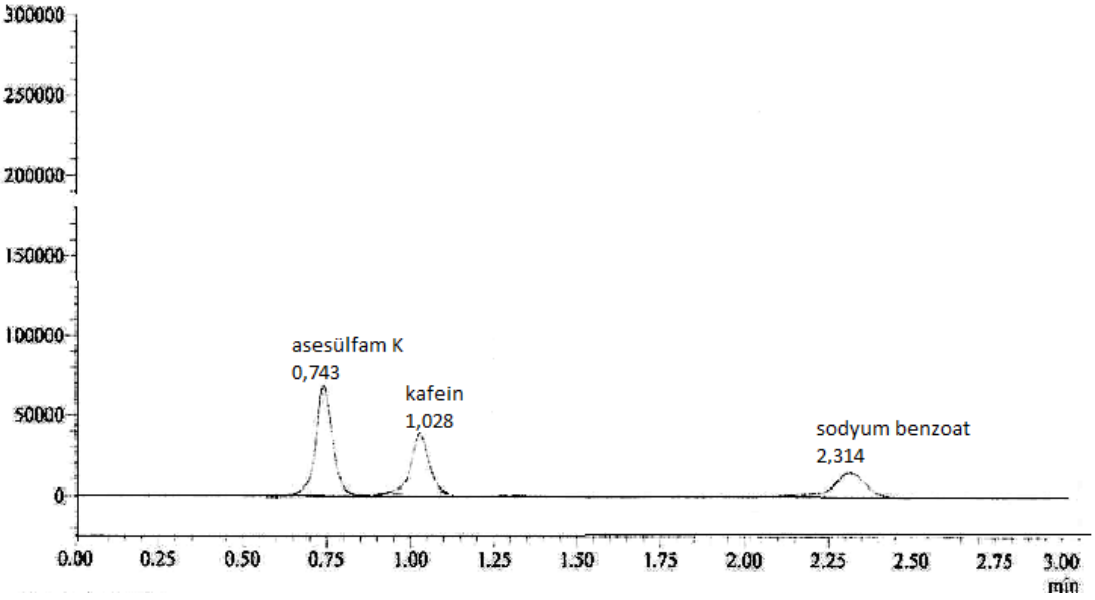
SPESİFİKLİK KROMATOGRAMLARI



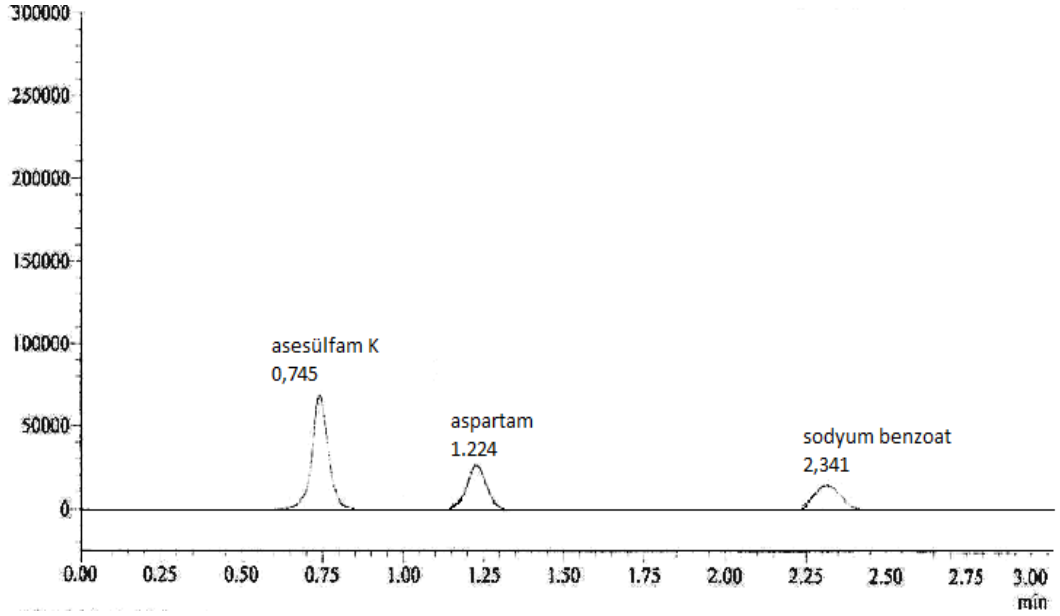
Şekil EK- A. 1 Çözücü (hareketli faz) kromatogramı



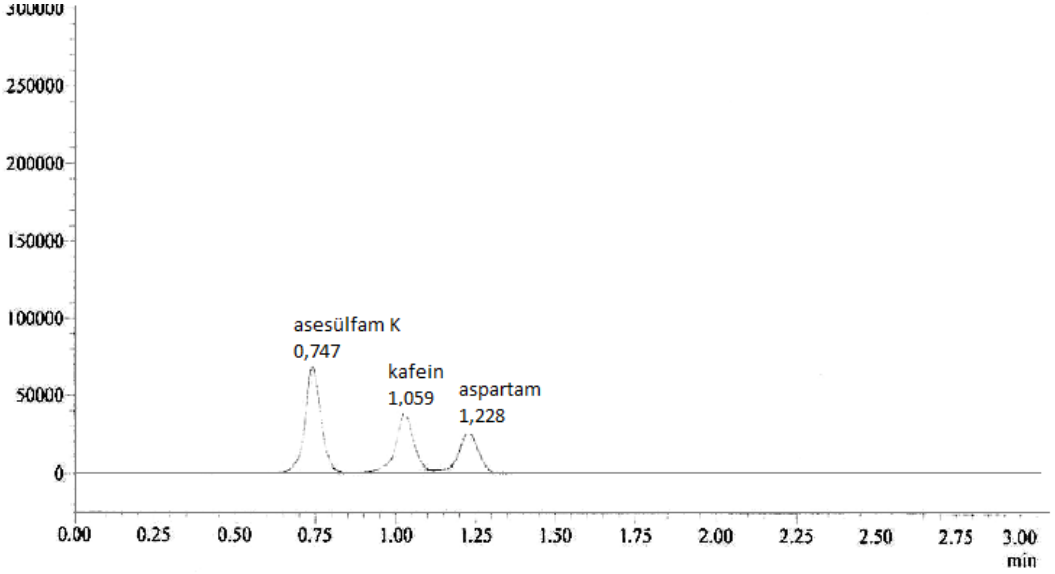
Şekil EK- A. 2 Asesülfam K için plasebo çözeltisi kromatogramı



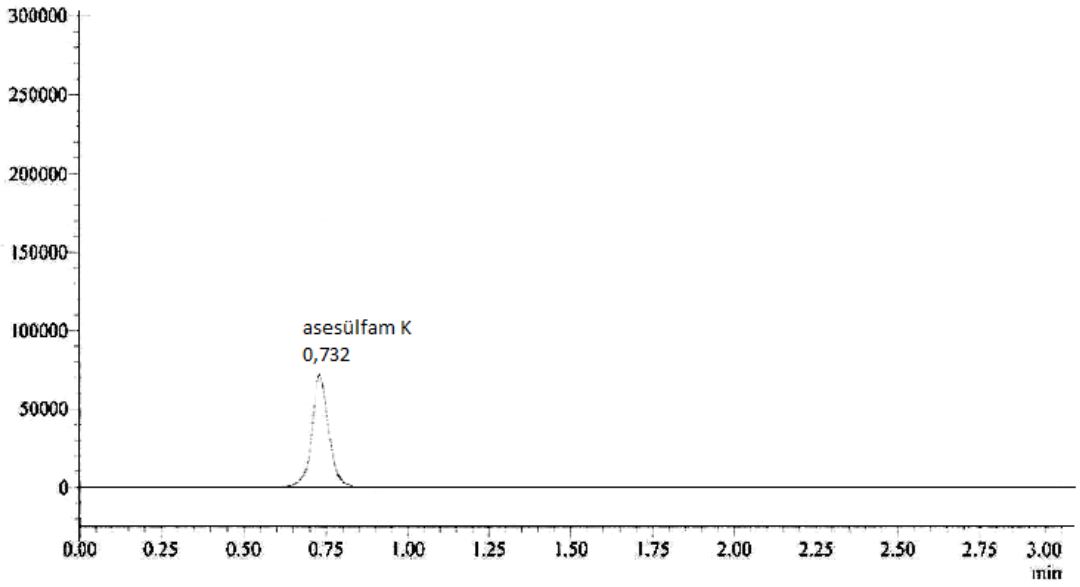
Şekil EK- A. 3 Aspartam için plasebo çözeltisi kromatogramı



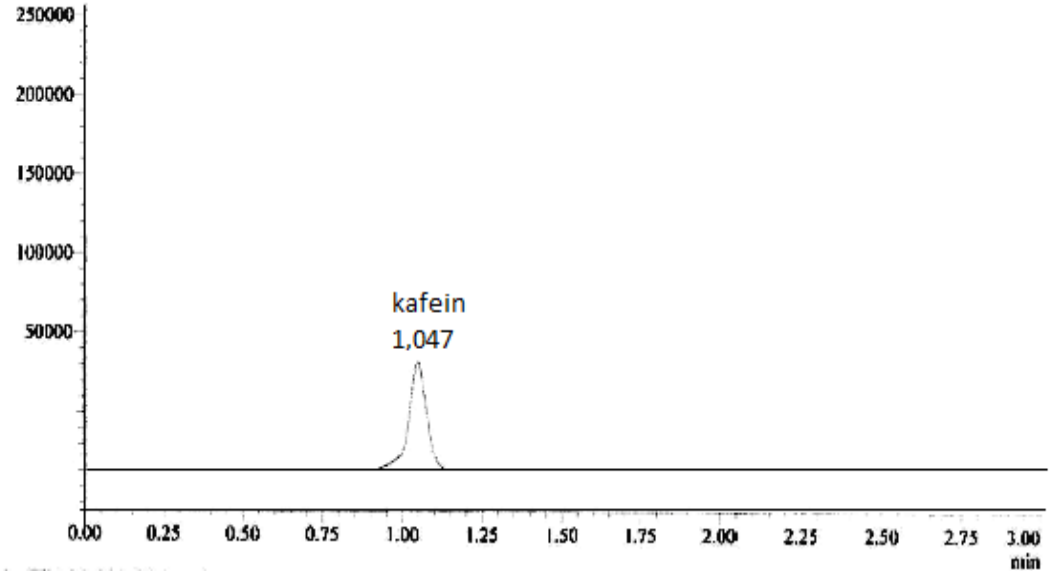
Şekil EK- A. 4 Kafein için plasebo çözeltisi kromatogramı



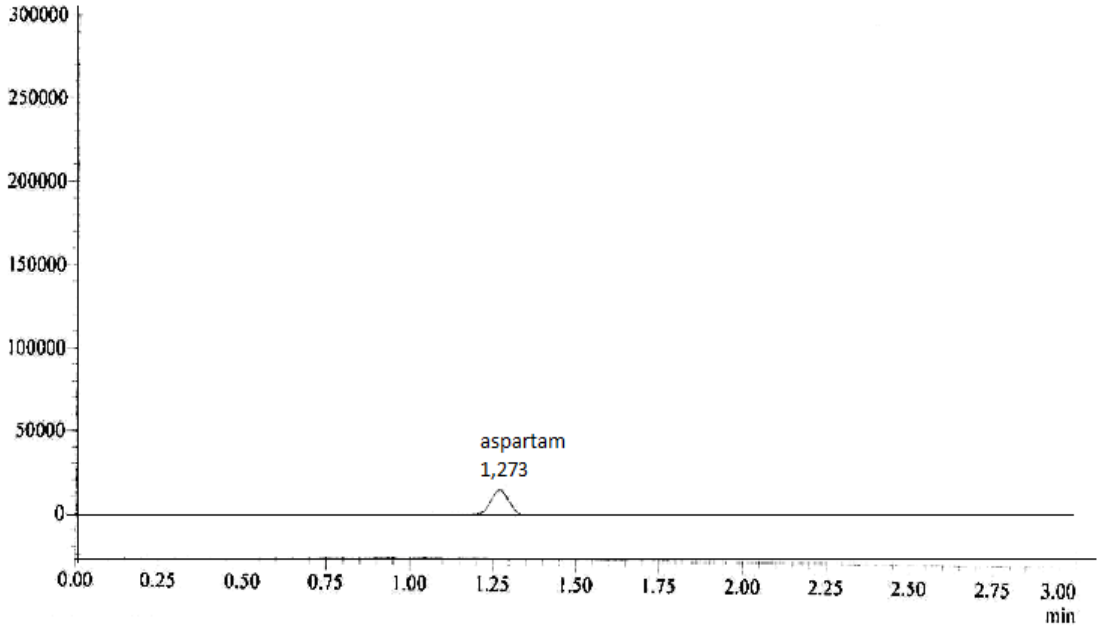
Şekil EK- A. 5 Sodyum benzoat için plasebo çözeltisi kromatogramı



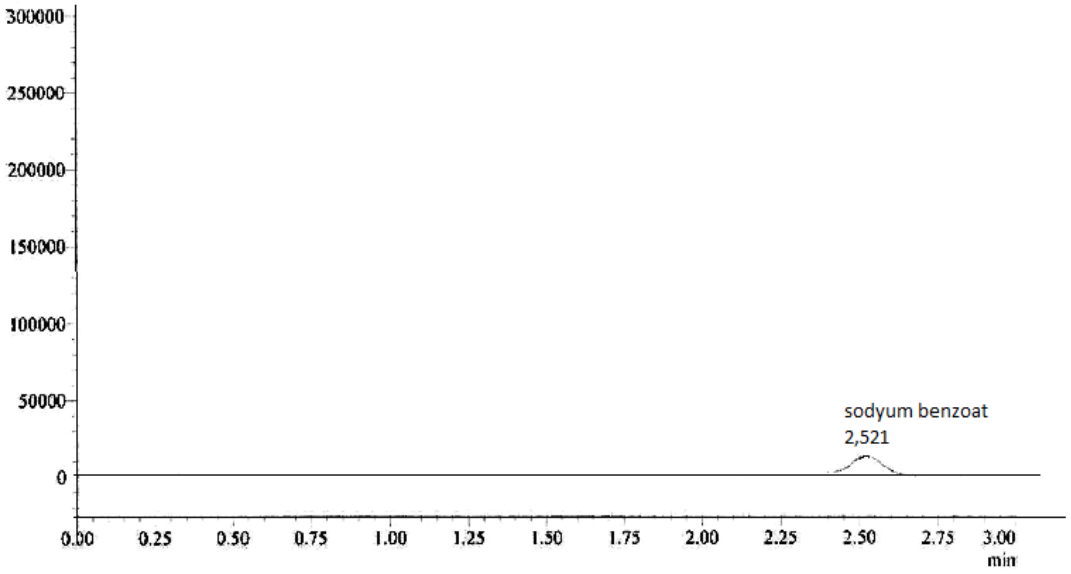
Şekil EK- A. 6 Asesülfam K standart çözeltisi kromotogramı



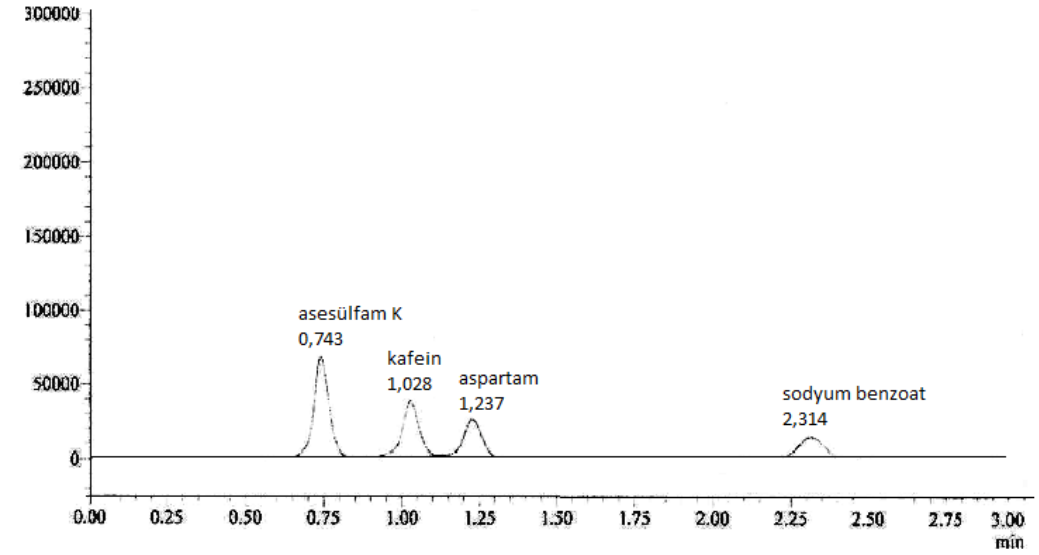
Şekil EK- A. 7 Kafein standart çözeltisi kromotogramı



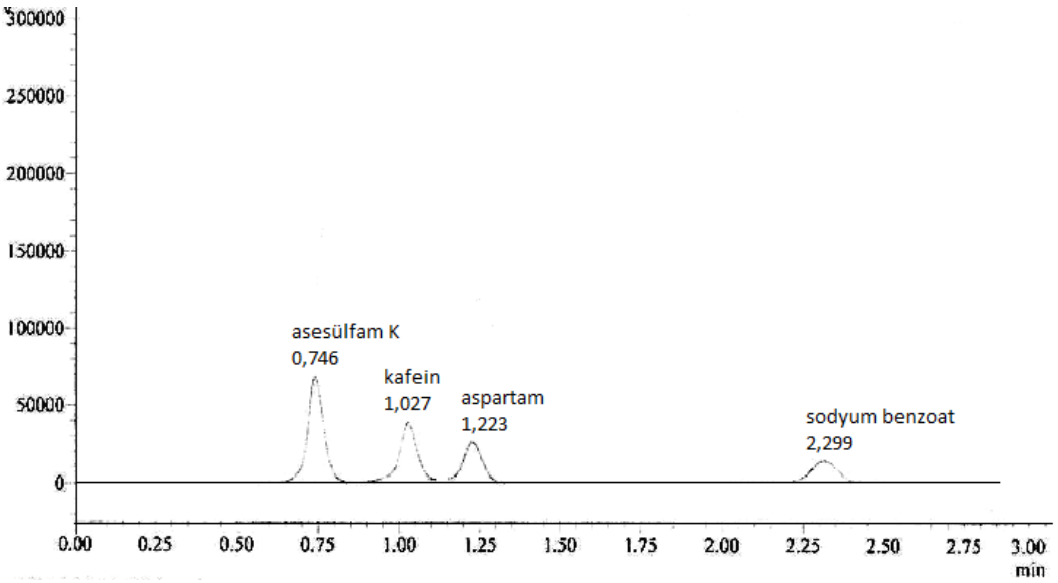
Şekil EK- A. 8 Aspartam standart çözeltisi kromotogramı



Şekil EK- A. 9 Sodyum benzoat standart çözeltisi kromotogramı



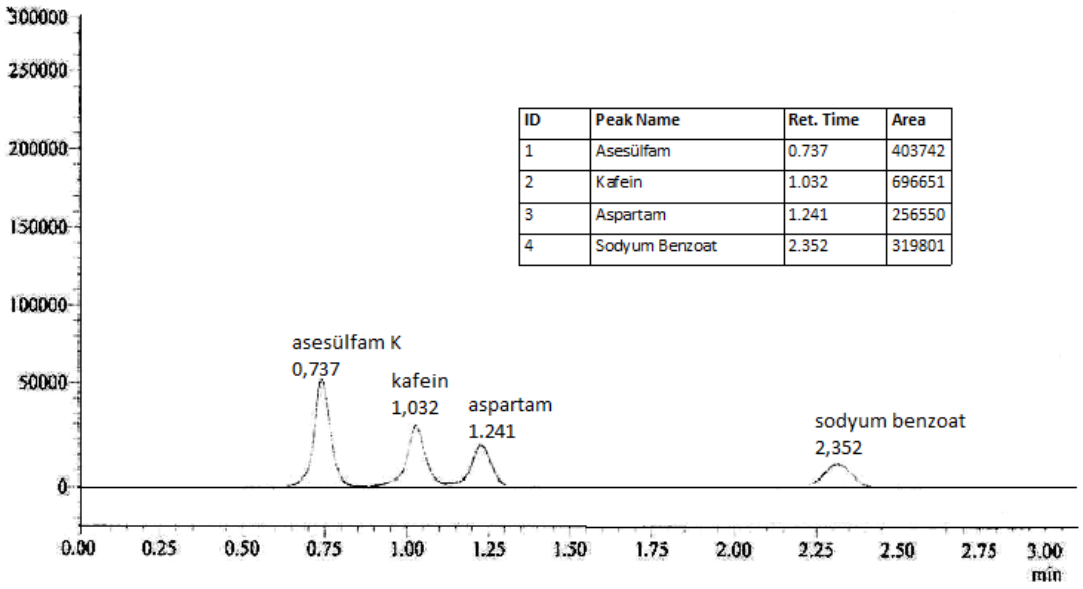
Şekil EK- A. 10 Miktar tayinindeki numune çözelti kromotogramı



Şekil EK- A. 11 Miktar tayinindeki standart çözelti kromotogramı

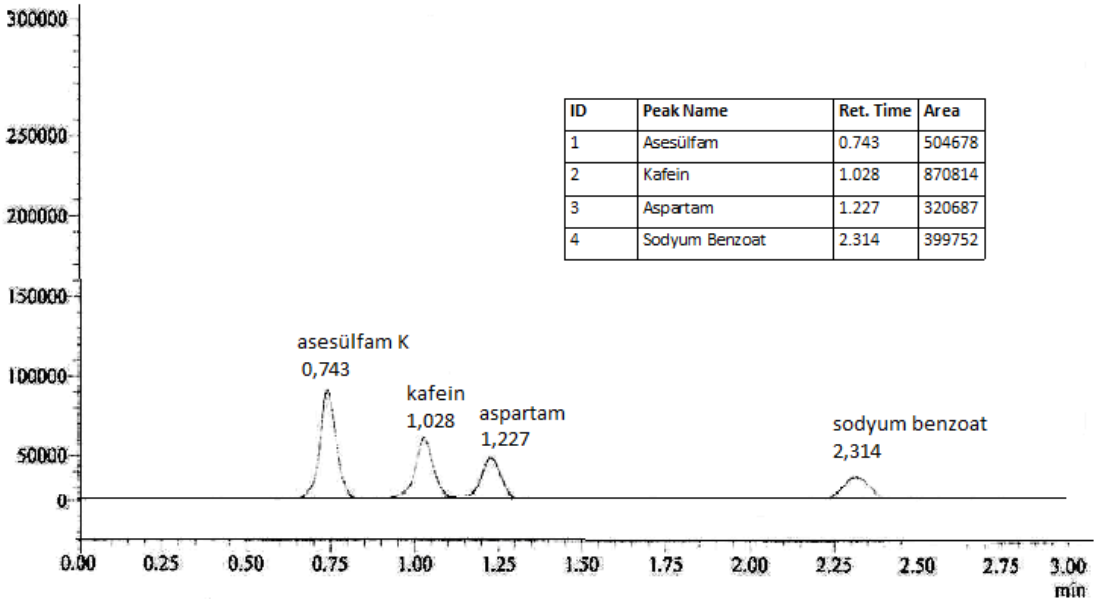
EK-B

DOĞRULUK KROMATOGRAMLARI



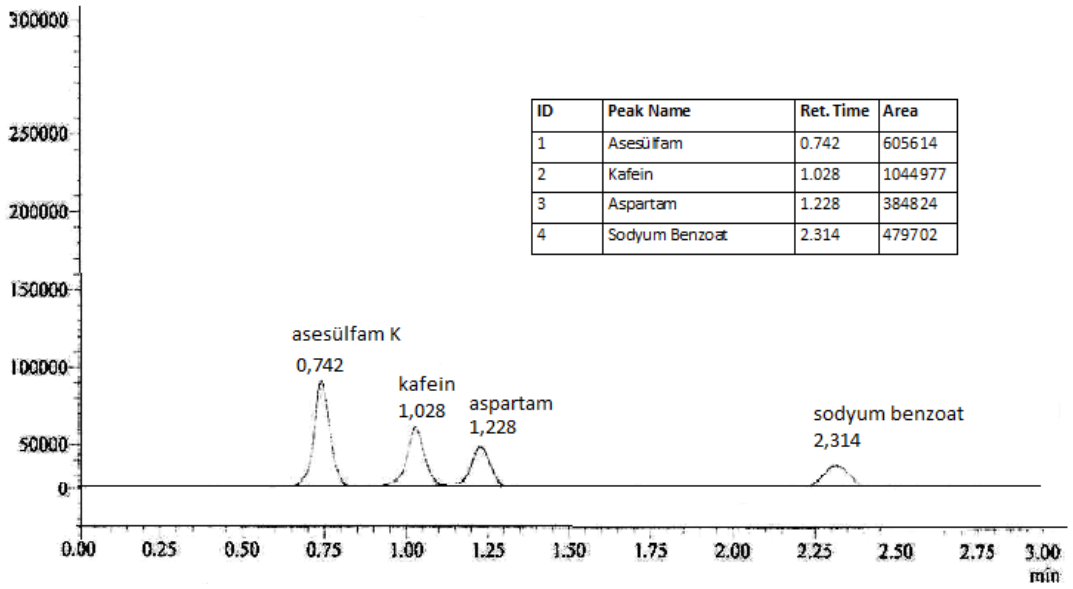
ID	Peak Name	Ret. Time	Area
1	Asesülfam	0.737	403742
2	Kafein	1.032	696651
3	Aspartam	1.241	256550
4	Sodyum Benzoat	2.352	319801

Şekil EK- B. 1 % 80'lik numune çözeltisi kromatogramı



ID	Peak Name	Ret. Time	Area
1	Asesülfam	0.743	504678
2	Kafein	1.028	870814
3	Aspartam	1.227	320687
4	Sodyum Benzoat	2.314	399752

Şekil EK- B. 2 %100'lük numune çözeltisi kromatogramı

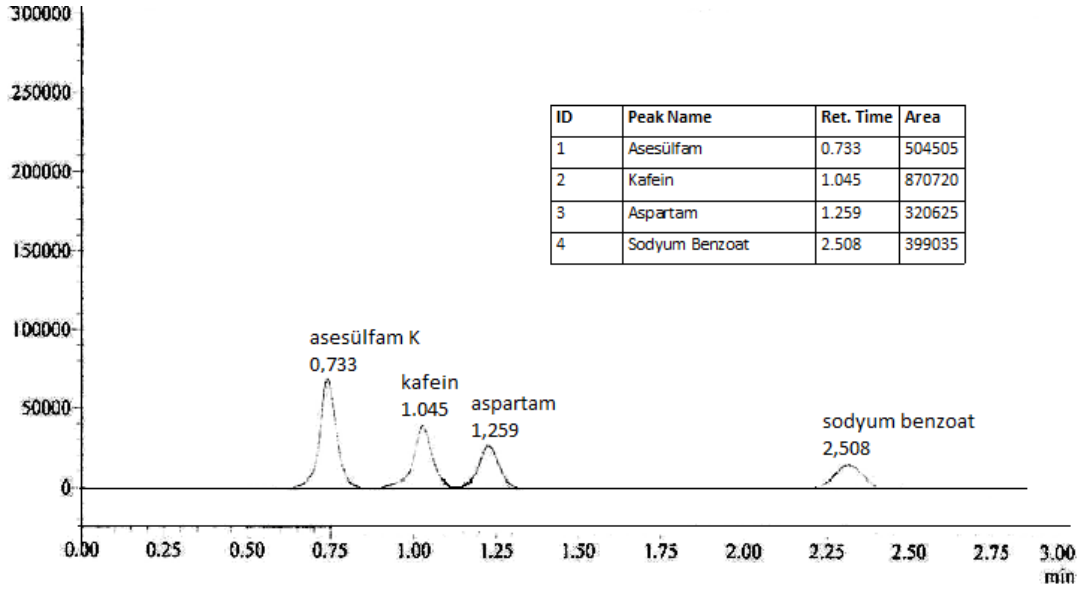


ID	Peak Name	Ret. Time	Area
1	Asesülfam	0.742	605614
2	Kafein	1.028	1044977
3	Aspartam	1.228	384824
4	Sodyum Benzoat	2.314	479702

Şekil EK- B. 3 %120'lik numune çözeltisi kromatogramı

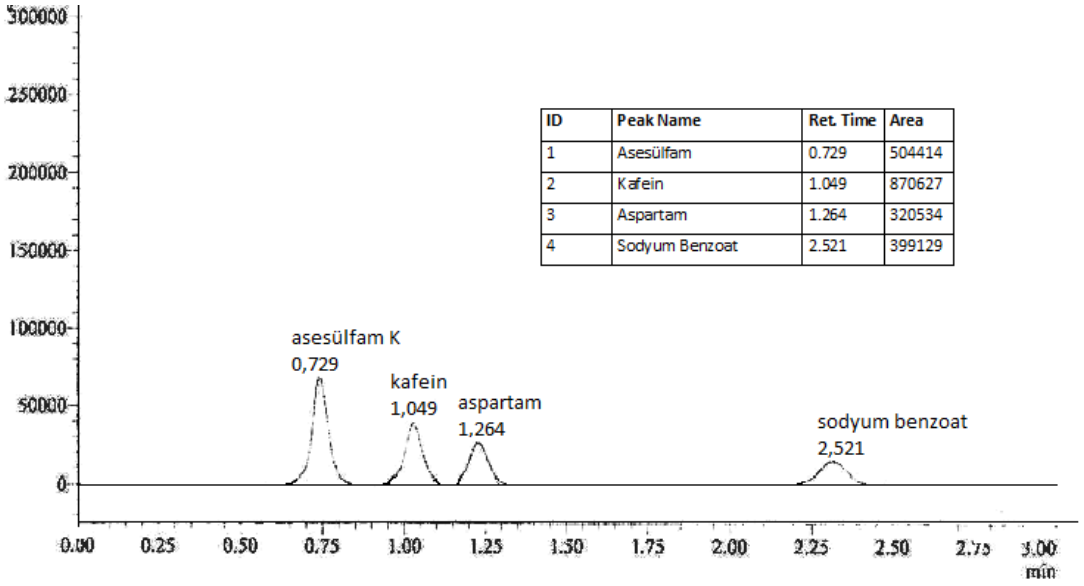
EK-C

KESİNLİK KROMATOGRAMLARI



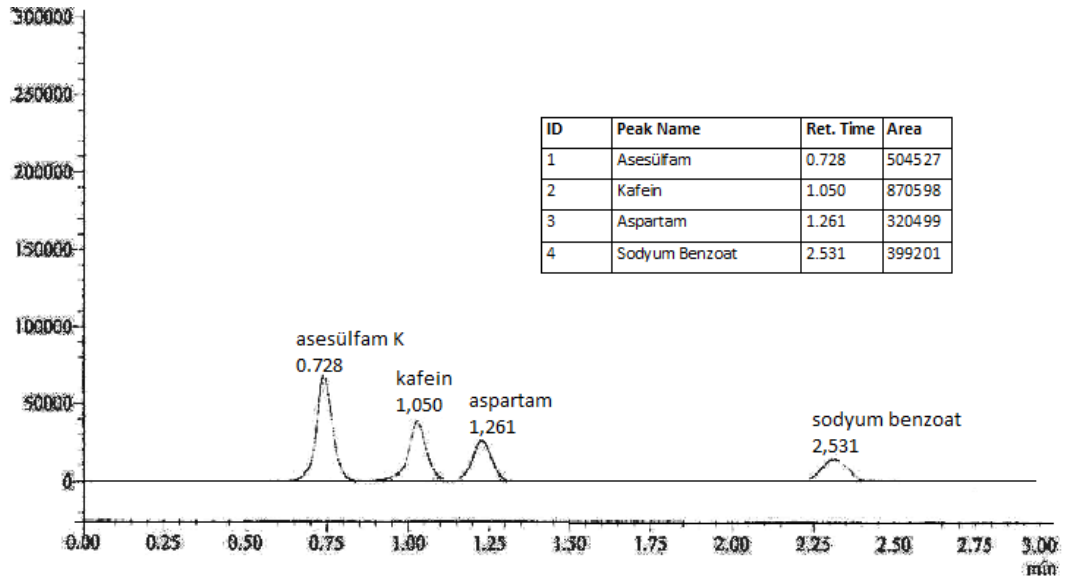
ID	Peak Name	Ret. Time	Area
1	Asesülfam	0.733	504505
2	Kafein	1.045	870720
3	Aspartam	1.259	320625
4	Sodyum Benzoat	2.508	399035

Şekil EK- C. 1 Miktar tayinindeki cihaz kesinliği kromatogramı



ID	Peak Name	Ret. Time	Area
1	Asesülfam	0.729	504414
2	Kafein	1.049	870627
3	Aspartam	1.264	320534
4	Sodyum Benzoat	2.521	399129

Şekil EK- C. 2 Miktar tayinindeki metot kesinliği kromatogramı

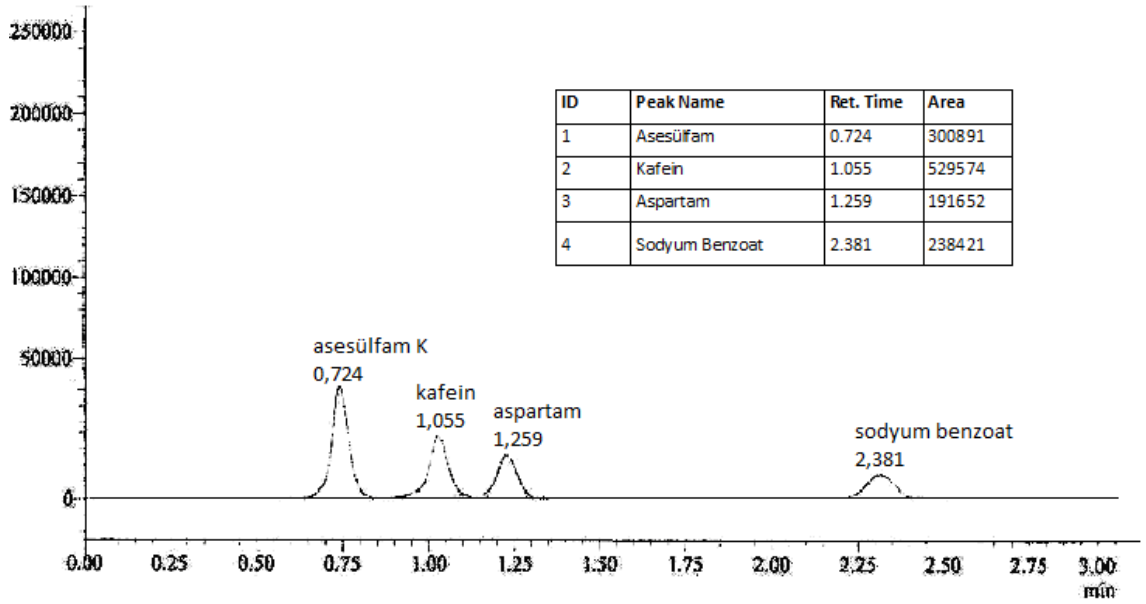


ID	Peak Name	Ret. Time	Area
1	Asesülfam	0.728	504527
2	Kafein	1.050	870598
3	Aspartam	1.261	320499
4	Sodyum Benzoat	2.531	399201

Şekil EK- C. 3 Miktar tayinindeki ara kesinlik kromatogramı

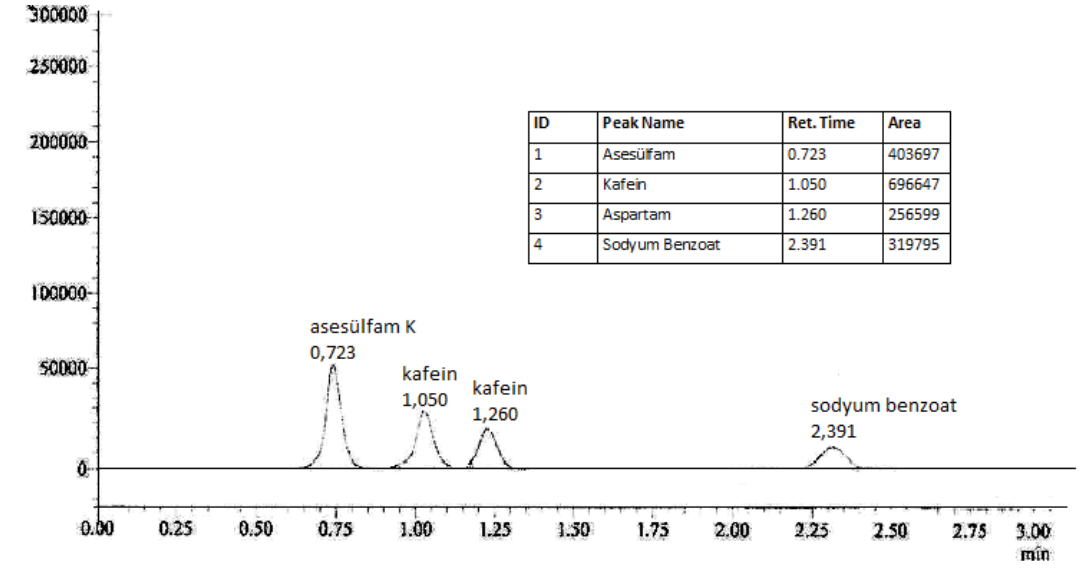
EK-D

DOĞRUSALLIK VE LİNEERLİK KROMATOGRAMLARI



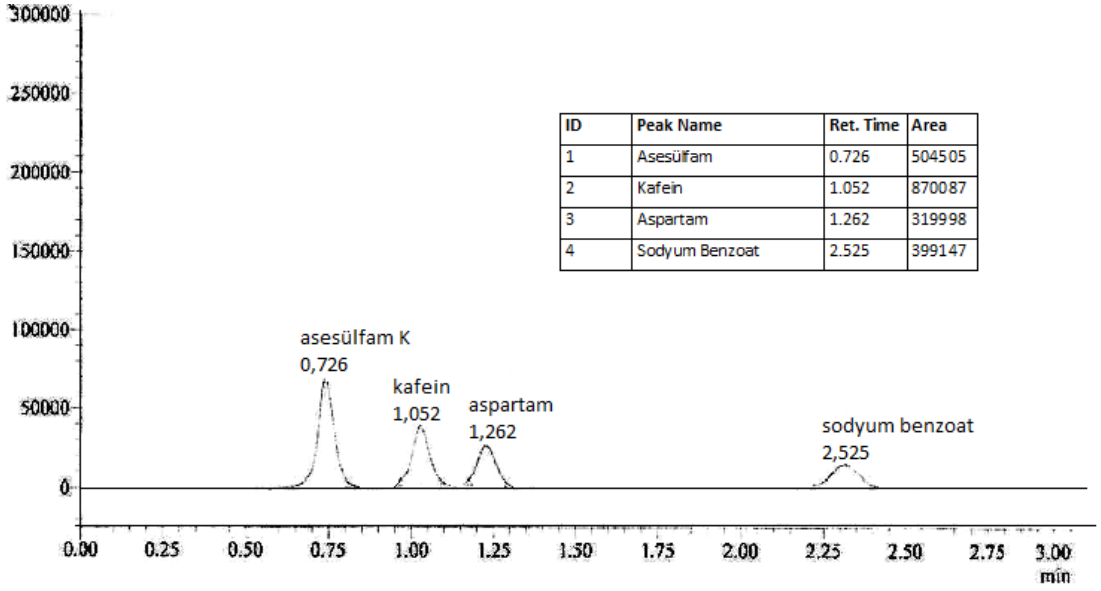
ID	Peak Name	Ret. Time	Area
1	Asesülfam	0.724	300891
2	Kafein	1.055	529574
3	Aspartam	1.259	191652
4	Sodyum Benzoat	2.381	238421

Şekil EK- D. 1 Miktar tayinindeki doğrusallık kromatogramı (%60'lık standart çözelti)



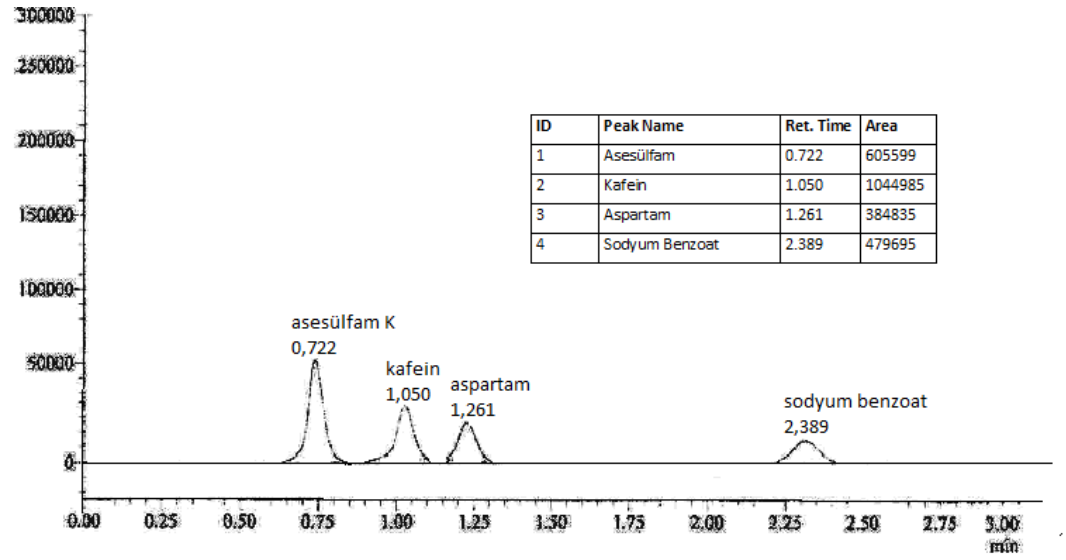
ID	Peak Name	Ret. Time	Area
1	Asesülfam	0.723	403697
2	Kafein	1.050	696647
3	Aspartam	1.260	256599
4	Sodyum Benzoat	2.391	319795

Şekil EK- D. 2 Miktar tayinindeki doğrusallık kromatogramı (%80'lık standart çözelti)



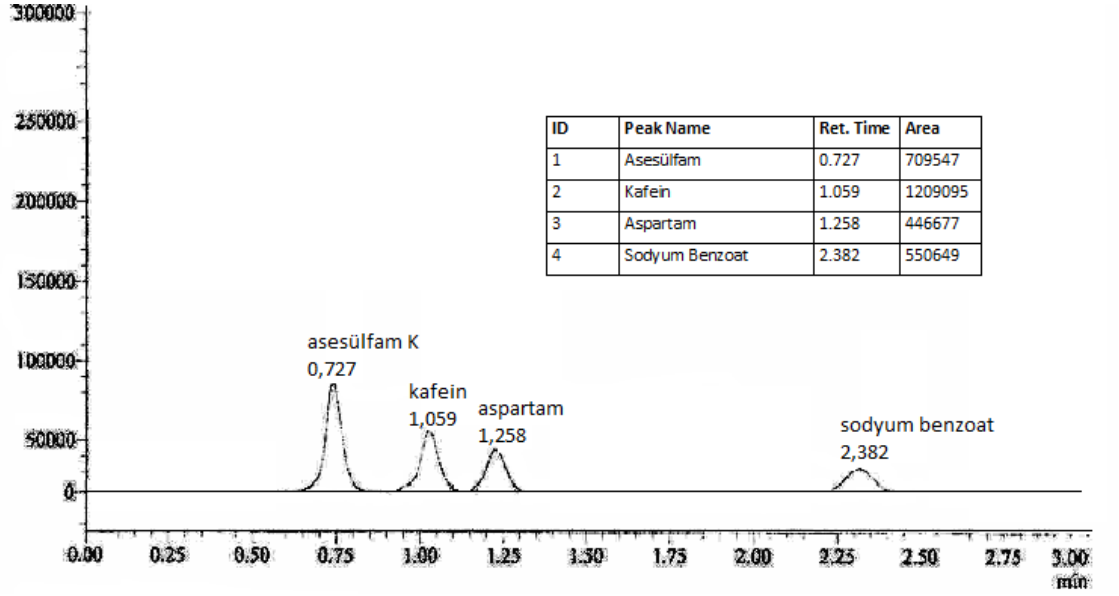
ID	Peak Name	Ret. Time	Area
1	Asesülfam	0.726	504505
2	Kafein	1.052	870087
3	Aspartam	1.262	319998
4	Sodyum Benzoat	2.525	399147

Şekil EK- D. 3 Miktar tayinindeki doğrusallık kromatogramı (%100'lık standart çözelti)



ID	Peak Name	Ret. Time	Area
1	Asesülfam	0.722	605599
2	Kafein	1.050	1044985
3	Aspartam	1.261	384835
4	Sodyum Benzoat	2.389	479695

Şekil EK- D. 4 Miktar tayinindeki doğrusallık kromatogramı (%120'lık standart çözelti)

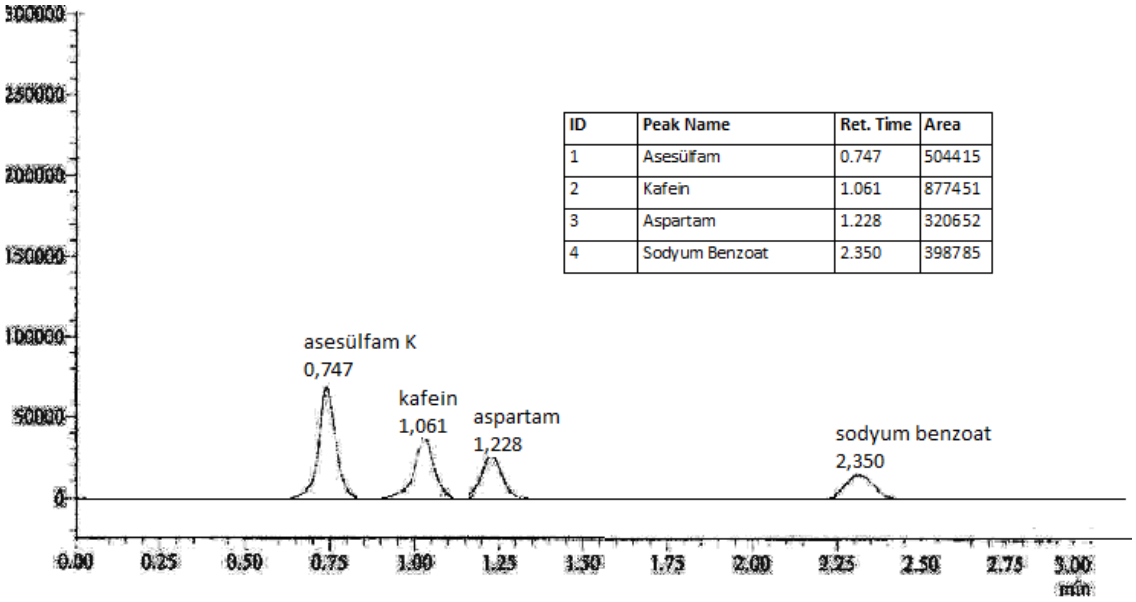


ID	Peak Name	Ret. Time	Area
1	Asesülfam	0.727	709547
2	Kafein	1.059	1209095
3	Aspartam	1.258	446677
4	Sodyum Benzoat	2.382	550649

Şekil EK- D. 5 Miktar tayinindeki doğrusallık kromatogramı (%140'lık standart çözelti)

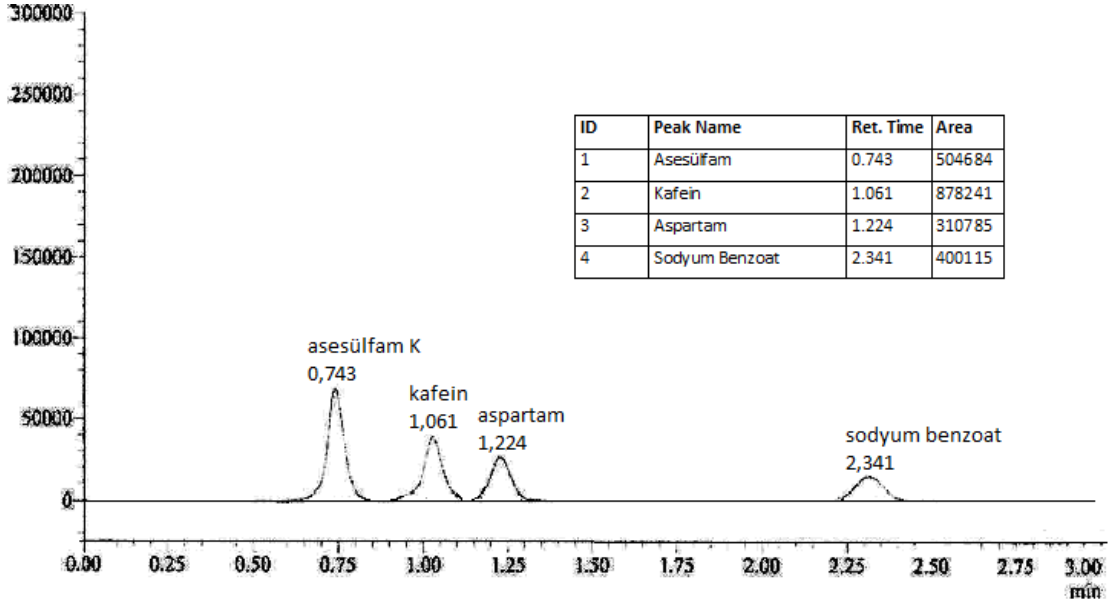
EK-E

GÜVENİLİRLİLİK KROMATOGRAMLARI



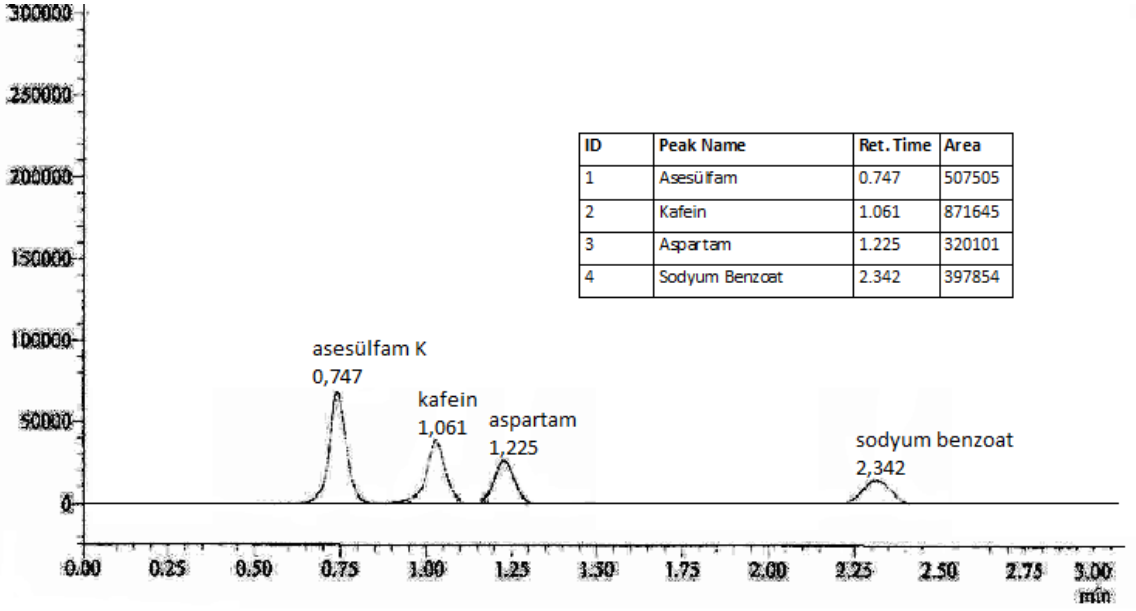
ID	Peak Name	Ret. Time	Area
1	Asesülfam	0.747	504415
2	Kafein	1.061	877451
3	Aspartam	1.228	320652
4	Sodyum Benzoat	2.350	398785

Şekil EK- E. 1 Standart çözeltisi başlangıç kromatogramı



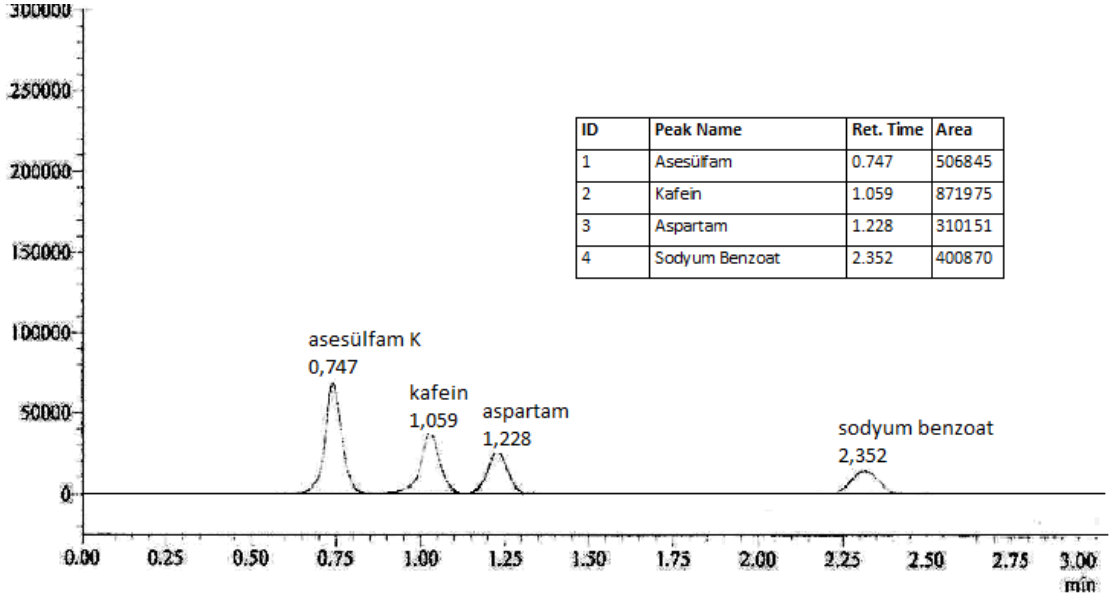
ID	Peak Name	Ret. Time	Area
1	Asesülfam	0.743	504684
2	Kafein	1.061	878241
3	Aspartam	1.224	310785
4	Sodyum Benzoat	2.341	400115

Şekil EK- E. 2 Numune çözeltisi başlangıç kromatogramı



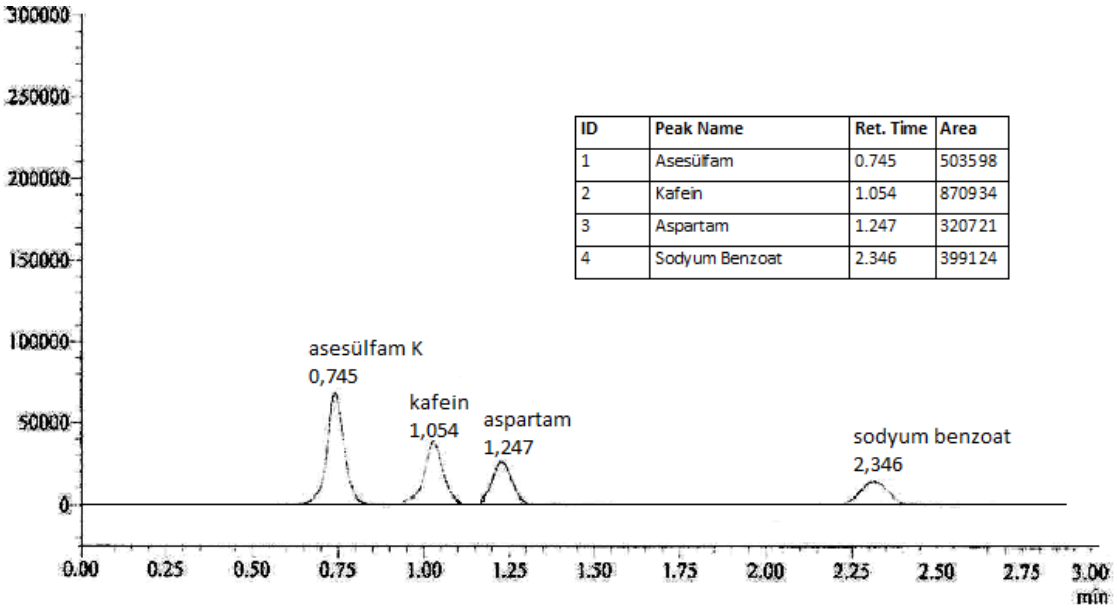
ID	Peak Name	Ret. Time	Area
1	Asesülfam	0.747	507505
2	Kafein	1.061	871645
3	Aspartam	1.225	320101
4	Sodyum Benzoat	2.342	397854

Şekil EK- E. 3 Standart çözeltisi oda koşullarında 48. saat kromatogramı



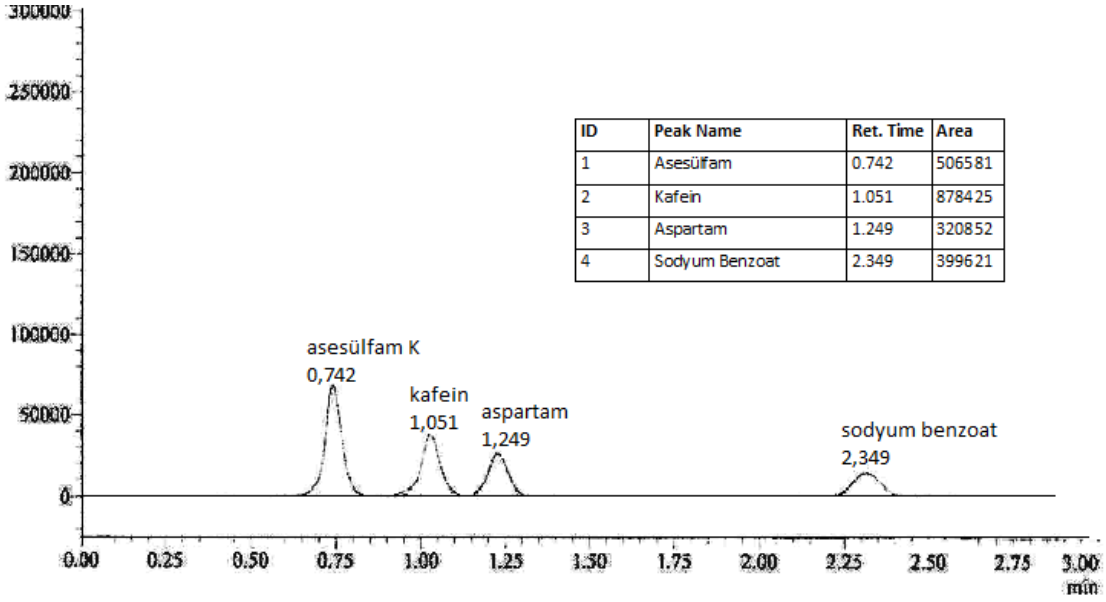
ID	Peak Name	Ret. Time	Area
1	Asesülfam	0.747	506845
2	Kafein	1.059	871975
3	Aspartam	1.228	310151
4	Sodyum Benzoat	2.352	400870

Şekil EK- E. 4 Numune çözeltisi oda koşulları 48. saat kromatogramı



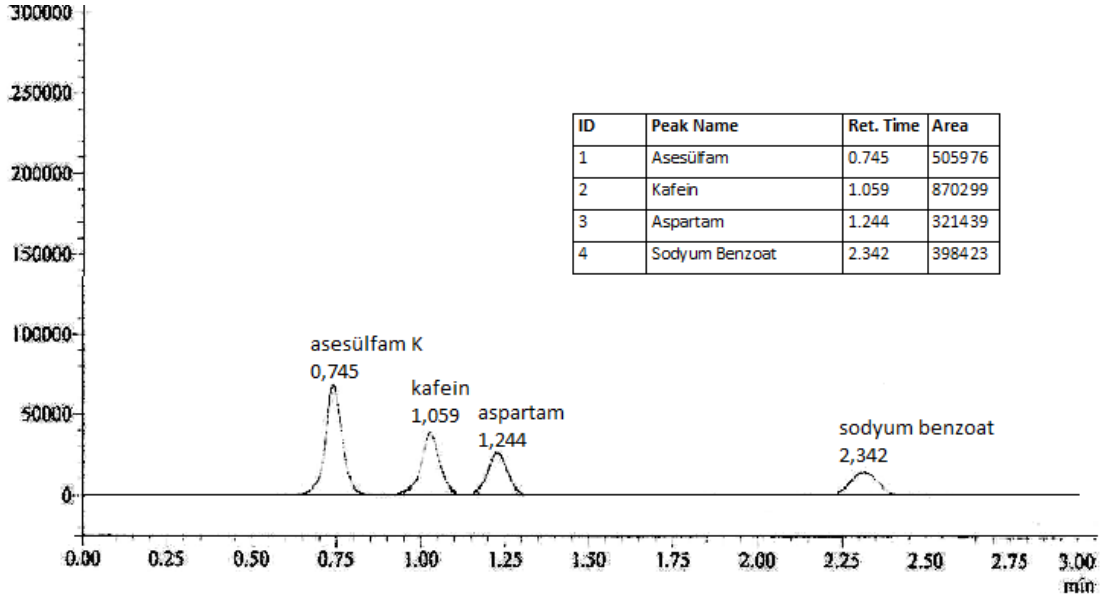
ID	Peak Name	Ret. Time	Area
1	Asesülfam	0.745	503598
2	Kafein	1.054	870934
3	Aspartam	1.247	320721
4	Sodyum Benzoat	2.346	399124

Şekil EK- E. 5 Metot koşulları (hareketli faz oranı (20:80 h/h)) ile elde edilen kromatogram



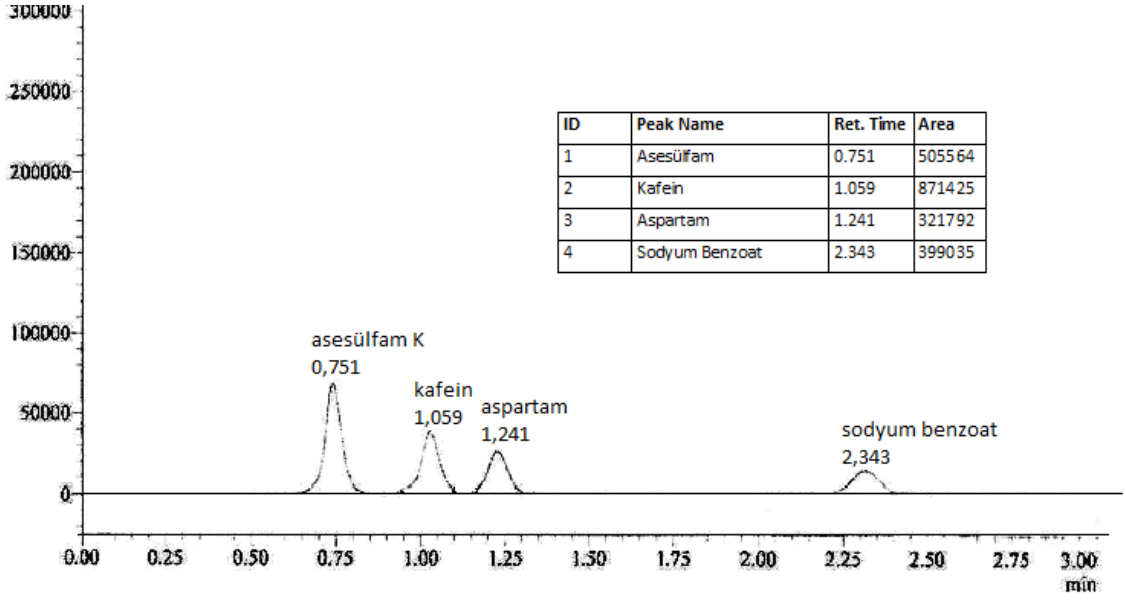
ID	Peak Name	Ret. Time	Area
1	Asesülfam	0.742	506581
2	Kafein	1.051	878425
3	Aspartam	1.249	320852
4	Sodyum Benzoat	2.349	399621

Şekil EK- E. 6 Hareketli faz oranı (22:78 h/h) olarak değiştirilmiş sistemden elde edilen kromatogram



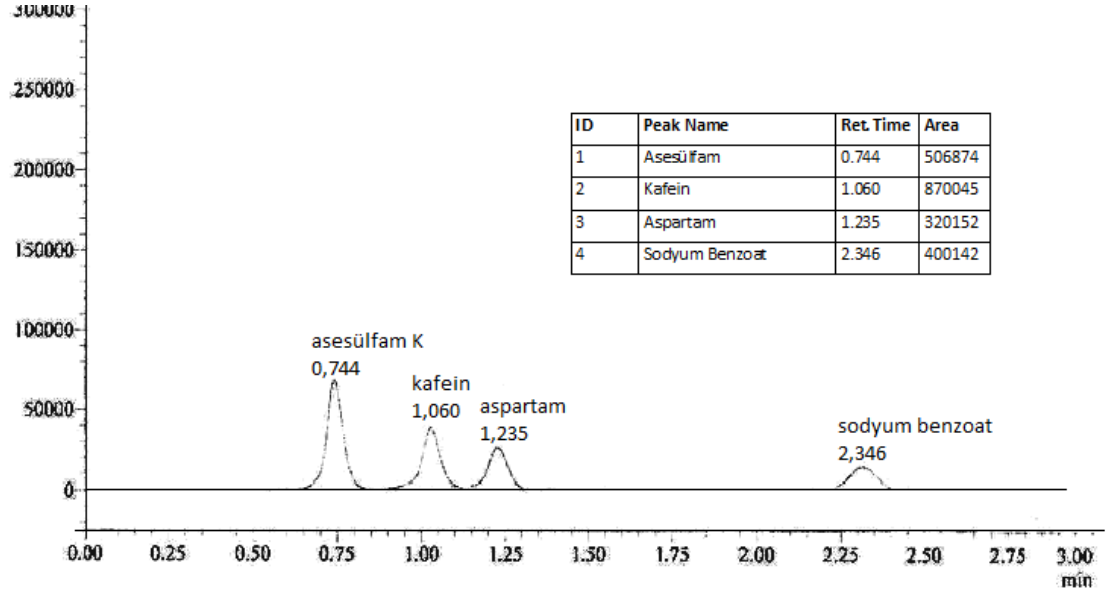
ID	Peak Name	Ret. Time	Area
1	Asesülfam	0.745	505976
2	Kafein	1.059	870299
3	Aspartam	1.244	321439
4	Sodyum Benzoat	2.342	398423

Şekil EK- E. 7 Hareketli faz oranı (18:82 h/h) olarak değiştirilmiş sistemden elde edilen kromatogram



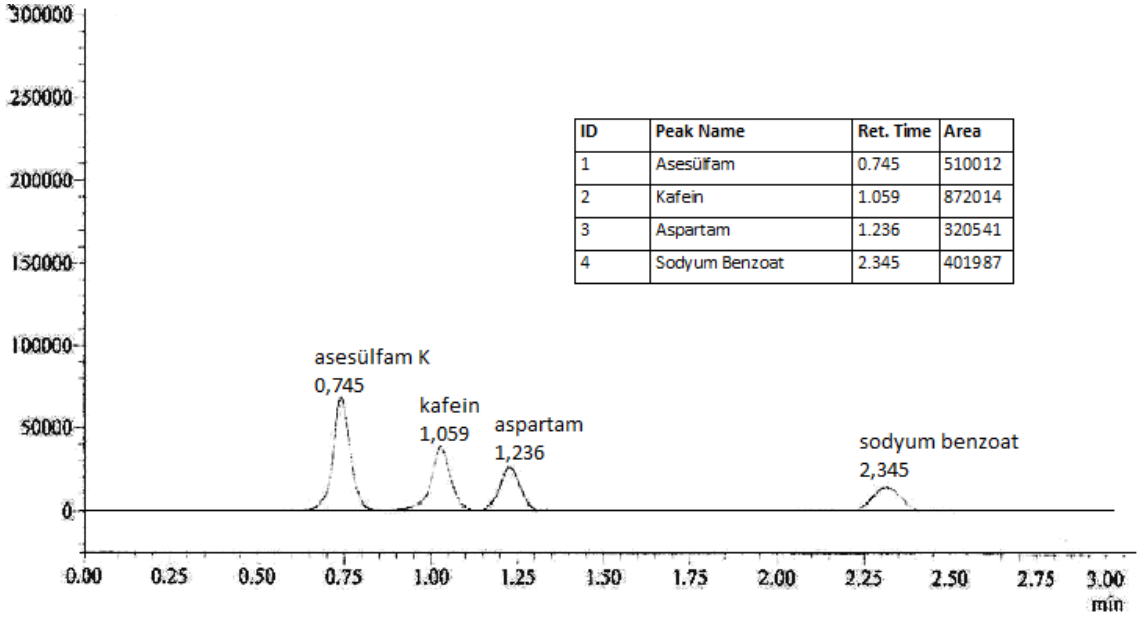
ID	Peak Name	Ret. Time	Area
1	Asesülfam	0.751	505564
2	Kafein	1.059	871425
3	Aspartam	1.241	321792
4	Sodyum Benzoat	2.343	399035

Şekil EK- E. 8 Metot koşuları (kolon sıcaklığı 40 ˚C iken) ile elde edilen kromatogram



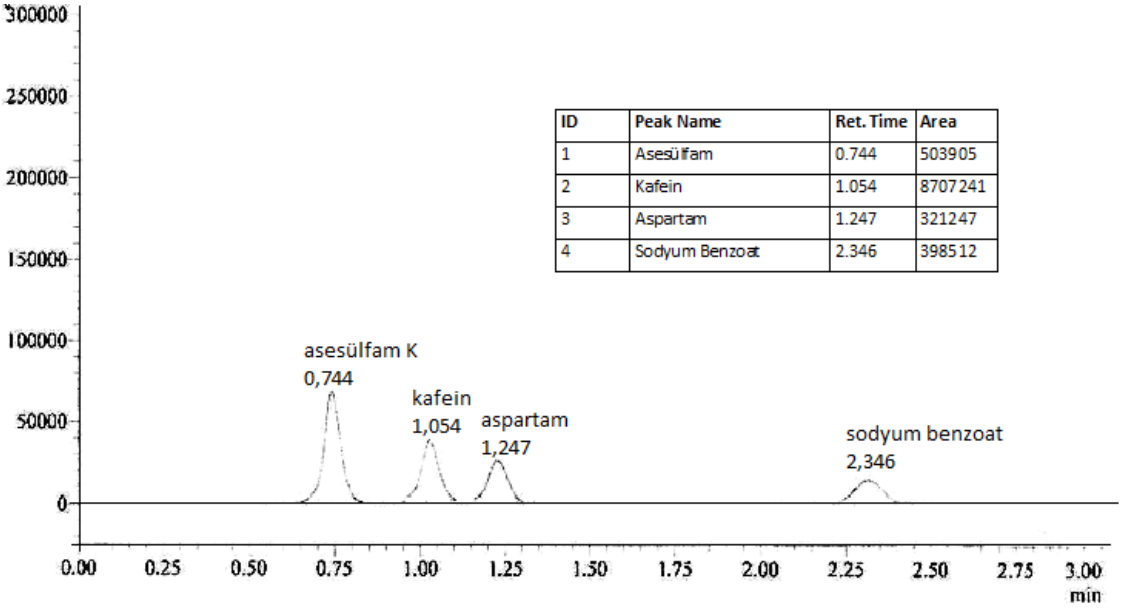
ID	Peak Name	Ret. Time	Area
1	Asesülfam	0.744	506874
2	Kafein	1.060	870045
3	Aspartam	1.235	320152
4	Sodyum Benzoat	2.346	400142

Şekil EK- E. 9 Kolon sıcaklığı 38 ˚C'ye değiştirilmiş sistemden elde edilen kromatogram



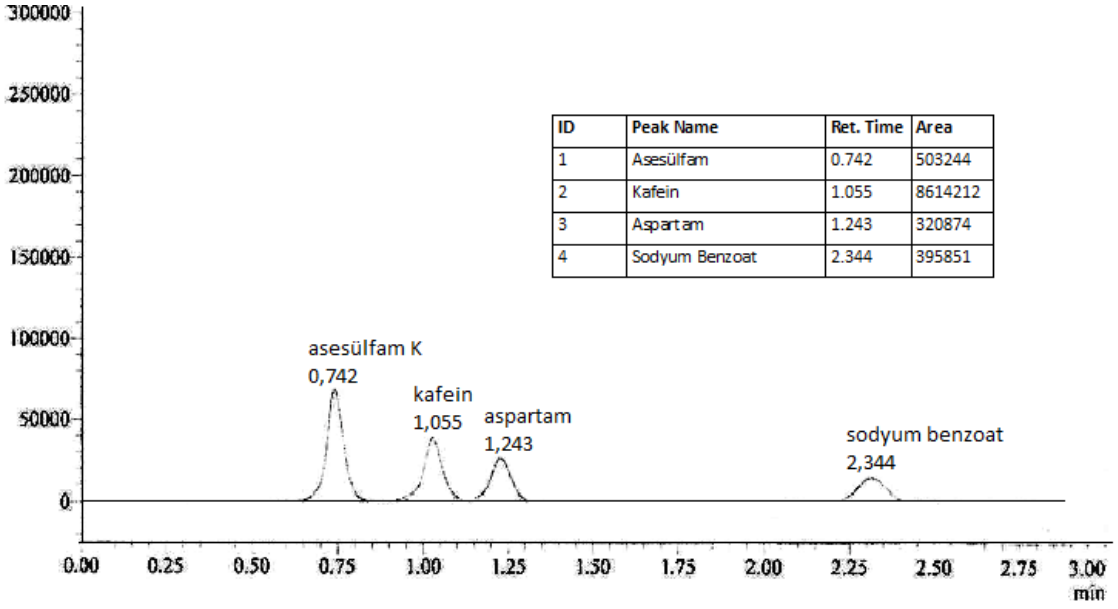
ID	Peak Name	Ret. Time	Area
1	Asesülfam	0.745	510012
2	Kafein	1.059	872014
3	Aspartam	1.236	320541
4	Sodyum Benzoat	2.345	401987

Şekil EK- E. 10 Kolon sıcaklığı 42˚C'ye değiştirilmiş sistemden elde edilen kromatogram



ID	Peak Name	Ret. Time	Area
1	Asesülfam	0.744	503905
2	Kafein	1.054	8707241
3	Aspartam	1.247	321247
4	Sodyum Benzoat	2.346	398512

Şekil EK- E. 11 Metot koşulları (kolon-1) ile elde edilen standart kromatogramı

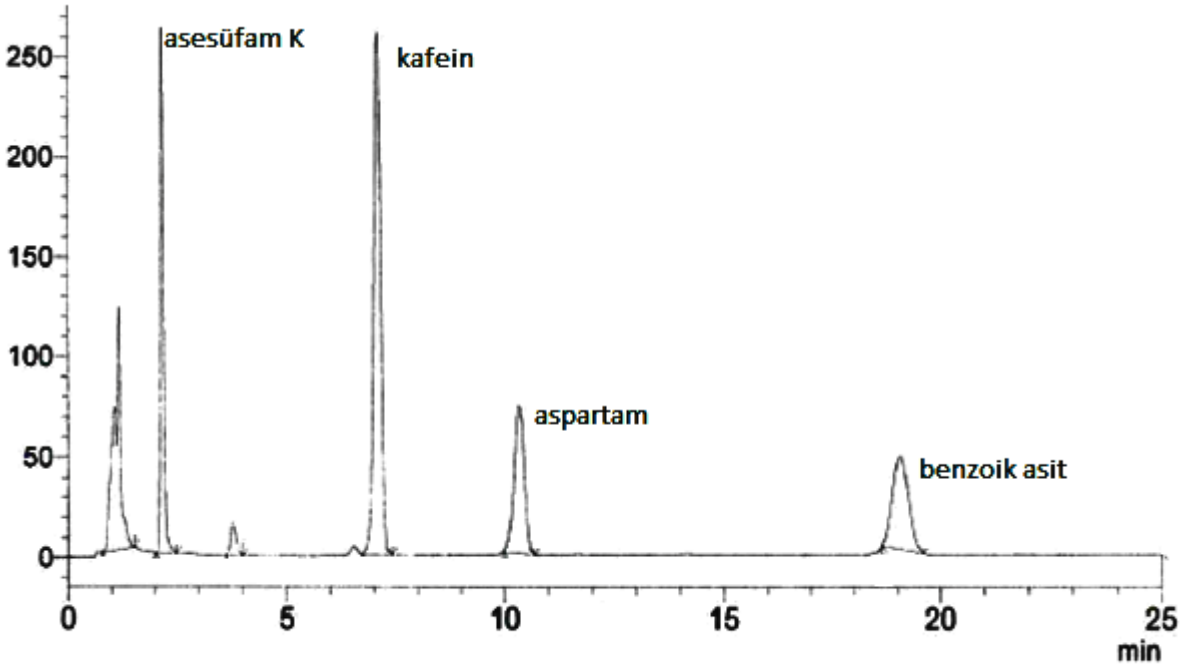


ID	Peak Name	Ret. Time	Area
1	Asesülfam	0.742	503244
2	Kafein	1.055	8614212
3	Aspartam	1.243	320874
4	Sodyum Benzoat	2.344	395851

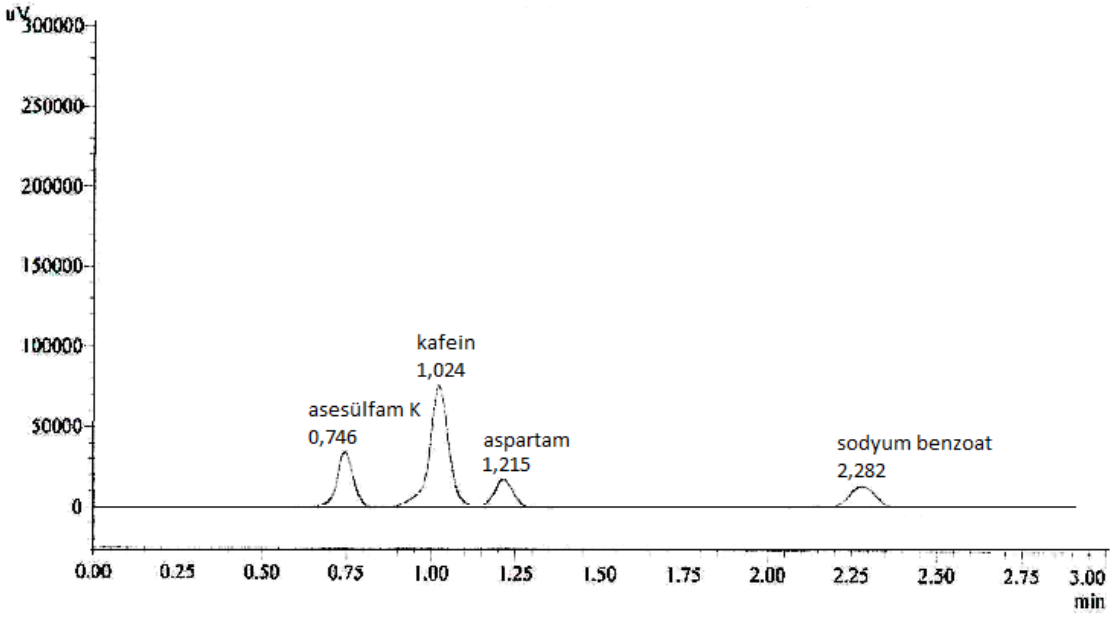
Şekil EK- E. 12 Kolon-2 ile elde edilen standart kromatogramı

EK-F

KARŞILAŞTIRMA KROMATOGRAMLARI



Şekil EK- F. 1 HPLC sistemi ile elde edilen kromatogram



Şekil EK- F. 2 UFLC sistemi ile elde edilen kromatogram

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı	:Muhammed Zahid KASAPOĞLU
Doğum Tarihi ve Yeri	:1982/İstanbul
Yabancı Dili	:İngilizce
E-posta	:muhammed.kasapoglu@yildizteknopark.com.tr

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	**Alan**	**Okul/Üniversite**	**Mezuniyet Yılı**
Lisans	Kimya	Kocaeli Üniversitesi	2006
Lise	Fen	Tercüman Lisesi	2001

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	**Firma/Kurum**	**Görevi**
2015	Yıldız Teknik Üniversitesi Teknopark A.Ş.	Proje Sorumlusu
2011	Polifarma İlaç San. ve Tic. A.Ş.	Kalite Güvence Uzmanı
2007	Abdi İbrahim İlaç San. ve Tic. A.Ş.	Kalite Güvence Uzman